



Différenciation de filets de poisson frais de filets congelés/décongelés sur le modèle du bar (*Dicentrarchus labrax*)

Sylvain Marlard

► To cite this version:

Sylvain Marlard. Différenciation de filets de poisson frais de filets congelés/décongelés sur le modèle du bar (*Dicentrarchus labrax*). Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Littoral Côte d'Opale - ULCO, 2013. Français. NNT: . tel-04065348

HAL Id: tel-04065348

<https://ulco.hal.science/tel-04065348>

Submitted on 11 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.

Université du Littoral Côte d'Opale

Ecole doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement : ED SMRE 104

Discipline : Biochimie et Biotechnologies Agroalimentaires

Equipe de Recherche Agroalimentaire et Produits Aquatiques (APA)

THESE présentée par :

Sylvain MARLARD

Soutenue le : 20 décembre 2013

Pour obtenir le Grade de Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

**Différenciation de filets de poisson frais
de filets congelés/décongelés
sur le modèle du bar (*Dicentrarchus labrax*)**

M. Roger DURAND (directeur de thèse) Professeur et Président d'Université, ULCO

M. Thierry GRARD (co-encadrant) Maître de Conférences, ULCO Boulogne sur Mer

Mme Pierrette ETHUIN (co-encadrante) Maître de Conférences, ULCO Boulogne sur Mer

Jury :

Mme Véronique VERREZ-BAGNIS (rapporteur) .. Cadre de Recherches, HDR, IFREMER, Nantes

M. Santiago AUBOURG MARTÍNEZ (rapporteur) Professeur de recherche, CSIC, IIM, Vigo

M. Romdhane KAROUI (examineur) Professeur, Université d'Artois, Arras

M. Roger DURAND (examineur) Professeur et Président d'Université, ULCO, Dunkerque

Remerciements

A la Science et aux Sciences,

Pour le grand champ d'expériences qu'elles ouvrent
Pour les miracles qu'elles accomplissent et les petits riens qu'elles expliquent

REMERCIEMENTS

Tout d’abord, je remercie Monsieur Roger DURAND, Président de l’Université du Littoral Côte d’Opale d’avoir accepté de diriger ces travaux de thèse.

Je remercie Madame VERREZ-BAGNIS et Monsieur AUBOURG MARTÍNEZ d’avoir d’accepté d’évaluer mes travaux de thèse en qualité de rapporteur. Je remercie également Monsieur KAROUI d’avoir accepté d’être examinateurs lors de ma soutenance.

Je remercie la région Nord Pas-de-Calais d’avoir financé ces travaux en cofinçant mon doctorat avec l’ULCO et en allouant un financement dans le cadre d’un projet ARcir. J’associe également l’Union Européenne qui soutient ce type de projet dans le cadre des fonds FEDER. Je remercie Monsieur Thierry GRARD et Madame Pierrette ETHUIN pour leur accueil et leur encadrement au sein de l’équipe APA, ainsi que tous les membres de cette équipe : Maryse BONNIN-JUSSERAND, Charlène COULON, Périne DOYEN, Irina SADOSKAYA, Philippe LENCEL et Denis WATIER.

Je remercie Monsieur Guillaume DUFLOS pour son soutien scientifique, Monsieur Bruno LE FUR pour son soutien technique et Madame Dorothée VINCENT pour son aide en bio-statistiques.

Je remercie toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail, l’équipe du Professeur VANDORSSELER de Strasbourg dont Madame Christine CARAPITO, les membres de l’ANSES de Boulogne sur Mer et l’équipe du Professeur Romdhane KAROUI de l’Université d’Artois à Arras.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leur écoute et leur soutien.

J’associe à ce travail, les professeurs Richard ASAKER, Serge BLOND et Thierry STEKELOROM, qui ont participé, à leur manière, à ce travail.

SOMMAIRE

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	4
AVANT-PROPOS	10
GLOSSAIRE	13
INTRODUCTION	15
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	19
1. LE MUSCLE DE POISSON, UNE MATRICE ALIMENTAIRE PARTICULIERE	20
2. LE PROCEDE DE CONGELATION	31
3. MODIFICATIONS SENSORIELLES DU POISSON DECONGELE	33
4. LES MODIFICATIONS MACROMOLECULAIRES DUES A LA CONGELATION/DECONGELATION	38
5. MODE DE DIFFERENCIATION ENTRE FILET DE POISSON FRAIS ET FILET DE POISSON DECONGELE	39
6. L'UTILISATION DE LA PROTEOMIQUE POUR EVALUER LA QUALITE DES PRODUITS AQUATIQUES	48
7. L'EXUDAT	57
8. LA PARVALBUMINE	58
9. INVENTAIRE DES METHODES IMMUNOLOGIQUES POUR DOSER LA PARVALBUMINE	60
10. SYNTHESE SUR LES METHODES DE DIFFERENCIATION FRAIS / DECONGELE	64
MATERIELS ET METHODES	66
1. LE CHOIX DES ESPECES ETUDIEES	67
2. LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON BIOLOGIQUE A PARTIR DU TISSU MUSCULAIRE	69
3. LA RECHERCHE D'UN MARQUEUR PAR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE COMPARATIVE	70
4. UTILISATION DES PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DE LA PARVALBUMINE	77
5. ANALYSE MULTI-VARIEE DES COMPOSES DE L'EXUDAT DE BAR FRAIS ET DECONGELE	84
6. ETUDE PRELIMINAIRE SUR LA SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE	87

Sommaire

RESULTATS ET DISCUSSION	89
1. RECHERCHE D'UN MARQUEUR PAR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE ET PAR TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES	91
2. DOSAGE DES DIFFERENTS COMPOSANTS DES EXUDATS DE FILETS FRAIS ET DECONGELES	117
3. ANALYSE PRELIMINAIRE DES FILETS DE BAR PAR SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE	129
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	137
1. CONCLUSION	138
2. PERSPECTIVES	140
BIBLIOGRAPHIE	141
ANNEXES	154
COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES	173
1. POSTER DES DOCTORIALES FRANCO-BELGES DE MAI 2011	174
2. SEMINAIRE « POISSON FRAIS POISSON DECONGELE » DU 27 NOVEMBRE 2012	175
3. PARTICIPATION AU WEFTA 2013, DU 9 AU 11 OCTOBRE	181

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Index des figures

Figure 1 : Consommation apparente des produits de la mer en France de 1998 à 2011	16
Figure 2 : Balance commerciale déficitaire des produits aquatiques	17
Figure 3 : Musculature du squelette du poisson.....	20
Figure 4 : Coupe de cellules musculaires mettant en évidence les myofibrilles	21
Figure 5 : Dégradation du glycogène par voie aérobie et anaérobie dans le muscle de poisson	22
Figure 6 : Répartitions des protéines dans le tissu musculaire du bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	24
Figure 7 : Evolution du muscle de poisson après la mort de l'animal	25
Figure 8 : Relation entre qualité et fraîcheur.....	27
Figure 9 : Flash code permettant de télécharger l'application « How Fresh is your Fish ».....	28
Figure 10 : Formule de calcul en pourcentage du facteur K	29
Figure 11 : Photos par microscopie du tissu du saumon d'Atlantique, frais (contrôle) et décongelé	35
Figure 12 : Photos de microscopie montrant l'altération de la structure du tissu musculaire de bar (<i>D. labrax</i>).....	36
Figure 13 : Photographies par microscopie électronique des fibres musculaires de cabillaud (<i>Gadus morhua</i>).....	37
Figure 14 : Localisation subcellulaire des marqueurs biochimiques (protéines enzymatiques ou non, ADN et ions) utilisés pour la mesure de l'altération du tissu musculaire du muscle blanc du poisson.....	40
Figure 15 : principe de base de la spectrométrie de fluorescence	43
Figure 16 : Le test de la comète: un outil de mesure de la dégradation de l'ADN	46
Figure 17 : Devenir des protéines oxydées.	47
Figure 18 : Utilisation de la protéomique et de la génomique dans la recherche de marqueurs	49
Figure 19 : Stratégies en protéomique typiquement utilisées pour caractériser et identifier des protéines d'intérêts	50
Figure 20 : Schéma d'un protocole d'électrophorèse bidimensionnelle comparative	52

Sommaire

Figure 21 : Les 5 étapes clés de l'électrophorèse bidimensionnelle.....	53
Figure 22 : Schémas de la structure de la parvalbumine (A) et du motif « EF-hand » (B).....	58
Figure 23 : Flux du calcium pendant le cycle contraction-relaxation des fibres musculaires de poisson	59
Figure 24 : Schémas des tests ELISA indirect (A) et en sandwich indirect (B).	61
Figure 25 : Schéma du montage de la bandelette de nitrocellulose pour réaliser un immuno-dosage par flux latéral.....	63
Figure 26 : Le bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>), (Source FAO).....	67
Figure 27 : Flétan noir (<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>), (source : Ispolar Ltd).....	68
Figure 28 : Diagramme représentant le plan d'échantillonnage pour la recherche d'un marqueur de différenciation frais/décongelé.....	70
Figure 29 : Formule du calcul des sommes cumulées.....	77
Figure 30 : Schéma expliquant le principe de l'ELISA par compétition.....	79
Figure 31 : Courbes étalon de l'absorbance en fonction de la concentration en parvalbumine (A) et du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en parvalbumine (B)	80
Figure 32 : Protocole opératoire de l'analyse multi-variée des exsudats de bar frais et décongelé	84
Figure 33 : Electrophorèse bidimensionnelle comparative de filets de bar frais vs décongelé	92
Figure 34 : Zone d'intérêt des gels des filets de bar frais en fonction du temps post-mortem	93
Figure 35 : zone d'intérêt des gels des filets de bar décongelés en fonction du temps post-mortem.....	93
Figure 36 : Evolution de la flore mésophile des filets de bar frais et décongelés	95
Figure 37 : Evolution de l'ABVT dans les filets de bar frais et décongelés.....	96
Figure 38 : Evolution des concentrations en amines biogènes dans les filets de bar frais (A) et décongelés (B)	97
Figure 39 : Evolution des concentrations en amines biogènes dans les filets de bar frais et décongelés.....	99
Figure 40 : Comparaison des cinétiques des critères de fraîcheur et de l'apparition des spots d'intérêt dans les profils 2D issus de filets de bar frais ou décongelés	100
Figure 41 : Dosage de la parvalbumine par ELISA par compétition	105

Sommaire

Figure 42 : SDS-PAGE et Western Blot des exsudats de filets de bar frais et décongelés.....	107
Figure 43 : SDS-page des exsudats de filets de bar frais et décongelés, traités ou non traités thermiquement.....	109
Figure 44 : SDS-PAGE et Western Blot des exsudats de filets de bar frais et décongelés, traités ou non traités thermiquement	110
Figure 45 : Purification des parvalbumines du bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	111
Figure 46 : Gels d'électrophorèse bidimensionnelle sur les exsudats non traités thermiquement de flétan noir (<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>).....	114
Figure 47 : Gels d'électrophorèse bidimensionnelle sur les exsudats traités thermiquement de flétan noir (<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>).....	114
Figure 48 : Mode opératoire du dosage des protéines natives, thermorésistantes et pesée des culots lyophilisés.....	118
Figure 49: Moyennes des concentrations en protéines des exsudats de filets de bar frais et décongelés avant (protéines totales) (A) et après traitement thermique (« parvalbumines ») (B) et poids des culots lyophilisés après traitement thermique (C). (n=12)	120
Figure 50 : Moyennes des activités spécifiques de l'α-glucosidase dans les exsudats des filets de bar frais et décongelés (n=12).....	122
Figure 51: Moyennes des concentrations du calcium libre (A) et des nucléotides et de leurs dérivés (B) dans les exsudats de filets de bar frais et décongelés (n=12)	123
Figure 52: Le dendrogramme des variables étudiées sur les exsudats	125
Figure 53: Complémentarité des méthodes de différenciation filet frais, congelé/décongelé	128
Figure 54 : Spectre de fluorescence de filets de bar frais ou décongelés en utilisant le NADH comme fluorochrome	130
Figure 55 : Spectre de fluorescence de filets de bar frais ou décongelés en utilisant le tryptophane comme fluorochrome	131
Figure 56 : Spectre de fluorescence de filets de bar frais ou décongelés en utilisant le protocole d'oxydation des lipides	132
Figure 57 : Spectre de fluorescence de filets de bar frais ou décongelés en utilisant le protocole synchrone	133
Figure 58: Le diagramme de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les spectres du NADH.....	135

Sommaire

Index des tableaux

Tableau I : Echelle d'acceptabilité du taux d'ABVT et du rapport TMA/ABVT	30
Tableau II : Comparaison des avantages des différentes techniques de préservation des aliments	33
Tableau III : Raisons de la perte de qualité des produits de la pêche pendant leur stockage à des températures négatives.....	33
Tableau IV : Synthèse des techniques mises en œuvre depuis 2002 permettant de différencier les filets frais des décongelés	64
Tableau V : Programme du générateur pour l'IEF.....	72
Tableau VI : protocole de coloration des gels au nitrate d'argent.....	74
Tableau VII : Programme de migration de l'isoélectrofocalisation pour les petites bandelettes (7cm, pH 3-6).....	82
Tableau VIII : Identification des spots par Mascot obtenue avant 2010	100
Tableau IX : Identification des protéines composant les spots 1 et 2 en 2010	100
Tableau X : masses moléculaires et points isoélectriques théoriques et pratiques des 2 isoformes de parvalbumines du bar.....	102
Tableau XI : Intensité des bandes du SDS-page de la Figure 43.....	109
Tableau XII : Liste des échantillons de flétan préparés pour des analyses par electrophorèse bidimensionnelle.....	113
Tableau XIII : Identification des spots d'intérêt sur les échantillons de flétan du Groenland	115
Tableau XIV: Synthèse des résultats obtenus avant fin 2012	116
Tableau XV : Concentrations des protéines et des poids des culots dans les exsudats (n=12)	120
Tableau XVI : Activité Enzymatique (AE) et Activité Spécifique (AS) des exsudats (n=12)	122
Tableau XVII : Dosage du calcium et des nucléotides et dérivés dans les exsudats	124
Tableau XVIII: Synthèse des variables étudiées dans les exsudats (n=12)	124
Tableau XIX: Rapport entre les intensités (i) des absorbances d'émission à 455 nm et celles d'excitation à 340 nm du NADH	135

Index des annexes

Annexe 1 : version de travail de l'article sur la parvalbumine	155
Annexe 2 : communications écrites et orales	173

AVANT-PROPOS

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe APA (Agroalimentaire et Produits Aquatiques) de l'Université du Littoral Côte d'Opale. Le laboratoire est basé sur la zone industrielle « Capécure » de Boulogne sur Mer.

Boulogne sur Mer est le premier port de pêche de France avec 27 903 tonnes de produits de la mer vendus en halle en 2011 (France Agrimer). De nombreuses entreprises de la marée se sont concentrées dans la région boulonnaise. Le positionnement géographique de Boulogne sur Mer à mi-chemin entre l'Europe du nord, productrice, et l'Europe du sud, consommatrice, en fait un carrefour commercial incontournable des produits de la mer. La ville est ainsi devenue leader dans la transformation des produits de la mer en Europe. La plus grande partie de l'activité économique en lien avec la ressource halieutique est réalisée sur la zone portuaire de la ville, la zone Capécure. L'ULCO s'investit dans ce tissu socio-économique régional en étant implantée dans cette ville depuis 20 ans.

Le bâtiment Capécure de l'Université du Littoral Côte d'Opale se situe au cœur de la zone industrielle du port. Il héberge des formations en lien avec l'industrie agroalimentaire et plus particulièrement avec l'halieutique. L'équipe APA est une équipe de recherche émergente, en phase de développement, soutenue par la direction de l'Université. Elle est passée de trois personnes (deux maîtres de conférences et un doctorant) à huit personnes (six maîtres de conférences, une ingénieur d'étude et un doctorant) en l'espace de trois ans. A compter de janvier 2014, une convention de partenariat entre nos activités de recherche et celles de l'ANSES sera mise en place, ce qui formalisera un peu plus les liens étroits existants entre nos deux institutions depuis plusieurs années. Parallèlement, et suite à la création du master agroalimentaire régional co-habité par les universités de la région Nord Pas de Calais en 2006, un laboratoire régional de recherche en agroalimentaire est sur le point d'être créé, sous le nom d'institut VIOLETTE, dans le cadre de la prochaine habilitation des universités concernant le contrat quinquennal 2015 - 2019.

Afin de conforter sa place, beaucoup d'efforts ont été fournis pour structurer la filière et favoriser la recherche sur la valorisation des produits de la mer. Par étapes successives, cette

recherche a pris racine dans ce territoire. La création du pôle de compétitivité AQUIMER en 2005, qui a fait suite à la création du pôle filière halieutique en 1998, en est le reflet. L'existence de l'Unité Mixte Technologique « Fraîcheur et Qualité des Produits aquatiques » de 2008 à 2011, qui a fédéré les acteurs locaux tels que l'IFREMER, l'AFSSA (ancienne dénomination de l'ANSES), le Centre d'Expérimentation et de Valorisation des Produits de la Mer (CEVPM précurseur de Plateforme « Nouvelles Vagues ») et l'ULCO a été l'occasion de réaliser plusieurs projets de recherche en lien avec les professionnels.

A partir de 2010, une réflexion a été menée sur l'avenir du port de Boulogne sur Mer avec les différents acteurs économiques de la région. Le projet a été baptisé « Capécure 2020 ».

L'un des objectifs de cette réflexion a été de trouver les moyens de valoriser la recherche sur les produits transformés à Boulogne sur Mer à l'horizon 2020.

L'Université du Littoral Côte d'Opale a participé au montage du projet piloté par le pôle Aquimer « Plateforme d'innovation Nouvelles Vagues » qui a été validé en octobre 2011 et dont elle est l'un des actionnaires.

L'Université du Littoral Côte d'Opale porte depuis 2011 le projet structurant « Campus de la mer » qui s'est d'abord concrétisé par la création d'un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) et qui sera l'un des projets phare sur lesquels s'appuiera l'ULCO dans le cadre du prochain contrat quinquennal.

Les prémices de toutes ces évolutions de la recherche ont débuté avec le financement Arcir attribué en 2009 à notre équipe pour travailler sur la thématique d'haliophilie-authenticité frais/décongelé. Cette thèse a été cofinancée par la région Nord Pas-de-Calais et l'Université du Littoral Côte d'Opale et s'intègre dans le cadre de cette dynamique.

Ces travaux de recherche m'ont permis d'effectuer une communication écrite à l'occasion des Doctoriales franco-belges organisées à Marcq en Barœul en mai 2011 et deux communications orales (voir Annexe 2 page 173) :

- l'une à l'occasion d'un séminaire scientifique organisé par le pôle Aquimer à Boulogne sur mer en novembre 2012 sur le thème « Poisson frais – poisson décongelé » page 177,
- l'autre à l'occasion du congrès du WEFTA organisé à Tromsø en Norvège en octobre 2013 sur le thème « Seafood innovations throughout the value chain » dans la section « quality measures » page 182.

Avant-propos

Ces travaux donnent lieu à deux articles scientifiques en préparation :

- « Two-dimensional electrophoresis as comparative strategy to differentiate fresh Sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) fillets to frozen/thawed fillets » qui sera soumis à « Food Chemistry ».
- « New approach to differentiate fresh versus frozen/thawed skinless sea bass fillets (*Dicentrarchus Labrax*) based on a multivariable study on flesh exudate » qui sera soumis à « Fish Physiology and Biochemistry ».

GLOSSAIRE

ABVT : Azote Basique Volatil Total
ADN : Acide DésoxyRiboNucléique
AOP : Appellation d'Origine Contrôlée
ATP : Adénosine TriPhosphate
ADP : Adénosine DiPhosphate
CHAPS : [CHolAmidopropyl diméthyl-Ammonio]-Propane Sulfonate
DSC : Differential Scanning Calorimetry, Calorimétrie différentielle balayage
DTT : DiThioThréitol
ELISA : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EUP : Eau ultra pure
IEF : IsoElectroFocalisation
IGg : immunoglobulines de type G
IGP : Indication Géographique Protégée
IPG : Immobilized pH Gradient, gradient de pH immobilisé
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NIR : Near InfraRed, Infrarouge proche
OGM : Organisme Génétiquement Modifié
OTM : Olive Tail Moment
pH : Potentiel Hydrogène
pHi : Point isoélectrique
PMSF : Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride
QIM : Quality Index Method
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TEMED : Tétra Méthyl Ethylène Diamine
TLCK : TosylLysine Chloromethyl Ketone hydrochloride
TMA : TriMéthyle Amine
WHC : Water Holding Capacity
2DE : 2 Dimensional Electrophoresis (électrophorèse bidimensionnelle)
2DIGE : 2 Differential In Gel Electrophoresis

Organisations professionnelles citées

AFNOR : Association Française de NORmalisation

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

APA : Equipe de recherche Agroalimentaire et Produits Aquatiques

CFPMT : Centre de Formation des Produits de la Mer et de la Terre

CSIC : Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Conseil Supérieur de Recherches Scientifiques)

IFAA : Equipe de recherche en Ingénierie de Formulation des Aliments et Altérations

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

IIM : Instituto de Investigaciones Marinas (Institut de Recherches Marines)

ISO : International Organization for Standardization

LSMBO : Laboratoire de Spectrométrie de Masse des molécules BioOrganiques

ULCO : Université du Littoral Côte d'Opale

WEFTA : West European Fish Technologists Association

INTRODUCTION

Introduction

Les produits de la mer se différencient des autres sources de protéines terrestres par leurs qualités nutritionnelles et leur grande digestibilité. Le poisson est une importante source de protéines dans l'alimentation humaine. Il est majoritairement consommé sous forme fraîche en France. Leurs apports en acide gras essentiels et en minéraux en font un aliment de qualité nutritionnelle incomparable (Smet, (2012)).

Avec l'évolution des modes de consommation, les consommateurs recherchent aujourd'hui des produits simples à préparer. C'est pour cette raison que le poisson frais est le plus souvent acheté sous forme de filets sans peau. Les produits de la mer bénéficient toujours d'une bonne image de naturalité. Les ventes de produits frais ont toujours représenté une part importante du marché.

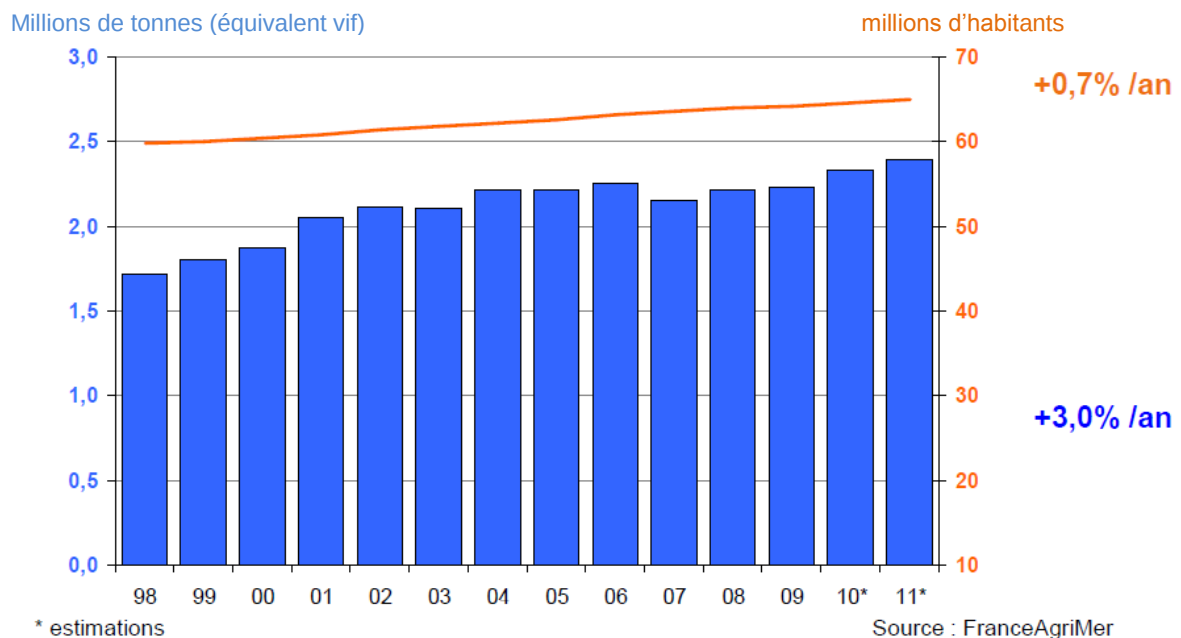


Figure 1 : Consommation apparente des produits de la mer en France de 1998 à 2011

Source France Agrimer (2012)

Depuis plusieurs décennies, une politique européenne est mise en place pour limiter les captures afin d'éviter la surexploitation des ressources marines. Les pêcheurs sont soumis à des quotas de pêche restrictifs. Parallèlement la demande en poisson augmente de 1% par an depuis plus de 10 ans (Figure 1, ci-dessus). En France, environ 40 kg de poisson en poids équivalent vif est consommé par habitant et par an. Pour répondre à cette demande croissante alors que les captures baissent, plus de 70% du poisson consommé en France est importé (Figure 2, page 17). Cette dépendance aux producteurs extérieurs entraîne une

méfiance des importateurs sur des produits sensibles sur lesquels ils ne peuvent pas maîtriser entièrement la chaîne d’approvisionnement et leurs qualités.

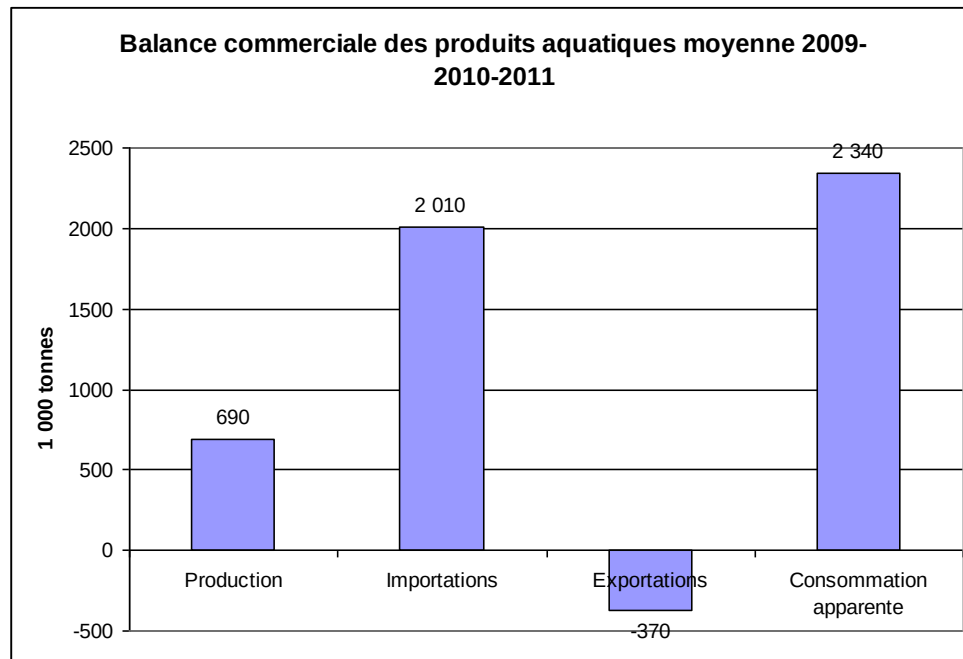


Figure 2 : Balance commerciale déficitaire des produits aquatiques

Source : Douanes françaises et Ministère de l’Ecologie du Développement Durable et de l’Energie Direction de la Pêche Maritimes et de l’Aquaculture, (2012)

Les produits frais sont mieux valorisés que les produits congelés (Bremner, (2002)). Leur valeur marchande est plus importante. Le marché des produits aquatiques s’internationalise. Les acteurs régionaux de la filière ont fait part de leurs inquiétudes face à certaines pratiques et soupçonnent certains industriels de vendre des filets de poisson décongelés pour des produits frais. Afin de se munir d’un outil de lutte contre cette fraude, la finalité du projet est de créer un test fiable et rapide (6-8h) pour différencier un filet de poisson frais d’un filet décongelé.

La qualité des produits alimentaires est jugée selon plusieurs critères : la salubrité, la qualité nutritionnelle, la fraîcheur, son prix... Depuis quelques années, l’authenticité est devenue un élément primordial pour déterminer la qualité d’un aliment : l’origine géographique du produit (IGP, AOP), l’origine sauvage ou d’élevage de certains poissons, l’espèce, l’alimentation, les OGM, la labellisation agriculture biologique ou label rouge... (Rodrigues *et al.*, (2012)). Parmi ces critères, émergent également les procédés de conservation utilisés

Introduction

non notifiés comme l'irradiation ou la congélation. L'Union Européenne dans son règlement n°178/2002 du 28 janvier 2002, stipule que toute étape de transformation doit être mentionnée pour éviter de causer une confusion dans l'esprit du consommateur.

L'authenticité des produits alimentaires est devenue un enjeu majeur dans la recherche de qualité des aliments. En 2013, la crise sur la viande de cheval dans les plats cuisinés a permis une prise de conscience des industriels. Un projet collaboratif soutenu par l'Union Européenne et concernant les pays présents dans l'espace Atlantique a pour objet de développer les connaissances sur les espèces de poisson pêchées dans cette région : c'est le projet européen Labelfish.

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le muscle de poisson, une matrice alimentaire particulière

Le tissu musculaire du poisson est composé de muscles striés. Les cellules musculaires sont entourées d'une gaine de collagène. Le muscle de poisson est différent du muscle des mammifères. Contrairement aux muscles de mammifères qui ont un système musculaire en faisceaux regroupés en fibrille qui forme des fibres musculaires, le muscle de poisson est composé de myotomes (Knorr et Meyer, (1975)). Ces derniers sont composés de cellules musculaires parallèles regroupées en unités. Ces unités sont séparées entre elles par du tissu conjonctif (myocommes). La quantité, la variété de forme et de longueur des myotomes dépendent de l'espèce du poisson. On constate également une variation de l'épaisseur du muscle entre la partie dorsale, la partie ventrale du poisson mais également entre la partie antérieure et postérieure du poisson (Luther *et al.*, (1995)). En règle générale, la partie la plus charnue s'étend de la partie dorsale médiane pour s'affiner sur la partie ventrale et caudale du poisson (Figure 3 ci-dessous).

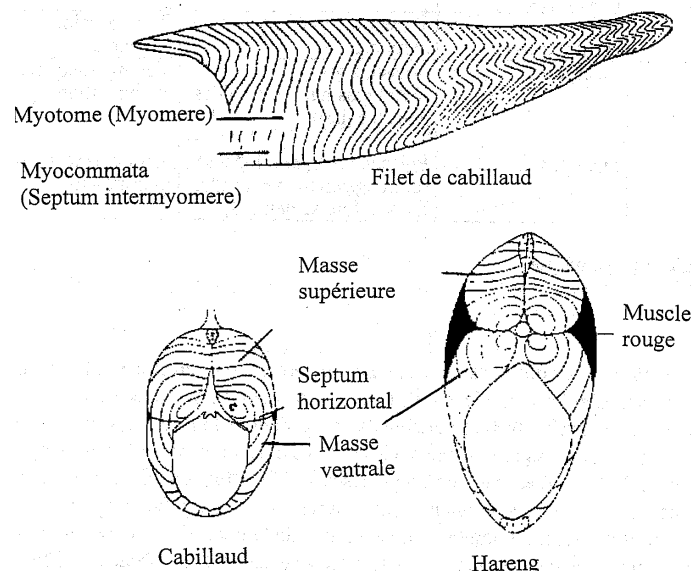


Figure 3 : Musculature du squelette du poisson

Source : Knorr et Meyer, (1975)

Les cellules musculaires demandent une grande consommation d'énergie. C'est pour cette raison que l'on retrouve beaucoup de mitochondries à l'intérieur du sarcoplasme de ces

cellules. Le système contractile de la cellule musculaire est principalement composé d'actine et de myosine. Ces protéines se trouvent en alternance au sein de la cellule ce qui donne un aspect strié à la cellule (Huss, (1988)), (Figure 4 ci-dessous).

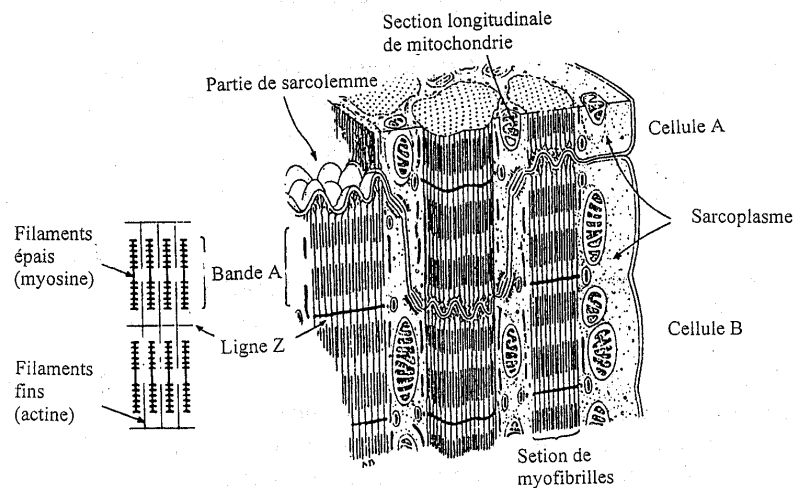


Figure 4 : Coupe de cellules musculaires mettant en évidence les myofibrilles

Source : Bell *et al.*, (1976))

Il y a deux types de muscles chez le poisson : le muscle blanc et le muscle brun. La variation de la proportion de ces deux types de muscles dépend du type de nage du poisson (Huriaux *et al.*, (1996)). Généralement, le muscle brun se trouve le long du flanc du poisson et sous sa peau, tandis que le muscle blanc formera la plus grande partie du muscle total du poisson (Love, (1970)). La couleur du muscle brun vient de la forte concentration en myoglobine, ce qui lui donne cette couleur rougeâtre.

Ces différences de couleur traduisent également une différence de métabolisme. Le métabolisme de base du muscle blanc vient de la production d'ATP à partir du glycogène. Le muscle brun est plus adapté à un métabolisme aérobie, il peut utiliser les lipides. Ce type de métabolisme musculaire est donc plus adapté à des cycles de contractions et de décontractions rapides, ce qui correspond plus au type de nage des poissons pélagiques (Goolish, (1990)). Le muscle blanc, lui, privilégie la voie métabolique anaérobie, il accumule ainsi l'acide lactique qui sera transformé dans le foie pour être métabolisé. Ce type de métabolisme correspond plus aux poissons démersaux tels que les gadiformes.

Ces différences physiologiques des muscles blancs et bruns font que le muscle blanc est parfaitement adapté aux efforts importants mais brefs alors que le muscle brun est prévu pour des mouvements continus mais moins intenses (Figure 5, ci-dessous).

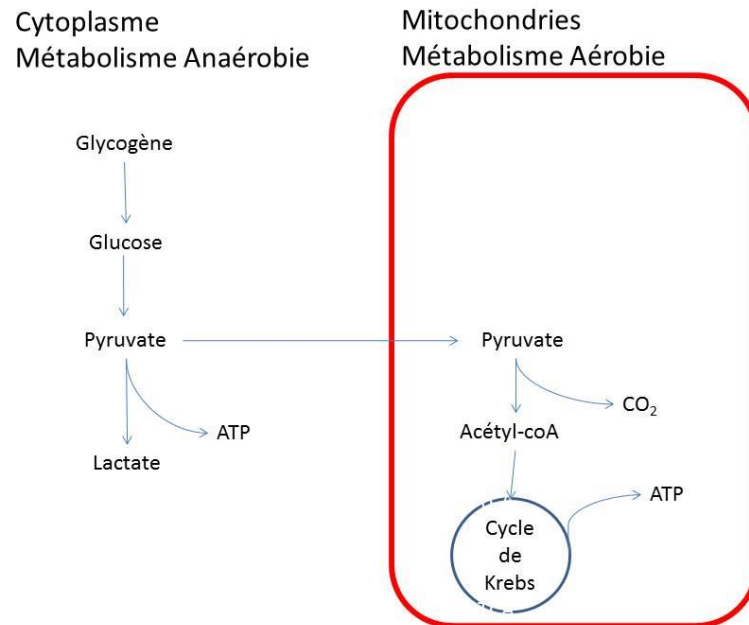


Figure 5 : Dégradation du glycogène par voie aérobie et anaérobie dans le muscle de poisson

D'après (Goolish, (1990))

• La contraction musculaire

La contraction musculaire est initiée par un stimulus nerveux. Cette stimulation nerveuse va libérer une quantité importante de calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique. Cette libération soudaine de calcium aussi appelée flash calcique va se fixer sur les troponines. Il y a trois types de troponines de type C, I et T (Francois *et al.*, (1997), Jackman *et al.*, (1998)). Le calcium libre va se lier à la troponine C. Cette protéine va changer de configuration spatiale, ce qui va libérer la tête de la myosine. Du fait de la forte interaction entre l'actine et la myosine, ces deux protéines vont glisser l'une contre l'autre et ainsi provoquer la contraction du faisceau musculaire. Afin de pouvoir provoquer une nouvelle contraction musculaire, une protéine sarcoplasmique va libérer le calcium afin que la troponine puisse retrouver sa configuration initiale et permettre ainsi la décontraction du muscle. C'est la parvalbumine qui joue ce rôle. Cette protéine est composée de deux sites de liaison au calcium. La structure tridimensionnelle de la parvalbumine est composée de six hélices α .

Les hélices sont regroupées en paires liées par une boucle. Ce motif protéique est appelé motif « EF hand » (Berg, (2002)) (voir Figure 22 page 58). Le calcium alors lié à la parvalbumine va être récupéré par la pompe ATPase qui se trouve sur la membrane du réticulum sarcoplasmique, correspondant au réticulum endoplasmique lisse des cellules musculaires. Lorsque la parvalbumine n'est pas liée au calcium, elle est liée au magnésium.

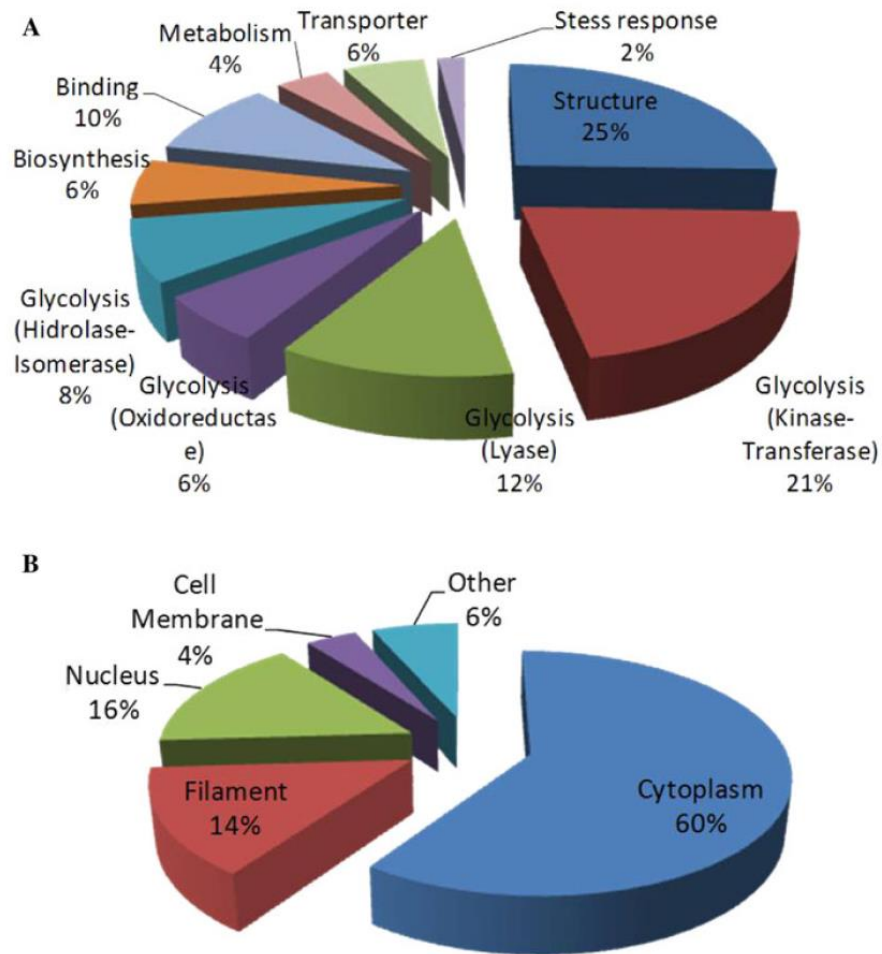
• *Les protéines du muscle du poisson*

Il y a trois grands groupes de protéines dans le muscle poisson :

- les protéines structurelles qui constituent entre 70 % et 80 % de la teneur totale en protéines ; ces protéines sont solubles dans des solutions salines relativement élevées. Elles constituent la structure du tissu musculaire : actine, myosine, tropomyosine et actomyosine (Huang et Ochiai, (2005)).
- les protéines sarcoplasmiques sont les protéines que l'on trouve naturellement dans le sarcoplasme à l'état solubilisé. Elles sont solubles à des forces ioniques faibles. On y retrouve les enzymes, la parvalbumine et d'autres protéines de la famille des globulines (Altinelataman *et al.*, (2009), Rehbein, (1995)).
- les protéines du tissu conjonctif sont le type de protéines le moins proportionnellement représentées par rapport aux protéines totales. Parmi elles, nous pouvons citer les collagènes (Karim et Bhat, (2009)).

Les différentes propriétés de ces protéines permettent de les séparer facilement (Rehbein et Karl, (1985)), en faisant varier la force ionique de la solution ou le pH.

Récemment, Terova *et al.*, (2013) ont étudié la répartition des protéines dans les cellules musculaires du bar (*Dicentrarchus labrax*). Cette étude a permis de déterminer leur répartition selon leur fonction et leur localisation (Figure 6 page 24). Quarante-neuf protéines ont été identifiées dans ces cellules du muscle blanc, dont plus de la moitié sont cytoplasmiques (60%). Les protéines structurelles et celles du tissu conjonctif sont réparties autrement dans cette étude. L'auteur distingue les protéines myofibrillaires, des membranaires et des nucléaires.



A : Répartition selon les fonctions des protéines

B : Répartition selon les localisations des protéines

Figure 6 : Répartitions des protéines dans le tissu musculaire du bar (*Dicentrarchus labrax*)
D'après Terova *et al.*, (2013)

a. L'évolution de la qualité du poisson

L'évolution de la fraîcheur des produits de la mer ainsi que leur dégradation est la résultante de plusieurs mécanismes qui se mettent en place en même temps. A la mort du poisson, le premier mécanisme à se mettre en place est l'apparition de la *rigor mortis*. La seconde étape est la résolution de la *rigor mortis*. Viennent ensuite l'autolyse et enfin la dégradation microbologique (Huss, (1999)). Les grandes étapes de l'évolution de la fraîcheur du poisson sont présentées dans la Figure 7 page25. Les étapes se chevauchent et certaines d'entre elles peuvent être réduites ou allongées en fonction des conditions de conservation.

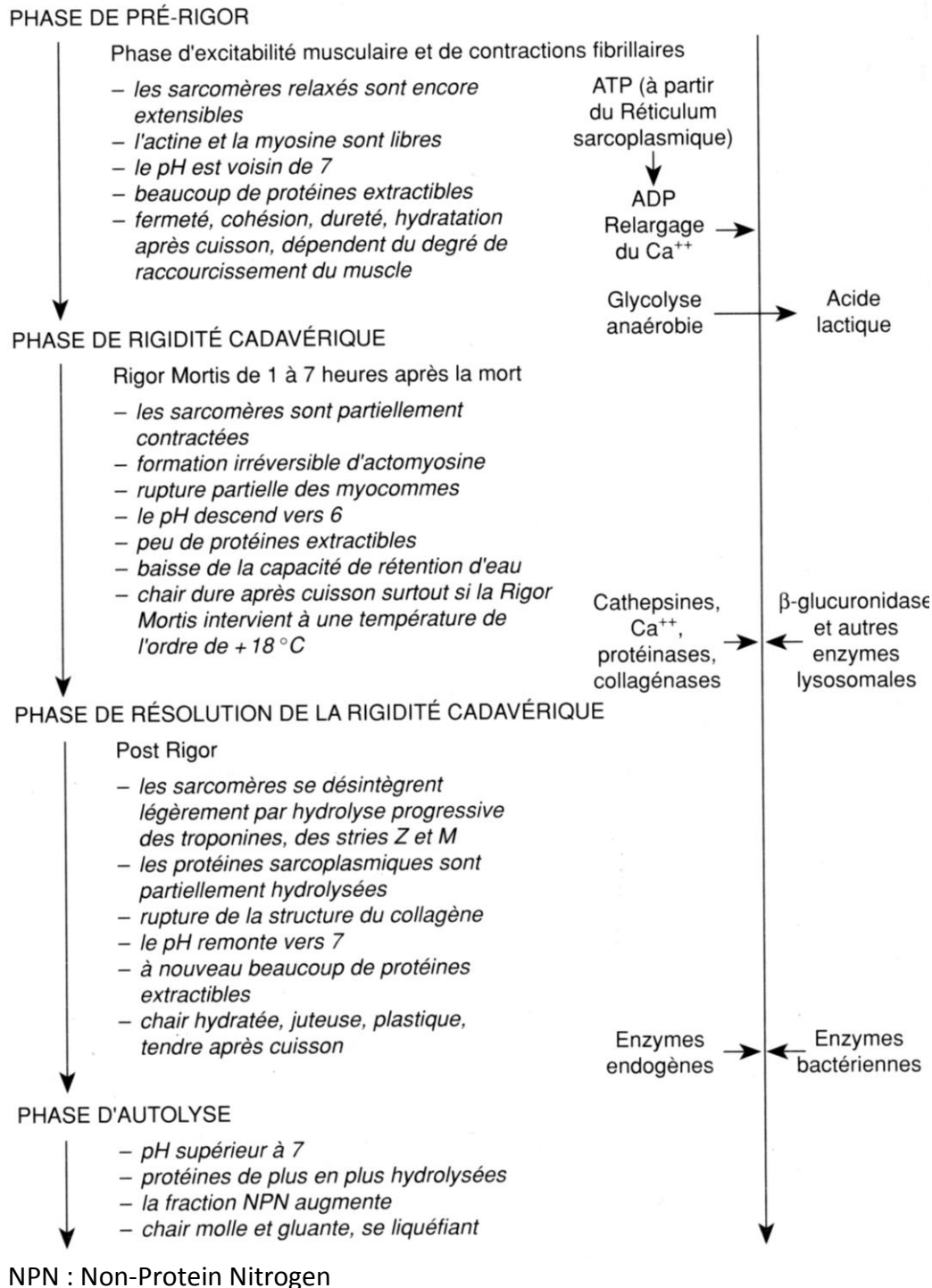


Figure 7 : Evolution du muscle de poisson après la mort de l'animal
D'après Linden et Lorient, (1994)

• L'apparition de la rigor mortis

La *rigor mortis* est l'état raidi dans lequel se trouve le corps d'un poisson. Cet état peut être atteint dès la mort du poisson. Les muscles se contractent totalement, sans pouvoir se

relaxer. En effet l'état de relaxation est consommatrice d'ATP. A la mort du poisson et à l'épuisement de l'ATP, cette relaxation n'est plus possible. L'établissement et la résolution de la *rigor mortis* peuvent durer plus ou moins longtemps selon la température, l'état de fatigue du poisson au moment de sa mort, l'espèce du poisson (Misimi *et al.*, (2008)). En élevage, le mode d'abattage permet de mieux maîtriser cette étape.

• *L'altération autolytique*

La résolution de la *rigor mortis* et l'attendrissement de la chair proviennent de l'activité autolytique qui se met en place à la mort du poisson. En effet, des phénomènes d'apoptose et de nécrose se mettent en place. Cela a pour effet de libérer des cathepsines et des calpaïnes, qui sont de puissantes protéases (Herrera-Mendez *et al.*, (2006), Chéret *et al.*, (2007)). Cette autolyse va également permettre un développement de la flore microbienne et l'altération du tissu musculaire va faciliter sa propagation.

On assiste à une variation du pH, ce qui affecte les propriétés des protéines. Certaines d'entre elles sont partiellement dénaturées. Les collagénases ont également un effet sur la dégradation autolytique du muscle de poisson (Connell, (1995)). Dès les étapes autolytiques, la flore microbienne dispose de plus de nutriments disponibles pour se développer. Elle se fait alors plus invasive.

b. L'analyse des critères d'altération

Dans une revue de Martinez, (1997) les différents critères de qualité correspondant à un produit aquatique ont été représentés dans un diagramme (Figure 8 page 27). Le principal critère de qualité d'un produit de la mer peut être évalué par sa fraîcheur.

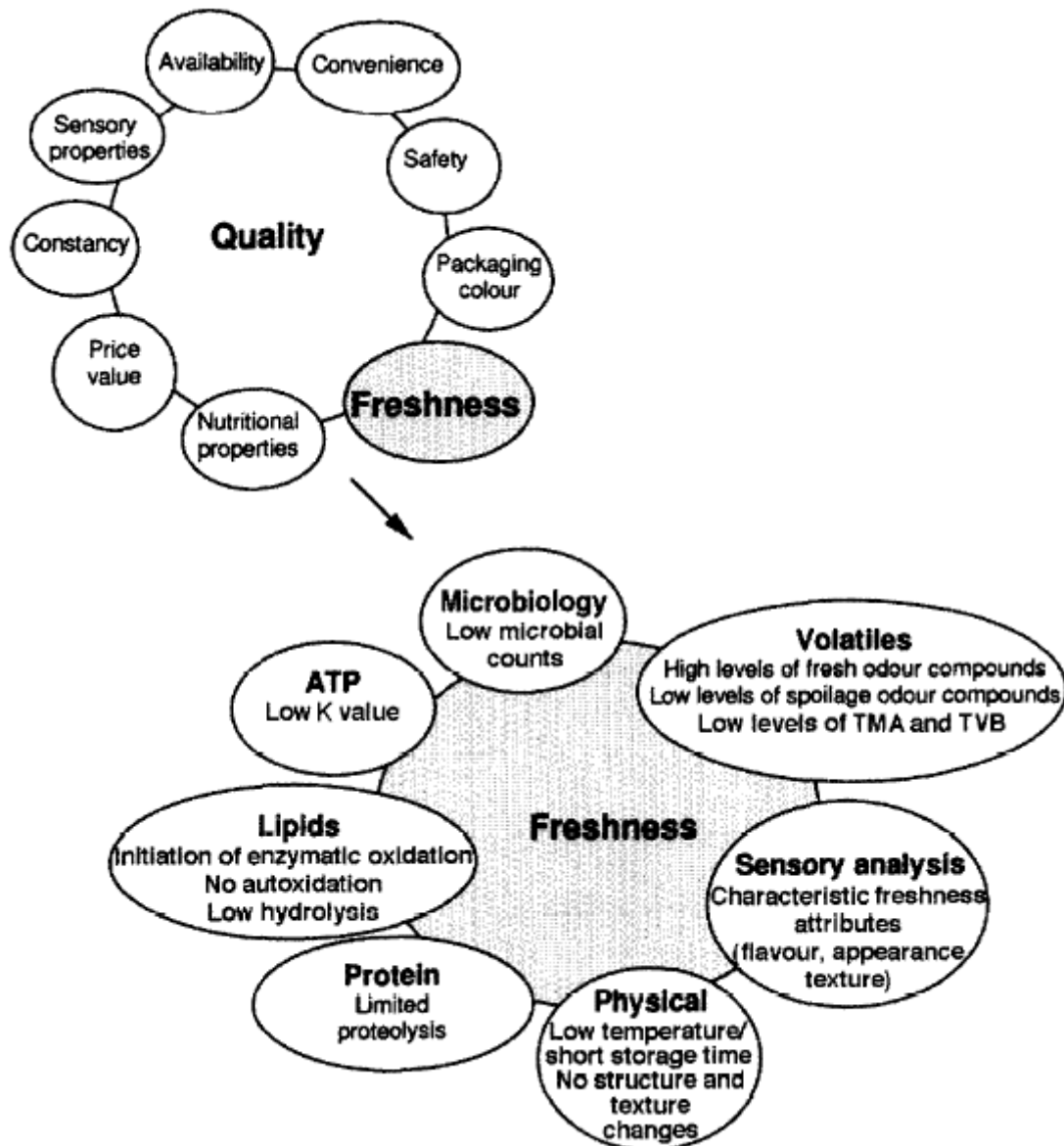


Figure 8 : Relation entre qualité et fraîcheur.

Le grand cercle reprend les facteurs qui vont contribuer à la qualité. Le petit cercle détaille les différentes approches pour évaluer la fraîcheur

Source : (Martinez, (1997))

Un ensemble de critères de fraîcheur a pu être étudié et évalué mais la seule méthode qui fasse référence à ce jour est l'analyse des critères sensoriels. En complément, les critères pour estimer la fraîcheur les plus utilisés à l'heure actuelle sont les critères microbiologiques (flore totale, flore contaminante) et la teneur en composés volatils. L'odeur dégagée par le poisson est un bon indicateur de l'état de fraîcheur du poisson.

Depuis très longtemps, on évalue la qualité du poisson par ses caractéristiques sensorielles (Etienne, (1998)). Depuis les années 1970, l'analyse sensorielle est utilisée pour évaluer la fraîcheur du poisson. Plus récemment, un référentiel normé pour analyser la fraîcheur du poisson (*norme AFNOR V-09-105*) a été utilisé pour évaluer la fraîcheur du poisson en utilisant une méthode QIM (Quality Index Method). Les caractéristiques analysées sont l'odeur, la couleur, la texture, la fermeté et l'élasticité de la chair. Cette méthode a fait ses preuves depuis toutes ces années mais reste soumise à la subjectivité des juges. Il faut donc analyser plusieurs spécimens d'un même lot. Cette méthode est très simple à mettre à œuvre. Une application pour « smartphone » a été créée pour définir rapidement l'état de fraîcheur d'un poisson entier. Plusieurs espèces ont été introduites dans cette application « How fresh is your fish ? », Figure 9, ci-dessous.



**Figure 9 : Flash code permettant de télécharger l'application « How Fresh is your Fish »
Une méthode QIM pour évaluer la fraîcheur du poisson**

Source : Nofima 2010

La recherche de critères de fraîcheur est plus compliquée pour la filière de la pêche par rapport aux autres filières, comme la filière de la viande. Les ressources sont issues de diverses espèces de différentes origines et les procédés de capture varient beaucoup. La recherche sur les produits de la mer s'est résolue à trouver d'autres indices de fraîcheur objectifs et plus pertinents d'un point de vue scientifique.

Des tests normés pour la quantification et le dénombrement de la flore totale des produits de la mer ont été créés. L'analyse des composés volatils qui se dégagent du poisson a également été étudiée. Cet outil semble intéressant car il s'intéresse aux caractéristiques odorantes du filet de poisson tout comme dans l'analyse sensorielle (Leduc *et al.*, (2012b)).

Des essais ont été réalisés pour créer un nez électronique capable d'analyser la fraîcheur du poisson (Olafsdóttir *et al.*, (1997)) mais les sondes de ces machines ne sont pas complètement concluantes (projet européen MUSTEC 2004, Olafsdottir *et al.*, (2004)). L'odeur globale dégagée par le poisson est pourtant un bon outil et l'analyse des composés volatils qui caractérisent l'odeur peut également servir de marqueur de fraîcheur Duflos *et al.*, (2010).

Les deux principaux composés volatils qui avaient alors été analysés étaient l'Azote Basique Volatil Total et la TriMéthylAmine (ABVT et TMA). Aujourd'hui, ces techniques sont discutées mais restent un outil intéressant pour analyser la fraîcheur du poisson.

L'indice de dégradation de l'ATP a également été étudié car après la mort du poisson, l'ATP et l'ADP se dégradent en inosine, puis en hypoxanthine. Le processus de dégradation de l'ATP a fait l'objet de nombreux travaux de recherche, qui ont fait suite à ceux de Saito *et al.*, (1959). Ces derniers auteurs ont proposé le concept de la valeur K, fondé sur la dégradation post-mortem des nucléotides, en particulier de l'ATP, nucléotide cellulaire largement majoritaire. Le taux de dégradation de l'ATP exprimé par la valeur ou le facteur K est représenté par la formule de la Figure 10 : Formule de calcul en pourcentage du facteur K, ci-dessous.

Chez le poisson, le processus de rigidité cadavérique (*rigor mortis*) se déclenche (Hattula, (1997), Nielsen, (1995)) entre 15 et 30 heures après la mort, selon les espèces. Par ailleurs, la relation entre le développement de la *rigor mortis* et la dégradation de l'ATP cellulaire a été établie par Korhonen *et al.*, (1990).

Plus le facteur K est faible, plus le poisson est frais. L'analyse de ce facteur peut servir pour le poisson frais, le poisson congelé, fumé ou conditionné sous atmosphère protectrice mais ce facteur dépend également du mode d'abattage et des conditions d'entreposage et de manipulation, des espèces étudiées

$$K\% = \frac{[Ino] + [Hx]}{[ATP] + [ADP] + [AMP] + [IMP] + [Ino] + [Hx]} \times 100$$

Ino : Inosine, Hx Hypoxanthine, ATP Adénosine Tri Phosphate, ADP : Adénosine Di Phosphate, AMP : Adénosine Mono Phosphate, IMP : Inosine Mono Phosphate

Figure 10 : Formule de calcul en pourcentage du facteur K

- **Les critères de fraîcheur : flore totale, ABVT, TMA et, Amines biogènes**

Le premier des critères est le dénombrement de la flore totale. Ce critère doit être complété par un dénombrement de la flore contaminante, généralement les coliformes à 37°C car ce sont des micro-organismes qui colonisent le poisson après sa transformation. Ces bactéries sont amenées par le milieu, les manipulateurs... Ces flores endogène et exogène progressent avec le temps et leur croissance est plus rapide avec l'augmentation de la température.

On considère qu'un filet de poisson est frais lorsqu'il a subi très peu d'altération microbienne. Quelques éléments permettent de mesurer l'importance de cette contamination (Castro *et al.*, (2006), Malle *et al.*, (1986)). L'Azote Basique Volatil Total est composé de divers produits provenant de la dégradation microbienne mais exploité seul, ce critère ne correspond pas à grand-chose. La Tri Méthyle Amine TMA est l'un de ces produits qui composent l'ABVT. On calcule « pm » la proportion de TMA par rapport à l'ABVT, ce rapport est alors significatif (Tableau I ci-dessous).

Tableau I : Echelle d'acceptabilité du taux d'ABVT et du rapport TMA/ABVT

Source : Ofimer 2006

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

On note que du formaldéhyde apparaît dans le poisson congelé. Il se forme à partir de l'oxyde de triméthyle amine (Bechmann, (1996)). Cette apparition est due à plusieurs mécanismes biochimiques et à l'activité de certaines enzymes microbiologiques.

Le dosage de l'ABVT et de la TMA pour évaluer la qualité reste une méthode critiquée par Castro *et al.*, (2006) car elle correspond à un état d'altération microbienne plus qu'à un état de fraîcheur du poisson. Il en va de même pour le dosage des amines biogènes : histamine, putrescine, cadavérine, spermine, spermidine (Dapkevicius *et al.*, (2000)). Les taux de ces amines biogènes dépendent beaucoup de l'espèce de poisson analysée. Le thon dégage beaucoup d'histamine lors de sa dégradation, ce qui peut avoir des conséquences sur la salubrité du produit car un aliment riche en histamines peut causer une réaction allergique violente (Simons *et al.*, (2007)).

Ces critères sont à considérer avec discernement car ils dépendent de l'espèce de poisson, de son état physiologique avant capture, de son mode de conservation *etc.*

2. Le procédé de congélation

L'intérêt du procédé de congélation est qu'il combine deux atouts principaux : l'activité de l'eau est diminuée et la diminution en température ralentit la majorité des réactions chimiques possibles (loi d'Arrhenius). Les aliments peuvent alors être conservés très longtemps. Cependant, le rancissement des acides gras insaturés riches dans le poisson s'opère même à -20°C (Marvillet, (2001), Spinnler, (2008)). Des travaux récents montrent que l'eau à l'état solide garde une certaine mobilité mais que sa viscosité est très importante. Pour éviter que la glace ne soit mobile, il faut passer à l'état vitreux de la glace. On parle alors de vitrification.

A -55°C, tous les composés du tissu musculaire du poisson sont congelés (Venugopal, (2006)). Le point de congélation se situe entre -1 et -2,5°C. Le point de congélation totale dépend de l'espèce. Il oscille entre -11 à -15°C pour le cabillaud (*Gadus morhua*) jusqu'à -72°C pour le thon (*Thunnus albacares*) (Jensen *et al.*, (2003)). La congélation doit avoir lieu le plus tôt possible après l'abattage du poisson mais elle ne peut pas rendre un aliment plus sain qu'il n'est (Spinnler, (2008)).

La congélation est obtenue par transfert de chaleur. Dans un premier temps, la température est abaissée jusqu'à la température de transition du produit. Dans un second temps, il se produit un changement d'état qui demande un apport d'énergie (enthalpie) important. Dans un troisième temps, une nouvelle baisse de la température permet d'obtenir un produit plus stable. Généralement, les produits congelés sont conservés à -20°C, au-delà de la température de transition des produits aquatiques. Pour cela, deux paramètres sont primordiaux : la température transitoire et le temps mis pour atteindre la température souhaitée.

D'un point de vue du génie des procédés, il y a deux grands types de procédés de congélation pour le poisson. Hui *et al.*, (2004) décrivent ces deux procédés de congélation convective ou conductive de la façon suivante :

- Le procédé de congélation convective :

On utilise en général l'air refroidi pour échanger la chaleur avec le produit. De la saumure ou un autre fluide cryogénique peuvent être utilisés. La vitesse de renouvellement du fluide et sa température sont les deux variables à maîtriser pour avoir une bonne congélation. Cette

méthode est la plus adaptée pour les produits IQF (Individual Quick Freezing). Une congélation convective peut également être réalisée dans des tunnels de surgélation.

- Le procédé congélation par conductivité, la congélation par contact

Cette méthode est plus utilisée pour des congélations en masse, comme pour les blocs de filets de poisson servant à faire des portions de poisson (exemple : bâtonnets de poisson pané). La congélation est réalisée par lot. Le produit mis en forme est placé dans un moule réfrigéré à l'intérieur duquel un liquide réfrigérant circule.

La congélation est une bonne méthode de conservation des produits de la mer. Cette méthode de conservation permet de bien préserver la qualité organoleptique des filets de poisson tout en réduisant la croissance microbienne. Cette technique permet également de tuer les parasites, nématodes, qui peuvent être présents dans la chair du poisson (Tejada *et al.*, (2006)). La congélation est d'ailleurs obligatoire d'après le 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, lorsque le poisson est consommé cru (sushi, tartare).

La congélation présente de nombreux avantages pour conserver les aliments. Cependant, elle altère le tissu musculaire et les cellules (Ayala *et al.*, (2005), Tironi *et al.*, (2007), Tironi *et al.*, (2010)).

Il existe des modes de conservation hybride se situant entre la congélation et la conservation à l'état frais dénommés « chilling » ou « super chilling ». Nous ne parlerons pas de ces cas particuliers dans ce document pour les raisons suivantes : un filet de poisson peut être partiellement surgelé à des températures négatives sans que l'eau du filet ne soit entièrement solidifiée. La forte concentration en sels dans le fluide cryogénique permet d'appliquer cette technique (Duun et Rustad, (2007)). Le filet n'est ni congelé (pas de glace au cœur du produit), ni frais (des cristaux peuvent se former en surface (Erikson *et al.*, (2011)). Cette technique cause moins de dégâts sur la chair du poisson mais sa qualité reste inférieure à celle d'un filet frais (Bahuaud *et al.*, (2008)). De plus il n'y pas de cadre législatif pour ces produits qui ne sont pas considérés comme congelés/décongelés et qui ne sont plus entièrement frais non plus.

3. Modifications sensorielles du poisson décongelé

Le principal défaut des produits décongelés est une perte des qualités organoleptiques du produit.

D'après une étude menée sur les consommateurs de poisson (Tableau II, ci-dessous), les produits congelés ont les meilleures notes de perception de la qualité par rapport aux autres modes de conservation longue durée tels que l'appertisation ou la lyophilisation. Les notes données restent très acceptables. 100 est la note donnée aux produits frais. Les notes données aux produits conservés ont une note relative par rapport aux produits frais.

Tableau II : Comparaison des avantages des différentes techniques de préservation des aliments

D'après Pruthi, (1999).

Critères de qualité	Aliments congelés	Aliments en conserve	Aliments lyophilisés
Fraîcheur	71	14	5
Goût	56	30	7
Apparence	62	28	3
Valeur nutritive	51	20	11
Rapport qualité/prix	47	29	10
Praticité	40	52	3

Une présentation des causes et effets sur la chair de poisson est dressée dans le Tableau III ci-dessous. Ces modifications expliquent la perte de qualité apparente des filets de poissons décongelés par rapport aux filets n'ayant pas subi ce procédé de conservation (Østli *et al.*, (2013)).

Tableau III : Raisons de la perte de qualité des produits de la pêche pendant leur stockage à des températures négatives

D'après Rahman, (2007)

Paramètres, causes	Effets, conséquences
Agrégation des protéines, dénaturation des protéines	Texture dure et spongieuse
Décomposition de l'OTMA en DMA et formaldéhyde	Texture dure et spongieuse, perte de saveur et déshydratation
Oxydation des lipides	Changement de saveur

Perte de l'activité des ATP-ases calcium dépendantes	Texture cotonneuse et sèche en bouche
Perte des composés odorants et gustatifs	Affadissement des saveurs
Développement des composés odorants et gustatifs dû à la dégradation	Perte des saveurs naturelles
Concentration des minéraux	Oxydation des lipides et dégradation des protéines, variation du pH et des forces ioniques
Formation de cristaux de glace	Rupture des cellules, libération des constituants cellulaires
Changements sensoriels	Perte de valeur commerciale
Changements nutritionnels	Lessivage des nutriments et perte des valeurs nutritionnelles
Perte des propriétés fonctionnelles	Diminution de la capacité de rétention d'eau et propriété émulsifiante

a. La modification de l'ultrastructure et des molécules, composant le muscle de poisson

La meilleure manière d'étudier les modifications tissulaires d'un filet de poisson après congélation est d'en faire une étude histologique (Bozzetta *et al.*, (2012)). L'utilisation de la microscopie permet de visualiser les modifications. C'est ce que nous pouvons observer à travers deux illustrations (Figure 11 page 35 et Figure 12 page 36).

Les modifications structurelles du muscle du poisson après un choc congélation/décongélation sont dues aux types de congélation, à la température de stockage et à la durée du stockage (Alizadeh *et al.*, (2007)). Des modifications ont été observées sur le saumon (*Salmo salar*) après différents types de congélation et après différentes durées de congélation (Figure 11). De même, des modifications ont été observées sur le bar (*Dicentrarchus labrax*) par microscopie électronique à balayage. Cette technique permet d'avoir une plus grande définition de l'image avec un effet de relief (Figure 12).

Etude bibliographique

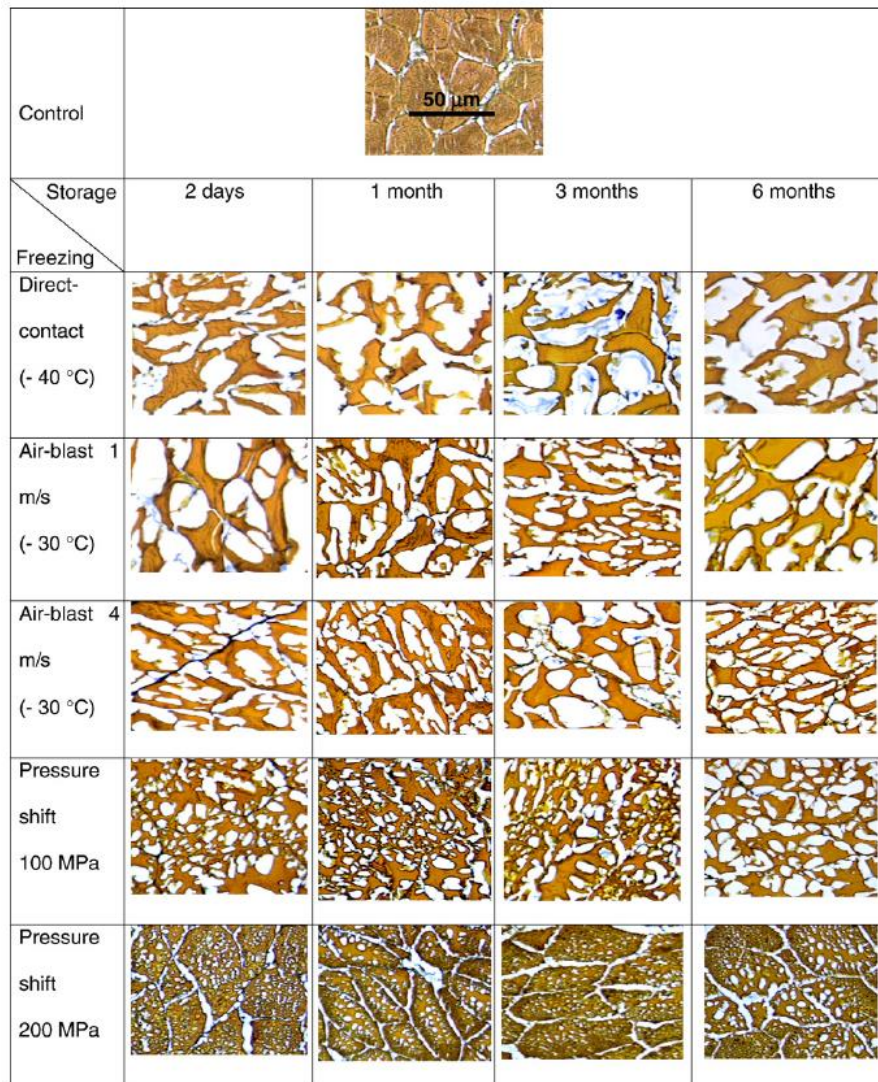


Figure 11 : Photos par microscopie du tissu du saumon d'Atlantique, frais (contrôle) et décongelé

Source : Alizadeh *et al.*, (2007)

Dans cette étude menée par Alizadeh *et al.*, (2007)) on constate que c'est le procédé de congélation qui est plus influent que le procédé de décongélation sur la qualité du produit décongelé. Les paramètres affectés par la congélation/décongélation sont la perte d'eau, la texture et la couleur du saumon (*Salmo salar*). La congélation en surpression limite la perte d'eau et le changement de couleur, mais la texture reste dure. Les auteurs observent bien des différences significatives sur une même espèce selon les procédés de congélation et décongélation utilisés. La durée de conservation du produit congelé semble avoir également un effet sur le produit après décongélation.

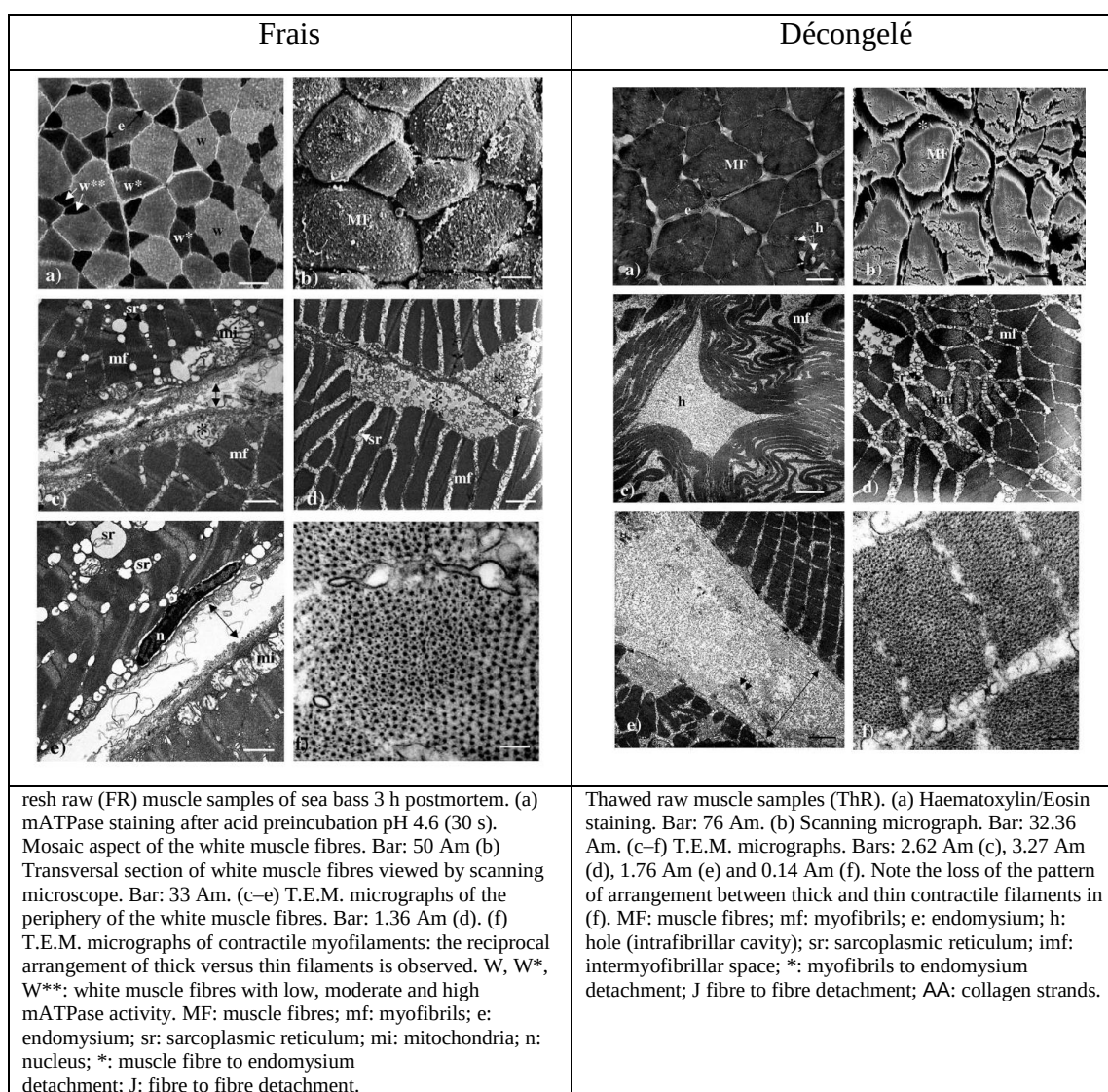
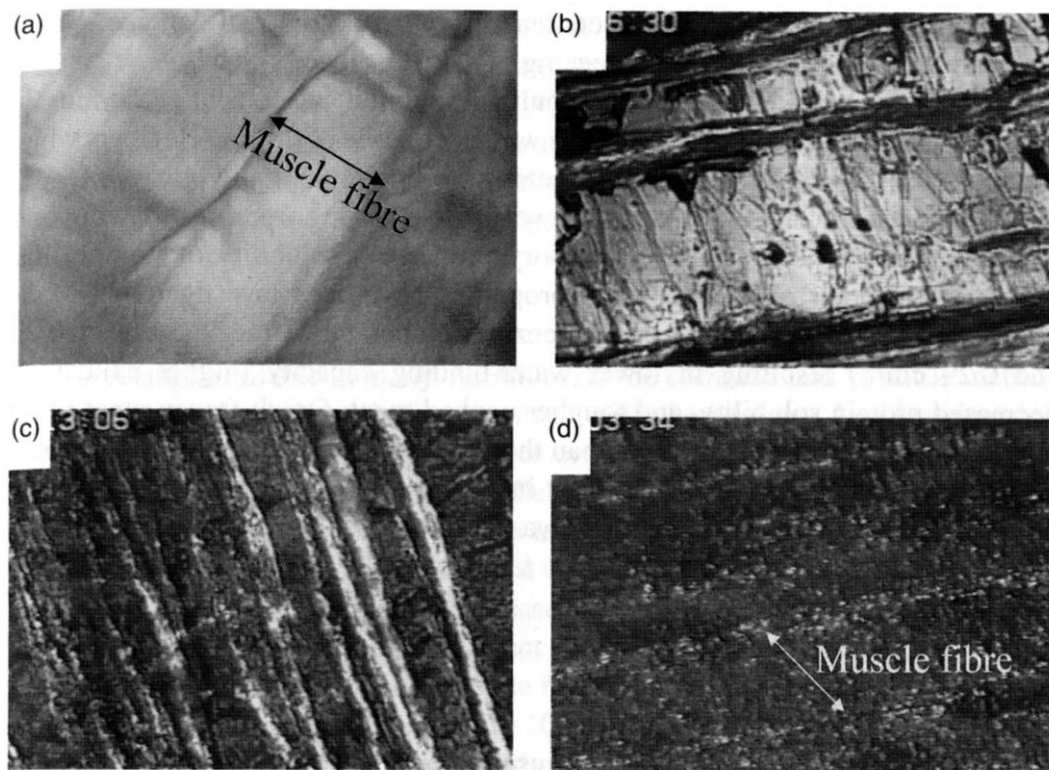


Figure 12 : Photos de microscopie montrant l'altération de la structure du tissu musculaire de bar (*D. labrax*)

Source : Ayala *et al.*, (2005)

La congélation/ décongélation altère l'intégrité cellulaire et les membranes sarcoplasmiques (Ayala *et al.*, (2005)). La formation des cristaux de glace prend place dans le milieu extracellulaire. La nucléation des cristaux de glace est plus lente lorsque la descente en température est douce (Tironi *et al.*, (2007)). Les cristaux sont plus gros et causent d'importantes déformations cellulaires et une rétraction des cellules qui laisse un espace intercellulaire plus important. Le sarcoplasme a tendance à gonfler et à faire éclater les cellules (Tironi *et al.*, (2007), Tironi *et al.*, (2010)).

Les mêmes phénomènes ont été rapportés sur le bar (*Dicentrarchus labrax*) (Ayala *et al.*, (2005)), la sardine (*Sardina pilchardus*) (Aubourg *et al.*, (1998), Kilinc et Cakli, (2004)), la crevette (*Penaeus monodon*) (Boonsumrej *et al.*, (2007)) et le saumon (*Salmo salar*) (Alizadeh *et al.*, (2007)).



- (a) fibre musculaire non congelée,
- (b) fibre congelée dans un congélateur commun (large cristaux de glace, en blanc),
- (c) échantillon surgelé dans un surgélateur industriel (plus petits cristaux et mieux répartis),
- (d) échantillon congelé par cryogénie (les cristaux sont confondus avec la fibre musculaire)

Figure 13 : Photographies par microscopie électronique des fibres musculaires de cabillaud (*Gadus morhua*)

Source : Venugopal, (2006)

Dans une revue de cryologie, Mazur, (2009) donne des explications sur les modifications cellulaires s'opérant lors d'un choc congélation/décongélation. L'altération des cellules et des compartiments cellulaires est due à la différence de composition des contenus de ces compartiments. Les concentrations en sels donnent des points de congélation différents aux compartiments cellulaires (Acker *et al.*, (2001)). Les contenus ont également des points de fusion différents. Les membranes ne peuvent pas résister à de telles différences de forces ioniques. C'est donc par choc osmotique que ces compartiments se détruisent (Mazur, (1963)). L'importance des dégâts causés par la congélation est également le résultat de la

succession d'un procédé de congélation suivi d'un procédé de décongélation. Comme nous le montrent la Figure 11 page 35 et la Figure 13 page 37, les baisses rapides en température permettent la formation de plus petits cristaux moins contraignants pour les membranes.

4. Les modifications macromoléculaires dues à la congélation/décongélation

La congélation/décongélation entraîne des modifications des macromolécules que l'on retrouve dans le muscle de poisson. Ces altérations entraînent une perte des qualités organoleptiques et nutritionnelles du poisson comme cela a été démontré par Aubourg *et al.*, (2013).

a. Les protéines

Les protéines subissent de nombreuses modifications après un choc congélation/décongélation. Certaines protéines perdent leurs propriétés gélifiantes (Xia *et al.*, (2010)), d'autres s'oxydent (Baron *et al.*, (2007)). Les forces ioniques mises en place lors de la congélation/décongélation dénaturent de façon irréversible certaines protéines (Pan *et al.*, (2004)). Ces protéines s'agrègent et précipitent lors de la décongélation.

b. L'ADN

La congélation/décongélation cause la dégradation de l'ADN du sperme de bar (Zilli *et al.*, (2003)). La dégradation de l'ADN est un problème récurrent pour la préservation des semences d'animaux préservées par la congélation. On peut mesurer le taux de dégradation de l'ADN en réalisant des tests de la comète que nous expliquerons plus tard dans la présentation des méthodes de différenciation frais/décongelé.

Tous ces effets sont plus ou moins importants en fonction de la température de conservation, du type de congélation, du type de décongélation, de l'espèce de poisson et de l'état de fraîcheur avant la congélation (Benjakul Soottawat et Thongkaew Chutima, (2003), Jensen *et al.*, (2003), Rouillé *et al.*, (2002)).

5. Mode de différenciation entre filet de poisson frais et filet de poisson décongelé

Avec l'apparition sur les marchés de produits décongelés vendus au rayon frais au milieu des années 2000, les suspicions de fraude sont devenues de plus en plus fréquentes. L'intérêt des industriels et des chercheurs, pour trouver une méthode permettant de différencier les produits frais des produits congelés/décongelés, est devenu un objectif essentiel pour assurer la qualité des produits.

Plusieurs méthodes ont été mises au point sur la viande pour différencier les produits carnés frais de ceux ayant subi une congélation (Ballin et Lametsch, (2008)). Ces travaux sur la viande de bœuf, porc ou poulet ont permis de faire avancer la recherche dans ce domaine. Les adaptations sur le poisson se font de plus en plus fréquentes.

a. L'analyse physiologique

Les premières méthodes qui ont permis de différencier les produits de la mer frais des produits de la mer décongelés sont des méthodes d'analyse sensorielle. Ces méthodes sont simples à mettre en place, pratiques et rapides. Ces méthodes permettent de comparer un poisson frais d'un poisson décongelé lorsqu'il est entier par l'étude de son cristallin (Yoshioka et Kitamikado, (1983)). La congélation/décongélation entraîne une opacification du cristallin. Après sa première transformation en filets, les spécialistes peuvent encore identifier les filets provenant de poissons décongelés. Mais lorsqu'il s'agit d'un filet sans peau, la tâche est beaucoup plus difficile (Parisi *et al.*, (2002)). C'est après la cuisson du produit que l'on se rend compte que le produit est un produit décongelé (Venugopal, (2006)) car la chair rend plus d'eau lors de sa cuisson. Les principaux critères utilisés sont la couleur, la capacité de rétention d'eau, la jutosité et la masticabilité de la chair.

b. L'analyse enzymatique

Un état de l'art a été réalisé par Duflos *et al.*, (2002). Les méthodes les plus probantes alors existantes pour différencier filet de poisson frais et filet décongelé ont été comparées. Trois espèces de poissons ont été étudiées : le maquereau (*Scomber scombrus*), la plie (*Pleuronectes platessa*) et le merlan (*Merlangus merlangus*).

Plusieurs méthodes ont été testées dont des critères physiques telle que la mesure de l'impédance du filet avec un torrymètre (Kim *et al.*, (1987), Rehbein et Aust, (1980)). La résistivité du tissu musculaire diminue après une congélation/ décongélation car les ions normalement compartimentés dans les structures cellulaires et subcellulaires peuvent alors se déplacer et conduire le courant électrique.

Enfin des méthodes biochimiques ont été utilisées. L'activité de différentes enzymes est dosée dans l'exsudat du filet :

- une enzyme lysosomique, l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) (Nilsson et Ekstrand, (1993), Rehbein, (1992))
- une enzyme des cellules sanguines, le β -N-acétylglucosaminidase (EC 3.2.1.30), (Kitamikado *et al.*, (1990))
- une enzyme mitochondriale, le β -Hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase (EC 1.1.1.35), (Fernandez, (1999), Pavlov *et al.*, (1994)).

Ces enzymes proviennent des différents compartiments lysés (Figure 14 page 40) après un cycle de congélation/décongélation. Cette étude recommande finalement de doser l'activité de l' α -glucosidase. C'est cette enzyme qui permet le mieux d'identifier un filet de poisson ayant subi une congélation. Néanmoins, cette analyse doit toujours être couplée à une analyse de la fraîcheur sur critères microbiologiques. Le dosage de cette enzyme a été repris par d'autres équipes de recherche, (Benjakul Sootawat et Thongkaew Chutima, (2003)) qui valident cette méthode. Nous retrouvons la localisation de ces enzymes dans la Figure 14.

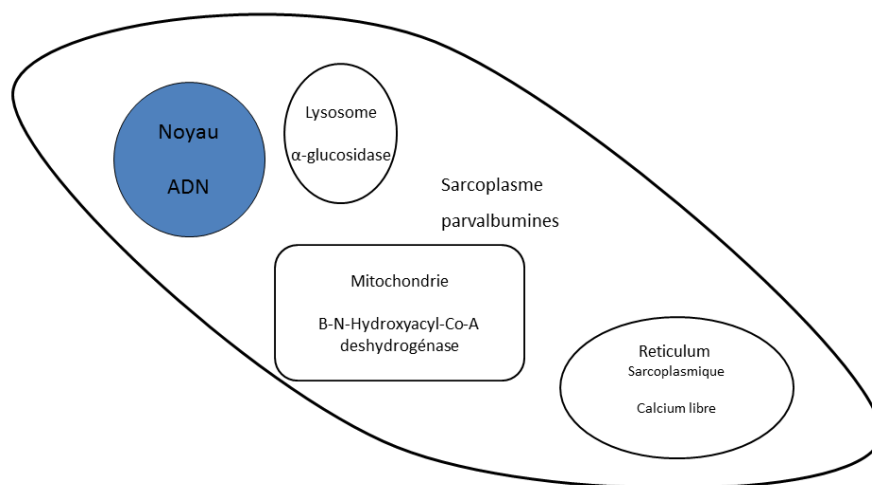


Figure 14 : Localisation subcellulaire des marqueurs biochimiques (protéines enzymatiques ou non, ADN et ions) utilisés pour la mesure de l'altération du tissu musculaire du muscle blanc du poisson

Depuis ces dix dernières années, de nouvelles techniques permettent d'identifier les viandes ayant subi une congélation. Ballin et Lametsch, (2008) reprennent les techniques plus récentes permettant cette identification. L'étude s'intéresse à trois types de viande : le bœuf (*Bos taurus*), le porc (*Sus scrofa*) et le poulet (*Gallus gallus*). Le dosage d'enzymes intracellulaires dans les exsudats y est présenté mais cette technique a ces limites. Les enzymes sont des protéines susceptibles d'être dégradées par les protéases libérées. Ces enzymes peuvent également être inactivées par un stockage prolongé à des températures nettement inférieures à 12°C. Si ces méthodes enzymatiques donnent des résultats corrects, il faut rester prudent quant à leur efficacité quand seuls ces critères sont utilisés. Il vaut mieux baser la décision sur des résultats complémentaires provenant de différentes méthodes. D'autres techniques sont présentées pour permettre une identification des produits décongelés.

c. Les méthodes de spectroscopie

La baisse de la température de congélation jusqu'au point de congélation entraîne des modifications physiques du tissu musculaire (Schubring *et al.*, (2003), Tironi *et al.*, (2007)). La propriété de certains composants à retenir l'eau peut changer et la distribution de l'eau dans le tissu musculaire change. Le tissu a alors une capacité de rétention d'eau (WHC) diminuée. Ces changements peuvent être observés par spectroscopie UV, infrarouge, fluorescence, RMN et également d'impédance. Nous développerons ces techniques dans cette partie.

L'un des avantages des techniques de spectrométrie est que la méthode est non invasive. L'échantillon analysé par spectrométrie n'a pas besoin d'être modifié avant son traitement. On peut alors imaginer faire ce genre de contrôles directement sur la ligne de fabrication. Ces méthodes sont déjà très utilisées en recherche biomédicale et en pharmaceutique. Les différentes techniques déjà mises au point et qui ont déjà fait leurs preuves, peuvent être adaptées à des produits alimentaires. Ces méthodes permettent d'étudier une réduction de la capacité de rétention d'eau de l'aliment ou la dénaturation des molécules voire un changement d'aspect ou de couleur (Damez et Clerjon, (2008)). Néanmoins, le facteur limitant réside dans le fait que ces techniques demandent un gros investissement dans le

matériel d'analyse. De même, l'entretien des spectromètres peut être coûteux et le personnel qui les utilise doit être très qualifié.

- *Les spectrométries photoniques*

Ces techniques sont déjà utilisées pour analyser la qualité des viandes (Damez et Clerjon, (2008)). Ces tests se font sans contact. On retrouve plusieurs points communs entre ces méthodes.

Ce type de technique génère beaucoup de données. L'application est très rapide. Elle permet de faire passer de nombreux échantillons en peu de temps et enfin elle est non invasive ; ce qui est souhaitable pour contrôler un aliment. Afin d'avoir une représentation significative, des analyses statistiques poussées sont réalisées sur ces données. Généralement, ces techniques se contentent de comparer les spectres de la condition « frais » par rapport à la condition « décongelé », ce qui ne correspond pas aux besoins des industriels. Ceux-ci souhaitent un outil qui permettrait de retrouver des filets décongelés vendus comme étant frais.

- *La spectrométrie infrarouge, et infrarouge proche (NIR)*

Cette méthode fonctionne assez bien mais elle nécessite un grand nombre d'échantillons pour faire une analyse statistique satisfaisante (près de $n=100$) (Uddin *et al.*, (2005)). Le spectre étudié part généralement de 900 jusqu'à 1100 nm de longueur d'onde (Uddin, (2004)). Le spectre peut être étendu vers les longueurs d'onde du visible (Zhu *et al.*, (2012)).

La spectrométrie Raman est aussi efficace que la NIR, elle consiste à repérer une modification de la fréquence d'excitation lorsque le milieu est quelque peu modifié. Cette technique fonctionne très bien pour mesurer la tendreté de la viande de bœuf et pourrait être utilisée pour identifier des produits décongelés. Cette technique permet d'observer des modifications moléculaires, telle que la modification d'une protéine après congélation par exemple (Beattie *et al.*, (2004), Damez et Clerjon, (2008)).

- *La spectrométrie de fluorescence*

Cette technique est basée sur la détection d'un fluorochrome. Le NADH et le tryptophane ont été étudiés sur le poisson. L'excitation ne se fait que sur une toute petite partie de

l'échantillon, à savoir quelques μm^2 (Karoui *et al.*, (2006)). Le type de support pour porter l'échantillon est incliné. La chair de poisson étant opaque, on utilise généralement la spectrométrie de surface (front-face). La technique est schématisée dans la Figure 15 ci-dessous.

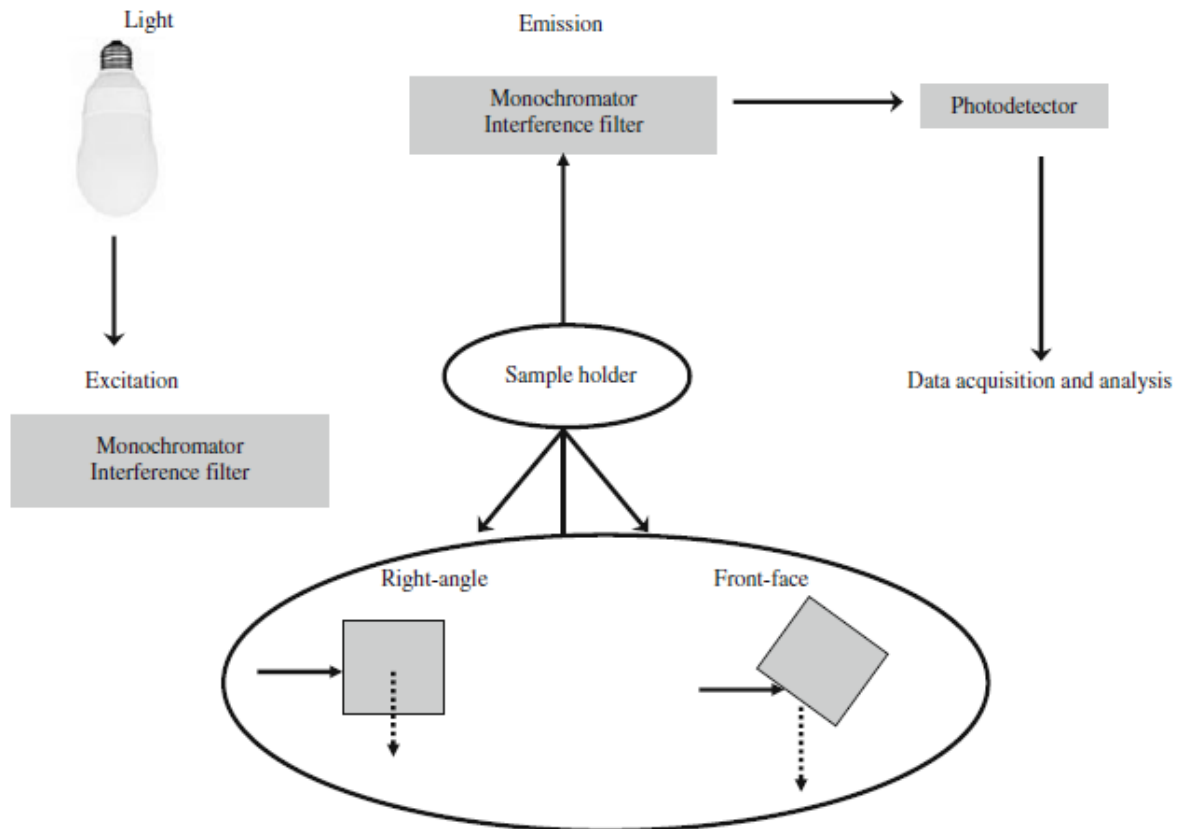


Figure 15 : principe de base de la spectrométrie de fluorescence

Source : Karoui et Blecker, (2011)

• La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire

Andersen et Jørgensen, (2004) ont analysé des filets de cabillaud (*Gadus morhua*). Le but était de différencier des filets ayant subi une congélation de filets n'en n'ayant pas subi. Les auteurs ont analysé des filets selon deux méthodes : la RMN et le DSC (défini page 44). Ces deux grandeurs peuvent être exprimées en fonction de « N » : un nombre de poches d'eau contenues dans le tissu. En entrant ces données dans une matrice de calculs, on peut alors obtenir ce nombre de poches d'eau. On compte un plus grand nombre de poches d'eau libre dans un filet décongelé que dans un filet frais.

La résonance magnétique nucléaire à bas champ (LF-RMN) a été utilisée par Sánchez-Alonso *et al.*, (2012). La résonance magnétique nucléaire à bas champ des protons permet de

différencier l'eau libre, l'eau liée à des macromolécules de l'eau piégée. Les protons des molécules d'eau vont avoir des temps de relaxation légèrement différents. La méthode est couplée à l'analyse de critères ayant déjà fait leurs preuves : la mesure de la capacité de rétention d'eau (WHC), la viscosité apparente... Cette technique a permis de montrer que qu'une plus grande quantité d'eau libre est retrouvée dans les produits décongelés et que l'eau piégée est moins présente. L'intensité de ces signaux semble proportionnelle à la durée d'entreposage à l'état congelé.

La spectrométrie par résonance magnétique nucléaire donne des résultats significatifs mais doit toujours être couplée à une autre méthode (DSC ou mesures physiques). Le matériel est coûteux et l'interprétation des spectres est complexe.

- ***La spectrométrie différentielle calorimétrique DSC***

Cette technique consiste à comparer l'énergie qui entre en jeu lors de l'abaissement puis de la montée en température. Ceci permet de quantifier la quantité d'eau liée aux protéines, la quantité bloquée dans la cellule et enfin l'eau extracellulaire. Deux cupules sont utilisées, l'une vide sert de témoin et l'autre contenant de la chair de poisson sert à l'analyse. Les deux cupules sont placées dans des calorimètres (enceintes adiabatiques). Simultanément la température y est abaissée jusqu'à une température négative. On monte ensuite progressivement la température et on enregistre la température dans les enceintes. La température dans le calorimètre contenant la capsule vide va augmenter progressivement tandis que celle du calorimètre contenant la capsule de chair de poisson va franchir des paliers. Ces plateaux correspondent aux enthalpies nécessaires aux différentes eaux pour entrer en fusion.

Cette technique a fait ses preuves (Jensen *et al.*, (2003), Kristina Nedenskov Jensen, (2003), Schubring, (1999), Schubring *et al.*, (2003)) mais le matériel est coûteux et les connaissances en physique et en statistiques doivent être maîtrisées pour exploiter correctement les résultats.

Rappelons que cette méthode doit être couplée à de la spectrométrie par RMN.

d. L'analyse des critères biochimiques

- *La dégradation de l'ADN*

L'ADN a tendance à se dégrader lorsqu'on atteint des températures négatives. C'est d'ailleurs l'un des principaux problèmes de la conservation de semence en cryogénie. Cette dégradation pourrait être quantifiée pour voir si un produit a été congelé ou pas.

Le test de la comète est une électrophorèse sur une lame de microscope recouverte d'agarose. En mettant l'ADN d'un échantillon à migrer dans un champ électrique, les fragments d'ADN vont migrer alors que l'ADN intact restera sur place. Cette technique est utilisée en éco-toxicologie pour observer la dégradation de l'ADN provoquée par des agents chimiques ou physiques polluant l'environnement des poissons (Lee et Kim, (2002), Lee et Steinert, (2003)). Cette technique a ensuite servi à détecter des produits ayant subi une irradiation.

Ce n'est que récemment que cette technique a été utilisée sur le poulet (Faullimel *et al.*, (2005)) puis sur le poisson pour différencier le frais du décongelé (Le Grandois *et al.*, (2013)). Appliquée au saumon, elle permet d'observer de manière significative des abus dans la décongélation du produit. Le nom de ce test vient de la forme observée après migration. La forme de comète est composée d'une tête d'ADN non dégradé et d'une queue composée de fragments d'ADN. Plus les fragments sont petits, plus la queue sera longue. On calcule ensuite le « Olive Tail Moment ». Comme le montre la deuxième partie de l'illustration Figure 16 page 46, on a de petites comètes lorsqu'il s'agit d'une décongélation maîtrisée (a). La comète est plus étendue lorsque la décongélation dure deux heures à 10°C (b) et la queue de la comète va jusqu'à se séparer de la tête après 18 heures à 10°C (c).

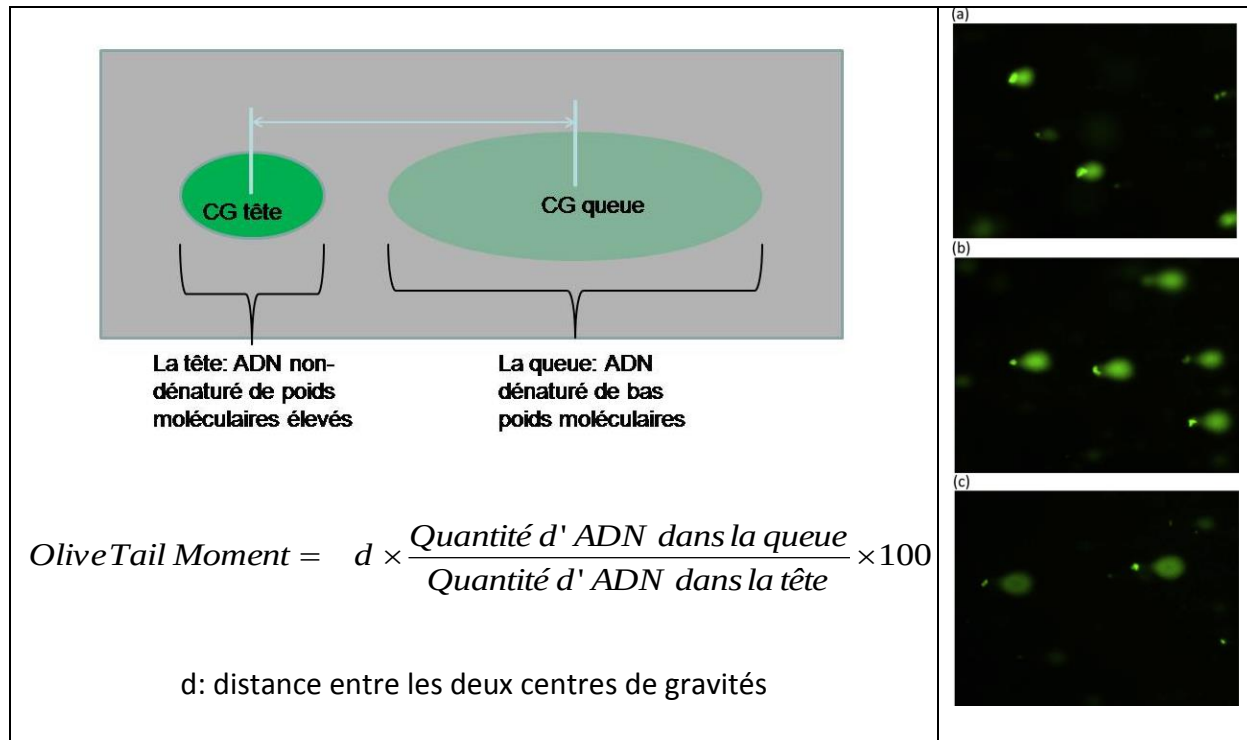


Figure 16 : Le test de la comète: un outil de mesure de la dégradation de l'ADN

Source: Le Grandois *et al.*, (2013)

Cette technique donne d'assez bons résultats mais demande un grand nombre d'essais (une centaine) pour avoir des résultats suffisamment significatifs. La préparation des lames pour faire le test est assez longue et compliquée. D'autre part, une dégradation de l'ADN n'est pas forcément due à une congélation mais elle peut aussi être due à une irradiation, comme indiqué précédemment.

• La dégradation des protéines et des lipides

D'autres composés biochimiques composant la chair de poisson peuvent être altérés par un processus de congélation/ décongélation. Les protéines peuvent être oxydées (Baron *et al.*, (2007)). Les protéines peuvent également être dénaturées (Xia *et al.*, (2010)). Nous pouvons mesurer ces dégradations pour différencier les filets de poisson frais des décongelés. Une congélation/décongélation permet à certains composés de réagir ensemble. Ainsi, certaines protéines sont oxydées par des ions métalliques. Cela entraîne des modifications présentées dans la Figure 17 page 47.

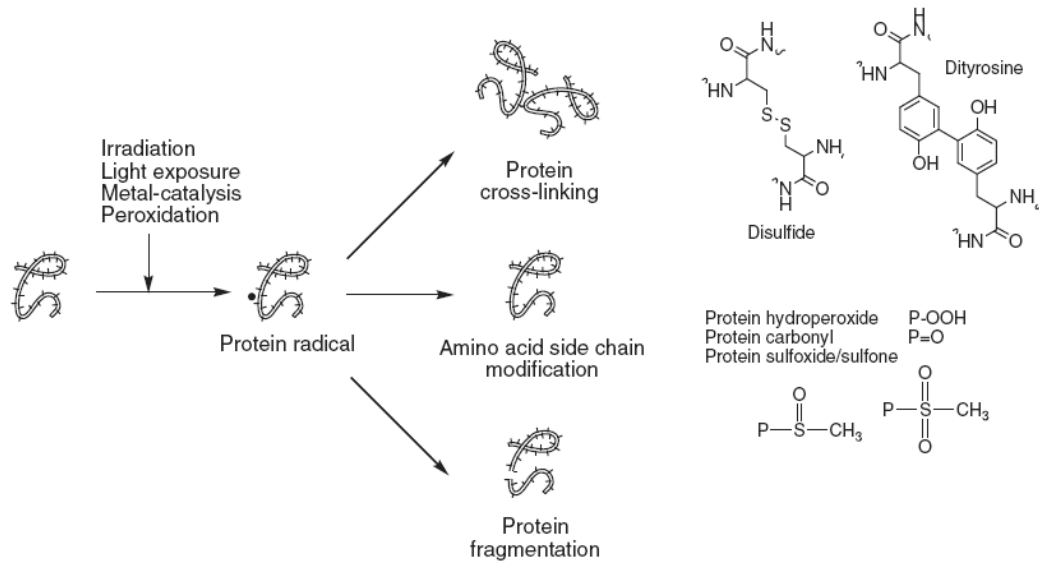


Figure 17 : Devenir des protéines oxydées.

Source : Lund *et al.*, (2011)

Récemment, les différents composés volatils qui se dégagent de produits décongelés ont été étudiés et comparés à ceux qui se dégagent de produits frais pour les espèces de poissons suivantes : le bar (*Dicentrarchus labrax*), le saumon (*Salmo salar*), la dorade royale (*Sparus aurata*), le cabillaud (*Gadus morhua*). Leduc *et al.*, (2012a) ont montré que trois composés volatils apparaissaient en plus grande quantité dans les produits décongelés que dans les produits frais. Ces résultats n'ont pas encore été confirmés par d'autres études.

Une équipe coréenne a constaté la perte des propriétés de gélification des protéines de poisson au terme de différents cycles de congélation/ décongélation (Boonsumrej *et al.*, (2007), Venugopal, (2006), Xia *et al.*, (2010)). Ces observations ont été étudiées car la perte des propriétés gélifiantes des protéines de poisson est un problème dans l'industrie fabricant le surimi-base.

6. L'utilisation de la protéomique pour évaluer la qualité des produits aquatiques

a. L'hali-authenticité

Dans un contexte économique général de la filière des produits de la mer où la demande augmente mais où la capacité de pêche diminue, des tentatives de fraude sur l'authenticité du produit apparaissent de plus en plus. Le marché des produits aquatiques s'internationalise parfois aux dépens de la pêche fraîche française. Les produits aquatiques voyagent de plus en plus pour rencontrer leurs clients ; ainsi il n'est pas rare de retrouver des poissons dit exotiques dans nos assiettes européennes. Ces déplacements de grandes quantités de poissons sont devenus possibles grâce au développement des technologies de conservation et grâce au développement du réseau de transport et de logistique internationale. Tous ces paramètres ont révolutionné le marché des produits de la mer, des produits de la pêche locale sont rentrés en concurrence avec des produits d'importation.

Les consommateurs deviennent de plus en plus inquiets et méfiants sur l'origine des aliments qu'ils ingèrent (D'Alessandro et Zolla, (2012)). Depuis le début des années 70, des tentatives de fraude sont apparues dans cette filière : substitution d'une espèce de poisson par une autre (Berrini *et al.*, (2006)), substitution d'un poisson d'une zone géographique par une autre (Sepulveda-Villet *et al.*, (2009)), vente de poissons d'aquaculture sous une dénomination pêche sauvage (Alasalvar *et al.*, (2002), Maldini *et al.*, (2006), Olsson *et al.*, (2007)).

Face à ce type de fraudes, de nouvelles méthodes ont dû être étudiées pour authentifier les produits.

En 2012, deux revues se font l'écho de la prolifération de l'utilisation des techniques de génomique et de protéomique pour analyser la qualité des aliments (Carrera *et al.*, (2012), Rodrigues *et al.*, (2012)). Ils vont même jusqu'à évoquer l'émergence d'une nouvelle discipline : la « foodomic ».

Les outils de protéomique et de génomique sont particulièrement adaptés pour authentifier des aliments. La protéomique est présentée comme outil dans l'analyse de la qualité post-mortem du poisson Figure 18 page 49.

Etude bibliographique

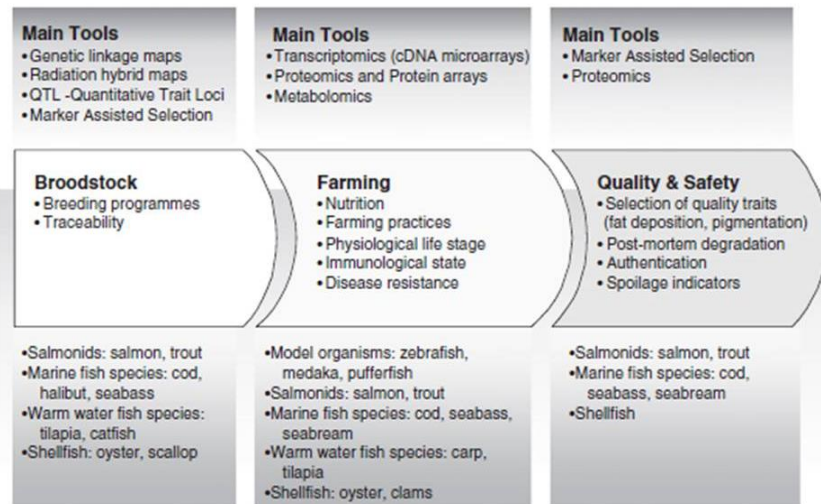


Figure 18 : Utilisation de la protéomique et de la génomique dans la recherche de marqueurs

Source Rodrigues *et al.*, (2012)

Dans le troisième cadre de la Figure 18, nous retrouvons la stratégie d'authentification d'un produit de la mer. Elle se caractérise par l'utilisation d'une méthode de protéomique pour identifier un marqueur permettant d'authentifier un produit ou d'identifier une protéine marquant une dégradation (congélation/décongélation). Cette méthode est applicable sur plusieurs espèces dont le bar (sea bass : *Dicentrarchus labrax*).

La seconde revue (Carrera *et al.*, (2012)) présente l'utilisation de la protéomique pour analyser la qualité des produits de la mer en tant qu'aliments. Quatre champs d'investigation sont présentés comme étant les plus adaptés à l'utilisation de la protéomique : l'authentification d'espèces de poissons, la détection d'allergènes, le suivi de la dégradation du poisson et la présence de micro-organismes pathogènes et enfin la surveillance des modifications de la qualité pendant la conservation.

Notre thématique rentre parfaitement dans ces champs de recherche et la protéomique semble être une bonne voie pour trouver des bio-marqueurs permettant de distinguer les filets frais de filets décongelés (Figure 19 page 50). La stratégie top-down semble la plus adaptée à notre problématique.

Etude bibliographique

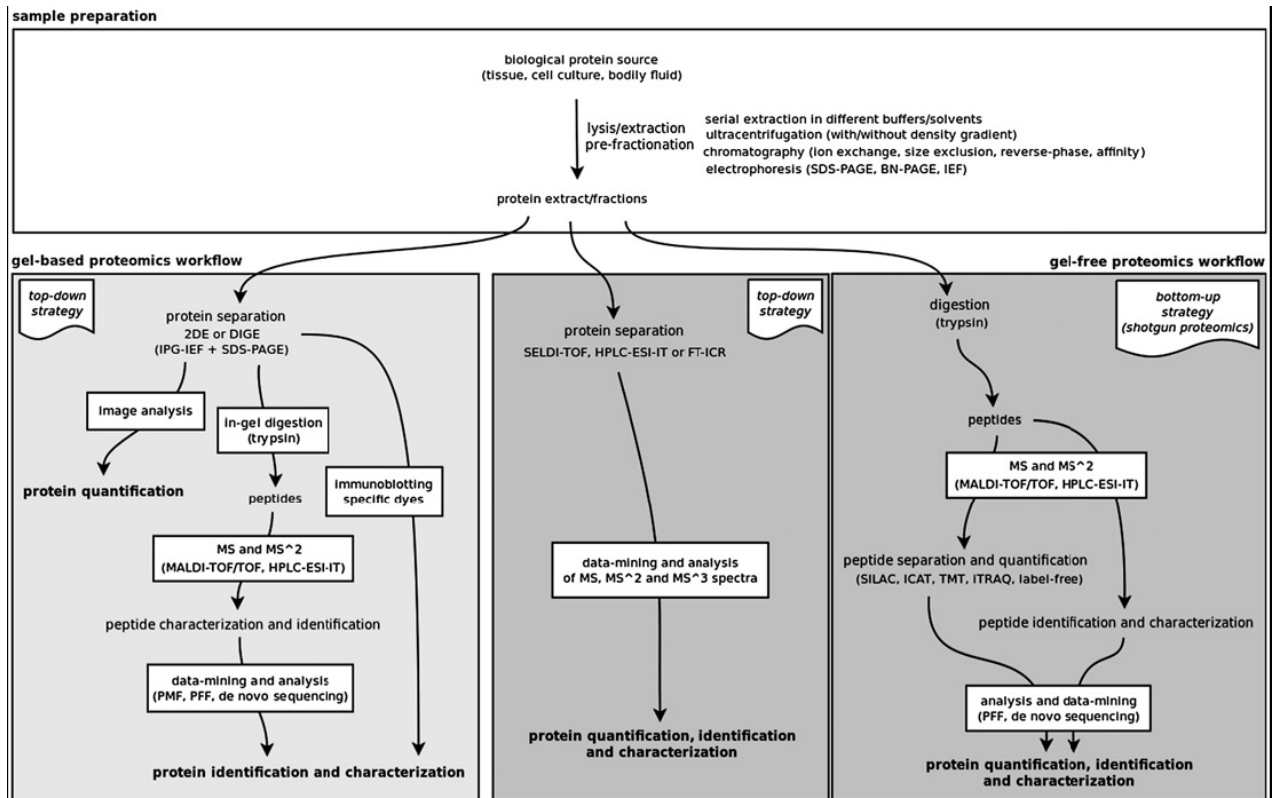


Figure 19 : Stratégies en protéomique typiquement utilisées pour caractériser et identifier des protéines d'intérêts

Source : Rodrigues et al., (2012)

La protéomique est une discipline de la biochimie qui est apparue avec l'émergence de la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle. Cette technique est apparue il y a plusieurs dizaines d'années (O'Farrell, (1975)). Le nom de protéomique vient du mot protéine et de génomique qui est la discipline étudiant les gènes. La technique de l'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer les protéines selon deux dimensions : la première séparation se fait selon les points isoélectriques des protéines et la seconde selon les masses moléculaires de ces dernières.

Un gène induit une protéine mais ces mêmes protéines peuvent avoir plusieurs devenir (modifications post-traductionnelles). Dans un même organisme, un gène peut être sur ou sous-exprimé. Plusieurs profils protéiques peuvent ainsi coïncider avec le même profil génomique. L'environnement et l'alimentation peuvent également faire varier l'expression des gènes.

Un génome donne un protéome qui, selon le niveau d'expression de chaque protéine, donne lui-même un transcriptome. Ce transcriptome peut être étudié par exemple pour comparer

des conditions d'élevage (Osuna-Jiménez *et al.*, (2009), Panserat *et al.*, (2009), Wei *et al.*, (2007)).

b. L'électrophorèse bidimensionnelle comparative

L'électrophorèse bidimensionnelle est particulièrement adaptée pour comparer des protéomes très proches. Les améliorations de la technique ont permis d'optimiser la technique de séparation (Rabilloud, (2009), Rabilloud et Santoni, (2000)). Le protocole de base d'une stratégie d'électrophorèse bidimensionnelle comparative est représentée dans le schéma de la Figure 20 page 52.

Historiquement, on considère que l'électrophorèse bidimensionnelle est une technique qui permet de séparer les protéines en suivant deux dimensions. La première dimension permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique grâce à la technique de l'isoélectrofocalisation (IEF). La seconde dimension permet d'effectuer une séparation des protéines selon leur masse moléculaire grâce à un gel d'électrophorèse de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). La combinaison de ces deux techniques permet d'obtenir une cartographie des protéines composant l'échantillon. L'électrophorèse 2D est comparative dans le fait qu'elle permet de comparer facilement deux échantillons très proches (Rabilloud *et al.*, (2010), Rabilloud et Lelong, (2011)). Cette technique est bien adaptée pour déceler et trouver un marqueur permettant de différencier des échantillons provenant du même tissu avec la modification d'un seul paramètre.

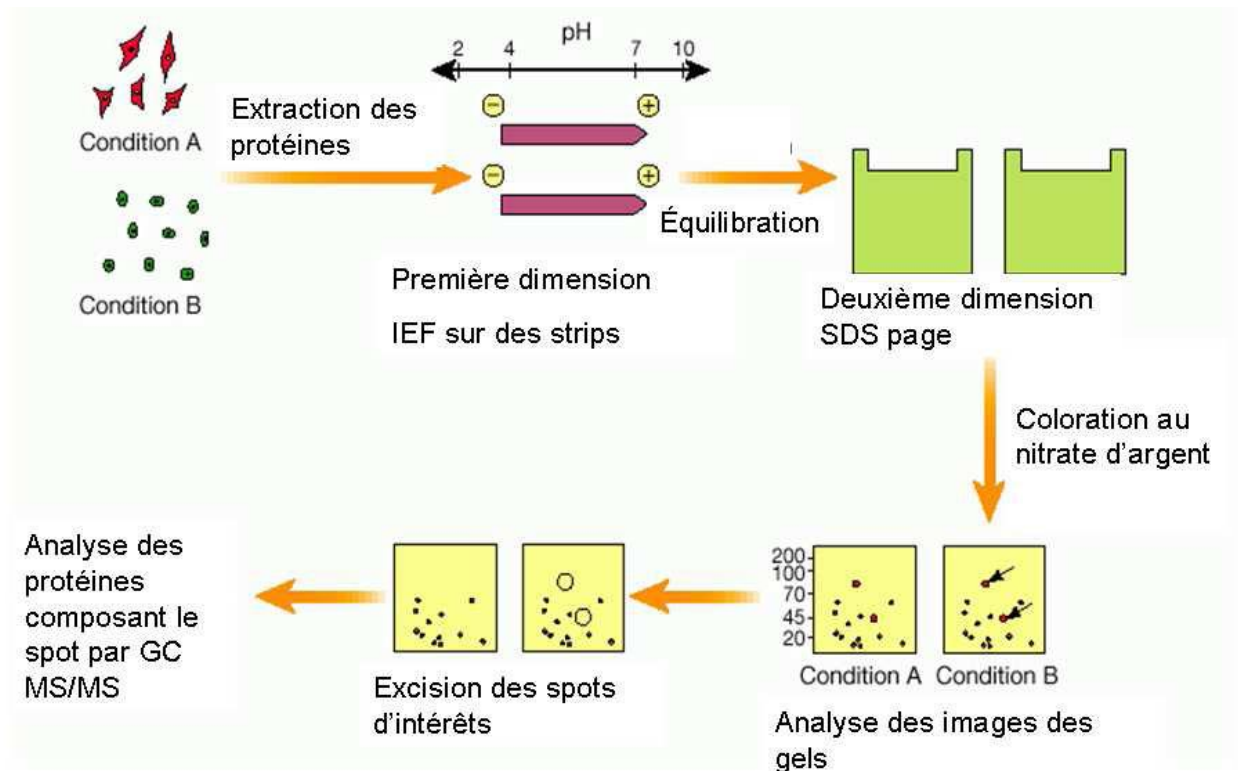


Figure 20 : Schéma d'un protocole d'électrophorèse bidimensionnelle comparative

D'après Rogowska-Wrzesinska *et al.*, (2013)

Plus récemment, Rabilloud et Lelong, (2011) ont montré que l'électrophorèse 2D ne se limite pas à deux étapes, mais que les étapes intermédiaires ont aussi leur importance. Ces auteurs considèrent que cette technique est composée de cinq étapes clés. L'illustration suivante décrit ces cinq étapes (Figure 21 page 53).

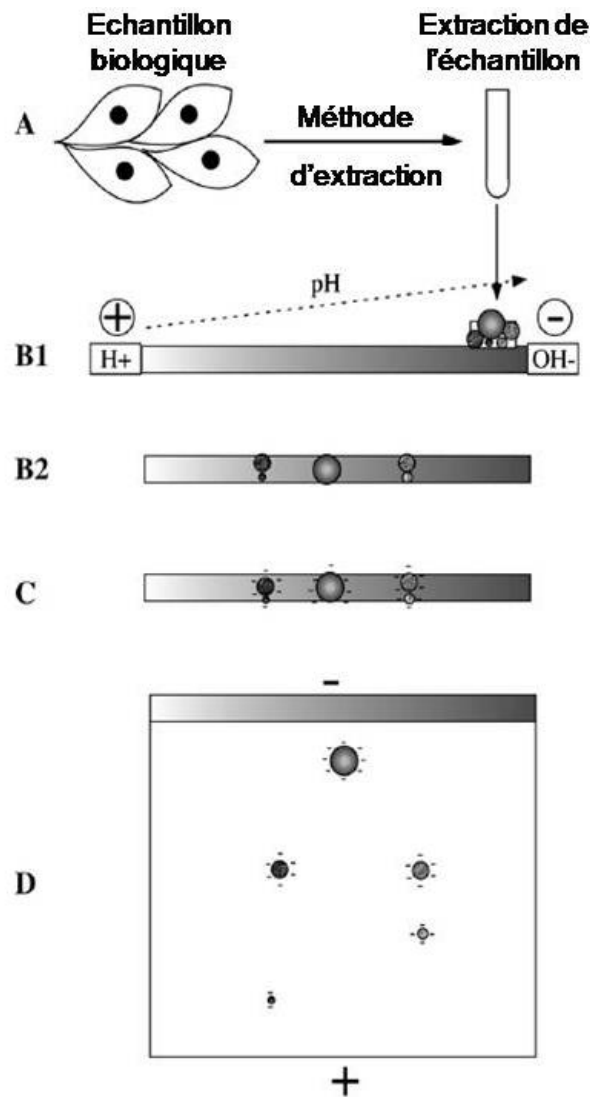


Figure 21 : Les 5 étapes clés de l'électrophorèse bidimensionnelle

Source : Rabilloud et Santoni, (2000)

On note de la manière suivante ces cinq étapes :

A : la préparation de l'échantillon, le choix du solvant, les conditions d'extraction des protéines sont déjà une première étape de sélection. Il est généralement préférable de sélectionner une partie des protéines qui nous intéressent. Toutes les protéines ne sont pas aussi facilement solubles, en particulier les protéines membranaires qui sont hydrophobes car intégrées dans la double couche de phospholipides. Il faut également veiller à limiter la quantité de sels qui déforme le gel et modifie l'emplacement des spots.

B1 : Le chargement sur la bandelette IPG (immobilized pH gradient) constitue la deuxième étape.

Le choix de la composition de la solution de charge dépend directement de la composition des protéines. Les agents ajoutés doivent rendre plus solubles les protéines sans les dénaturer afin qu'elles conservent leur point isoélectrique. Il faut également adapter le choix de la gamme de pH stabilisé sur la bandelette IPG.

B2: Les protéines migrent pour atteindre leur point isoélectrique et s'immobilisent.

La migration se fait en plusieurs étapes. Une première étape de réhydratation passive est suivie d'une étape de réhydratation active, ce qui permet à la bandelette de s'imprégner de l'échantillon et des agents chimiques permettant au gradient de pH de se linéariser le long de la bandelette. Différents paliers de charge doivent être atteints en faisant varier les types d'augmentation (rapide, linéaire ou lente). Ce choix doit être adapté aux types de bandelette IPG et à la solution de charge utilisée.

C : La bandelette est ensuite équilibrée avec une solution d'équilibration, solution tampon contenant du SDS.

A cette étape les protéines sont dénaturées par le SDS et se chargent négativement. D'autres agents sont utilisés pour rendre les protéines plus solubles. Le β -mercaptoéthanol et le DTT peuvent servir à lyser les ponts disulfures.

D : Les protéines migrent ensuite selon leur masse moléculaire avant de se stabiliser

La préparation du gel de séparation pour la deuxième dimension est très délicate. La concentration en acrylamide et le choix du tampon font varier la migration. Les gels, coulés à la main, sont sujets à des variations de concentration dans un même gel, ce qui peut fausser la cartographie des protéines.

Le gel doit ensuite être coloré pour être analysé. Les deux principaux types de coloration sont la coloration au bleu de Coomassie et la coloration au nitrate d'argent. L'intensité de la coloration au bleu de Coomassie est homogène et linéaire. Cette technique de coloration est également compatible avec la spectrométrie de masse. La coloration au nitrate d'argent est moins linéaire et homogène. Sa compatibilité avec la spectrométrie de masse n'est pas toujours évidente à cause du formaldéhyde qui est ajouté dans le protocole de coloration. La coloration au nitrate d'argent est beaucoup plus sensible (de l'ordre du ng) que celle au bleu de Coomassie (de l'ordre du μ g) (Rabilloud, (2009), Rabilloud et Lelong, (2011)).

• *La 2D Differential In Gel Electrophoresis (2D DIGE)*

L'évolution de l'électrophorèse bidimensionnelle est l'apparition de la 2D DIGE. L'intérêt de cette technique est de réaliser une comparaison du profil protéique de deux échantillons sur un même gel ayant subi les mêmes modifications à partir de la première étape de l'IEF. Les protéines sont marquées sur leurs résidus de lysine avec des cyanines fluorescentes spécifiques qui ne modifient pas le point isoélectrique de la protéine. La masse moléculaire n'est que très partiellement modifiée. On peut ainsi mélanger différents échantillons marqués avec différentes cyanines fluorescentes. L'intensité de la fluorescence des spots est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le spot. En comparant l'intensité du signal pour un même spot des différentes fluorescences des cyanines, la surexpression d'un spot peut être analysée. La fixation des cyanines n'altère pas l'identification des protéines par spectrométrie de masse. Les différences sont mieux révélées car tous les échantillons migrent dans le même gel. Les variations inter-gels sont annulées. La technique du 2D DIGE nécessite la production d'un moins grand nombre de gels pour avoir des résultats significatifs.

L'utilisation de la technique 2DIGE est plus récente sur les produits de la mer. Elle permet d'analyser l'expression de certaines protéines selon le mode d'abattage des poissons tels que le bar (*Dicentrarchus labrax*) (Addis *et al.*, (2012)) mais aussi les variations du transcriptome de la truite (*Oncorhynchus mykiss*) en présence de cuivre toxique (Eyckmans *et al.*, (2012)).

Malgré les évolutions de la protéomique qui tendent à éviter la 2D pour passer directement à la spectrométrie de masse, l'utilisation de l'électrophorèse reste un outil essentiel pour identifier des protéines inconnues ou des protéines provenant d'espèces dites exotiques, dont le génome est non séquencé ou partiellement séquencé (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, (2013)). L'électrophorèse bidimensionnelle reste également un bon moyen d'identifier des protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles (la phosphorylation d'acides aminés, par exemple). La 2DE est toujours la meilleure technique pour déterminer la masse moléculaire et le point isoélectrique d'une protéine.

• *L'identification des protéines après l'électrophorèse*

Les protéines contenues dans un spot d'intérêt repéré par 2DE ou 2DIGE peuvent être identifiées. Dans un premier temps, il faut décolorer les spots d'intérêts identifiés. Les protéines du spot sont ensuite digérées par une enzyme avant d'être analysées. La trypsine est majoritairement utilisée. C'est l'identification de ces peptides et de leur masse qui permettra d'identifier la protéine d'origine. On parle de la technique « peptides mass fingerprinting »

Généralement c'est la technique du MALDI TOF qui est utilisée pour des protéines déjà étudiées par cette technique. (Matrix Assited Laser Desorption ionization Time Of Fly).

Les peptides sont absorbés par une matrice correspondant aux macromolécules que l'on souhaite analyser. Un laser excite ensuite la matrice avec l'échantillon. Les macromolécules s'ionisent puis les particules ionisées accélèrent dans le champ électrique du spectromètre de masse. Selon la masse et la charge de cette particule voyagera plus ou moins longtemps pour atteindre le détecteur. Les pics obtenus correspondent aux masses des peptides analysés. Ces masses sont comparées aux masses des peptides obtenues dans des bases de données comme « Swiss-prot » par exemple. Une analyse croisée des données brutes source permettent d'identifier la protéine en validant le résultat par une analyse statistique.

Pour les protéines moins connues, la spectrométrie de masse tandem couplée à une chromatographie liquide peut permettre d'identifier ces protéines par nano LC-MS/MS. L'identification par informatique démarre avec le résultat de la digestion de protéines. Ici, pour analyser la composition en peptides, une première étape de nano-chromatographie liquide est utilisée pour séparer les peptides selon leur masse. Les peptides sont ensuite analysés sur un spectromètre de masse en tandem. C'est à nouveau dans les bases de données de type « Mascott » que l'on retrouve les spectres des peptides majoritairement identifiés lors de premier passage au spectromètre de masse.

Le séquençage de novo prend plus de temps car il faut identifier les peptides à partir des spectres théoriques avec ceux obtenus en pratique. Le séquençage de novo est adapté aux protéines provenant d'espèces mal ou pas séquencées.

c. Exemples d'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle pour analyser le poisson

En 2004, Berrini *et al.*, (2006) ont réalisé des gels d'électrophorèse 2D sur les protéines solubles du muscle blanc de filet de perche. Cette étude montre des profils différents selon l'espèce de perche. Cette technique permet de distinguer les perches du Nil des perches européennes ou d'espèces ayant le même aspect. L'électrophorèse bidimensionnelle comparative permet d'authentifier une espèce de poisson par rapport à une autre.

Ces techniques d'IEF et d'électrophorèse bidimensionnelle ont permis d'identifier des espèces de poissons dans des produits un peu plus transformés (cuisson, congélation,...) (Etienne *et al.*, (2001), Etienne *et al.*, (2000), Pineiro *et al.*, (1999)).

L'équipe du Madame VERREZ-BAGNIS de l'Ifremer de Nantes a analysé les changements protéiques post-mortem sur le bar (Verrez-Bagnis *et al.*, (2001)). Une démarche similaire a été appliquée pour le cabillaud (*Gadus morhua*) par l'équipe du docteur Jensen *et al.*, (2003) à la « Danish Technologies University » au Danemark. Caballero *et al.*, (2009), quant à eux, ont étudié les changements de composition en protéines chez la daurade (*Sparus aurata*) en fonction des conditions d'élevage.

La stratégie de l'électrophorèse bidimensionnelle est bien adaptée pour comparer le transcriptome d'un poisson en fonction de son mode d'élevage comme l'ont décrit Osuna-Jiménez *et al.*, (2009), Panserat *et al.*, (2009) et Wei *et al.*, (2007).

7. L'exsudat

La première utilisation du jus de presse de chair de poisson a été réalisée par Morel, (1979). Cette technique permet de récupérer le contenu facilement soluble de la chair sans en altérer la structure. Il ne faut pas dépasser la pression de 10 Kg/m². Au-delà de cette pression, les membranes des cellules seraient détruites et leur contenu serait libéré. C'est en dosant l'activité enzymatique de certaines enzymes qui devraient être intracellulaires, à savoir lysosomiques ou mitochondriales, que l'on peut évaluer l'importance de la lyse cellulaire ou subcellulaire. Par la suite, nous appellerons ce jus de presse : exsudat. Le dosage de l'activité de l' α -glucosidase lysosomique dans les exsudats de poisson frais ou décongelé permet d'évaluer et d'authentifier les produits frais n'ayant pas subi de

congélation. Cette technique a été modernisée par l'utilisation de centrifugeuses modernes (Benjakul Soottawat et Thongkaew Chutima, (2003), Duflos *et al.*, (2002)).

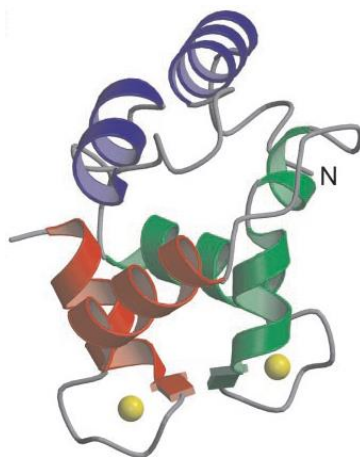
Le principe est le même mais au lieu d'appliquer une pression, c'est une centrifugation qui est réalisée.

L'une des protéines sarcoplasmiques qui pourrait être présente dans un exsudat de poisson décongelé sont les parvalbumines. Nous verrons par la suite qu'elles auront un rôle important dans ces travaux, une présentation en est donc faite ici.

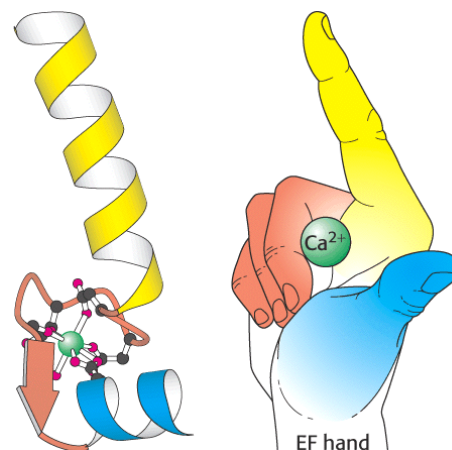
8. La parvalbumine

La parvalbumine α est une protéine de faible poids moléculaire (10-12,5KDa) dont le point isoélectrique est situé entre 3 et 4. On la retrouve chez beaucoup de vertébrés inférieurs dont le poisson. Elle est également présente chez les vertébrés supérieurs dans les muscles lisses ou les tissus nerveux.

La parvalbumine fait partie de la famille de SCBP (Sarcoplasmic soluble Calcium Binding Protein). D'autres protéines en font partie comme la calmoduline et la troponine C. Les caractéristiques de cette famille sont leurs propriétés à fixer l'ion calcium sur un ou plusieurs sites. Le rôle des parvalbumines est de réguler le flux de calcium lors de la décontraction musculaire, Figure 22 ci-dessous.



A. Schéma supposé de la structure secondaire de la parvalbumine de carpe (*Cyprinus carpio*). Avec ses deux motifs « EF hand », l'un en vert et l'autre en rouge. Les ions calcium sont représentés par des sphères jaunes. Source : Swoboda *et al.*, (2002)



B. Schéma de la structure « EF hand » formé par une hélice, une boucle et une hélice. La sphère verte représente l'ion calcium. Source: Berg, (2002)

Figure 22 : Schémas de la structure de la parvalbumine (A) et du motif « EF-hand » (B)

Le site de fixation de l'ion calcium est souvent évoqué comme étant la partie reconnue par l'anticorps. D'ailleurs on constate quelques réactions allergiques croisées entre la parvalbumine du poisson et certains pollens qui présentent également ces configurations d'« EF hand » (Wopfner *et al.*, (2007)).

Le rôle physiologique de la parvalbumine est de se lier au calcium après la contraction musculaire et de transporter cet ion dans le réticulum sarcoplasmique lors de la relaxation du muscle. L'ion magnésium va alors prendre la place de l'ion calcium et le calcium sera stocké dans le réticulum sarcoplasmique dans l'attente d'un nouveau stimulus lié au potentiel d'action (PA) qui libèrera le calcium sur les myofibrilles ; ce qui provoquera une contraction du muscle (Heizmann, (1984)). Comme le montre la Figure 23 ci-dessous, les parvalbumines (PV) facilitent le flux de calcium de la troponine C (TnC) vers le réticulum sarcoplasmique (SR) (Arif, (2009)).

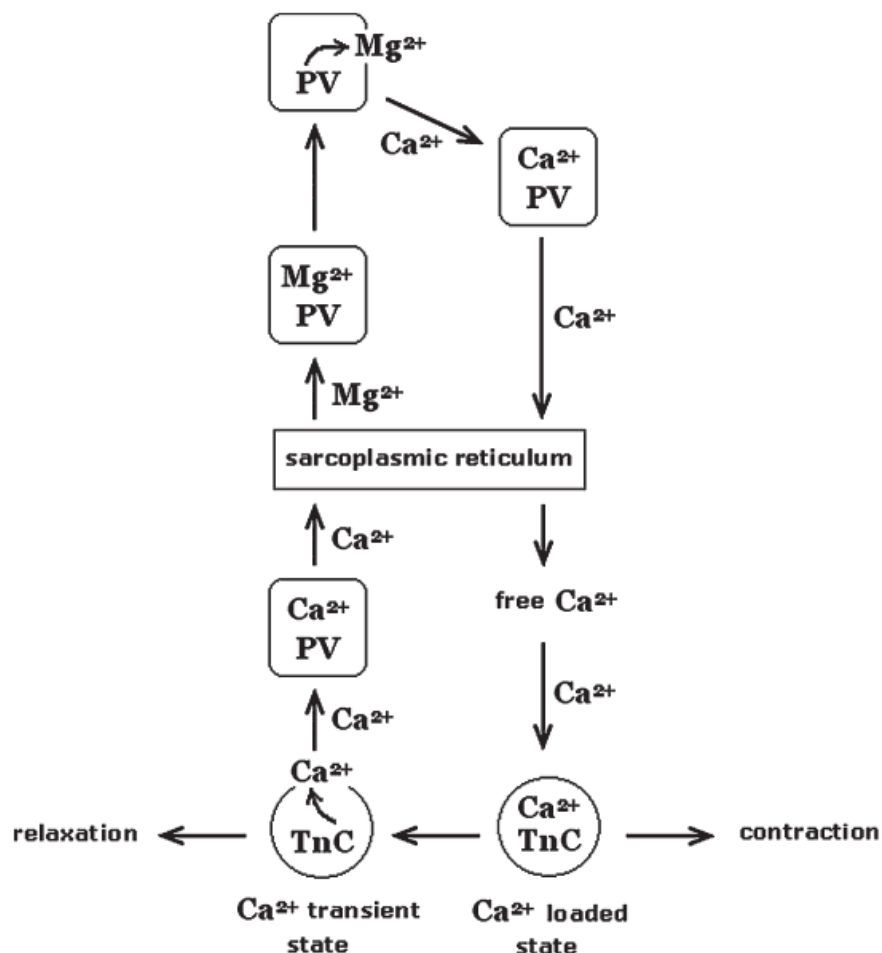


Figure 23 : Flux du calcium pendant le cycle contraction-relaxation des fibres musculaires de poisson

Source : Arif, (2009).

La parvalbumine α est particulièrement résistante. Les travaux du professeur S.H. Arif en 2010 démontrent des propriétés thermorésistantes exceptionnelles (Arif, (2010)). Un échantillon de parvalbumine du poisson *Channa marulius*, originaire d'Asie est exceptionnellement stable même après un traitement d'une heure à 90°C. D'autres expériences ont permis de démontrer la résistance de cette protéine aux attaques protéolytiques (Arif, (2009), Arif, (2010)). Ces particularités permettent d'enrichir les échantillons en parvalbumine avant leur analyse.

La parvalbumine a déjà servi de marqueur pour différencier des espèces de poisson et pour identifier la présence de poisson dans des aliments (Carrera *et al.*, (2006), Etienne *et al.*, (2000), Rehbein *et al.*, (2000), Tilghman, (1996), Weber Patrick *et al.*, (2009)).

Cette protéine est reconnue comme l'allergène majeur chez le cabillaud (*Gadus morhua*). Elle est identifiée comme étant un allergène croisé avec de nombreuses autres espèces de poisson et même de la grenouille (Hilger *et al.*, (2004), Van Do *et al.*, (2005a)). Ceci est dû à la forte similarité avec des protéines pourvues du motif « EF hand » (Dall'Antonia *et al.*, (2013)).

9. Inventaire des méthodes immunologiques pour doser la parvalbumine

a. Utilisation de l'ELISA pour analyser la qualité des aliments

Les tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) présentent de nombreux avantages pour authentifier la qualité des aliments. Ces tests sont relativement peu onéreux. Ils nécessitent peu de matériel. Le test peut facilement être mis en routine avec un grand nombre d'échantillons. Une automatisation peut également être envisagée. Les applications sont diverses : la recherche d'allergènes, la recherche de protéines spécifiques ou encore l'identification des OGMs (Asensio Luis, (2008)).

La parvalbumine est reconnue comme étant l'allergène majeur du poisson. Cet allergène provoque des réactions croisées avec des allergènes de diverses espèces de poisson (Arif, (2010), Van Do *et al.*, (2005b)) . Cet allergène peut provoquer des réactions allergiques importantes allant jusqu'au choc anaphylactique (Simons *et al.*, (2007)).

Lorsqu'on réalise un dosage par ELISA dans un échantillon provenant d'une matrice alimentaire, il faut faire attention aux composés qui peuvent se lier à l'anticorps sans être

l'antigène recherché. Dans ce cas, on utilise généralement l'ELISA par compétition. Le principe de l'ELISA par compétition est simple. On place l'anticorps en excès dans un tube contenant l'échantillon. Les anticorps qui ne se seront pas liés seront ensuite dosés sur une microplaque couverte de l'antigène spécifique. Cette technique a été utilisée avec succès pour doser l'allergène de la cacahuète dans différents aliments (Holzhauser et Vieths, (1999)). Une gamme étalon avec l'antigène à doser est réalisée afin d'effectuer une régression. Grâce à l'équation de la régression, la concentration inconnue dans l'échantillon peut être estimée. Cette grandeur peut être exprimée en Absorbance (la régression est alors descendante) ou en pourcentage d'inhibition (la régression est alors ascendante).

b. L'utilisation de la méthode ELISA pour doser la parvalbumine

Deux techniques de dosage par méthode immunologique sont présentes dans la littérature. Une méthode ELISA indirecte simple est présentée par Tilghman, (1996). Dans cette publication, la parvalbumine est utilisée comme marqueur pour identifier les poissons.



A. ELISA indirect

B. ELISA en sandwich indirect

Les anticorps jaunes représentent les anticorps primaires, les bleus les secondaires couplés à la peroxydase pour la révélation. La sphère rouge représente l'antigène, le trait bleu, le support plastique et enfin le trapèze vert représente un composé antigénique qui différencie l'antigène primaire mis en seconde position.

Figure 24 : Schémas des tests ELISA indirect (A) et en sandwich indirect (B).

Plus récemment, Faeste et Plassen, (2008) ont mis au point une technique de dosage plus spécifique avec un test ELISA sandwich.

L'ELISA indirect présente l'avantage d'utiliser moins d'anticorps. Le coût de l'analyse est de ce fait moins important et le test plus rapide. L'ELISA en sandwich présente l'avantage d'être plus spécifique et le seuil de détection est plus précis (Figure 24 ci-dessus).

Dans les cas de dosage de la parvalbumine par une méthode ELISA, les échantillons sont traités avant d'être analysés. Une précipitation avec du sulfate d'ammonium permet de sélectionner les protéines particulièrement solubles et un traitement thermique sélectionne les protéines thermorésistantes. Généralement, les protéines de petite taille sont purifiées par chromatographie (Chen *et al.*, (2006b), Faeste et Plassen, (2008)).

c. L'anti-parvalbumine α commercial PARV-19 (P3088)

Cet anticorps monoclonal est produit chez la souris à partir de parvalbumine α extraite de muscle de grenouille (*Rana esculenta*). Cet anticorps réagit avec la plupart des parvalbumines de mammifères et de poissons (Heizmann, (1984)). Il semble avoir des réactions croisées avec d'autres « Calcium Binding Proteins » (CaBP) ou des protéines contenant des sites de fixation du Calcium (EF hand). L'anticorps ne reconnaît pas spécifiquement la parvalbumine α de la parvalbumine β chez la grenouille. La réaction croisée entre cet anticorps et la parvalbumine de poisson est prouvée dans plusieurs espèces de poissons telles que le cabillaud, le saumon ou le thon (Hilger *et al.*, (2004)). Récemment, cet anticorps a servi à la mise au point d'un test ELISA indirect par compétition pour identifier la parvalbumine dans les produits intermédiaires de l'industrie agroalimentaire (Weber Patrick *et al.*, (2009)).

Les parvalbumines α et β et la troponine C font partie de la famille des protéines dite « Solubilized Calcium Binding Proteins » (SCaBP). Ces protéines sont responsables du transport de calcium dans les cellules musculaires. La parvalbumine joue un rôle primordial dans la relaxation des muscles de la nage comme dans le cas de la truite (Coughlin David J., (2007)).

d. Immunodosage par flux latéral des parvalbumines

L'immunodosage par flux latéral est à l'origine une technique pour réaliser des tests qualitatifs de la présence d'un antigène en faisant circuler l'échantillon sur une bandelette

de nitrocellulose préalablement marquée avec l'antigène testé. Ces méthodes sont développées afin d'effectuer des kits de détection rapide.

Le principe de cette méthode repose sur la détection de nanoparticules magnétiques recouvertes d'un anticorps spécifique. Deux lignes sont déposées sur la bandelette de nitrocellulose. L'une d'elles correspond à l'échantillon (T Line), l'autre au témoin (Control line) (Figure 25 page 63) Une solution de nanoparticules magnétiques est ensuite mise à migrer entre les deux extrémités de la bandelette. L'intensité du signal magnétique correspond à la quantité de nanoparticules fixée et donc à la quantité d'antigène déposée.

Cette méthode présente plusieurs avantages. Elle est rapide d'exécution : une heure environ. Elle demande peu d'échantillons et le résultat est très sensible. Le passage d'une méthode de dosage par flux latéral classique à cette méthode par nanoparticules magnétiques fait augmenter la précision des résultats par 10 à 1000 (Wang *et al.*, (2009)). La méthode a été appliquée avec succès pour doser la parvalbumine (Zheng *et al.*, (2012)).

Cette méthode est récente et demande quelques précautions dans l'analyse des résultats. L'investissement nécessaire pour s'équiper d'un tel matériel est assez important.

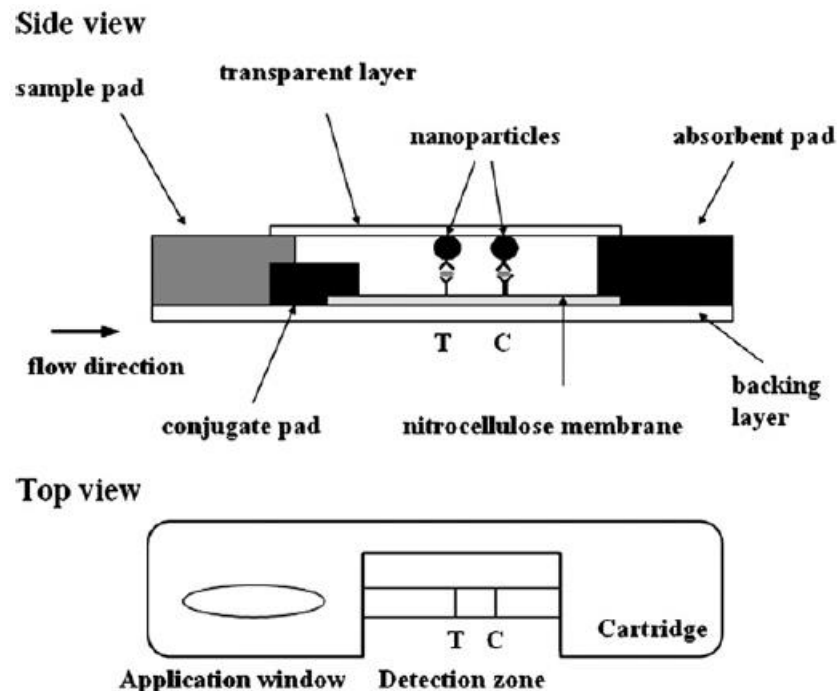


Figure 25 : Schéma du montage de la bandelette de nitrocellulose pour réaliser un immuno-dosage par flux latéral

Source : Wang *et al.*, (2009)

10. Synthèse sur les méthodes de différenciation frais / décongelé

Les travaux menés par l'ANSES et le centre technique d'expérimentation et de valorisation des produits de la pêche de Boulogne sur mer font état en 2002 des principales méthodes utilisées pour différencier les filets frais des filets décongelés depuis les années 70 (Duflos *et al.*, (2002)).

Depuis, de nouvelles techniques de différenciation sont apparues, notamment évoquées par Pavlov, (2007). Ces deux articles aboutissent au même constat : le dosage de l'activité de l' α -glucosidase semble être l'indicateur le plus précis et le plus facile à mettre en œuvre dans le cadre de ces études lorsqu'il s'agit de poissons maigres.

Les différentes techniques mises en œuvre, à partir de 2002, pour différencier les filets frais des filets décongelés sont répertoriées dans le Tableau IV ci-dessous.

Tableau IV : Synthèse des techniques mises en œuvre depuis 2002 permettant de différencier les filets frais des décongelés

Méthodes utilisées	Auteurs	Espèces
Analyses sensorielles	Parisi <i>et al.</i> , (2002) Venugopal, (2006)	Bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Diverses espèces
Composés volatils	Iglesias <i>et al.</i> , (2009) Leduc <i>et al.</i> , (2012a)	Daurade royale (<i>Sparus aurata</i>) Bar, saumon, cabillaud, daurade
Indicateurs enzymatiques	Benjakul Soottawat et Thongkaew Chutima, (2003)	Poissons tropicaux
DSC	Jensen <i>et al.</i> , (2003) Schubring, (1999), Schubring <i>et al.</i> , (2003)	Thon et cabillaud Diverse espèces
DSC, RMN WHC	Andersen et Jørgensen, (2004)	Cabillaud (<i>Gadus morhua</i>)
RMN bas champ	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> , (2012)	Merlu (<i>Merluccius merluccius</i>)
Spectrométrie proche infrarouge	Uddin <i>et al.</i> , (2005)	Daurade japonaise (<i>Pagrus major</i>)
Spectroscopie visible et proche infrarouge	Zhu <i>et al.</i> , (2012)	turbot (<i>Psetta maxima</i>)
Spectroscopie de fluorescence	Karoui <i>et al.</i> , (2006)	merlan (<i>Merlangius merlangus</i>)
Spectroscopie à impédance	Fuentes <i>et al.</i> , (2013) Fernández-Segovia <i>et al.</i> , (2012)	Daurade royale, (<i>Sparus aurata</i>) Saumon (<i>Salmo salar</i>)
Protéines oxydées	Baron <i>et al.</i> , (2007)	Truite (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
Test de la comète	Le Grandois <i>et al.</i> , (2013)	Saumon (<i>Salmo salar</i>)

a. Conclusion sur l'état de l'art

Nous avons vu dans cette première partie les conséquences d'un choc congélation/décongélation sur l'intégrité des filets de poisson. Nous constatons qu'il est difficile de discerner un filet de poisson ayant subi une congélation sans passer par une méthode d'analyse lourde. Il est d'autant plus difficile de différencier un poisson frais d'un poisson décongelé lorsqu'il est sous la forme d'un filet sans peau. Depuis ces dix dernières années, des nombreuses nouvelles méthodes ont fait leur apparition (Tableau IV page 64). Aujourd'hui, c'est toujours la méthode du dosage de l' α -glucosidase dans les jus de presse qui fait référence dans les méthodes de différenciation frais/décongelé. Les progrès de la protéomique, notamment sur les produits de la mer (Rodrigues *et al.*, (2012)), se sont illustrés par la naissance d'une nouvelle discipline « la foodomics ». Ceci permet d'ouvrir de nouveaux horizons à la recherche de marqueurs permettant de différencier les filets de poisson frais des filets décongelés. Nous ne devons pas perdre de vue la finalité, l'objectif ultime de cette étude : trouver un marqueur fiable qui pourrait permettre de différencier rapidement un filet frais sans peau d'un filet décongelé. L'idéal serait de trouver un marqueur qui fonctionnerait sur différentes espèces et ceci, quel que soit le mode de congélation et de décongélation. Les professionnels souhaitent un test rapide car leurs marchandises ne restent pas plus d'une journée dans leurs locaux. Les pistes de recherche considérées devront tenir compte de ces contraintes industrielles : une méthode rapide, à des coûts de mise en place raisonnable et une fiabilité reconnue.

Ce travail de thèse est le résultat d'une stratégie en deux étapes.

Tout d'abord, nous essaierons de trouver un marqueur protéique permettant de différencier les filets frais des filets décongelés par l'utilisation d'une méthode protéomique : l'électrophorèse bidimensionnelle comparative.

Dans un deuxième temps, nous présenterons une méthode de dosage d'un marqueur potentiel. Enfin nous évaluerons ce marqueur en le comparant à d'autres marqueurs possibles.

MATÉRIELS ET

MÉTHODES

1. Le choix des espèces étudiées

Les espèces de poissons sont référencées dans un grand groupe de vertébrés comportant approximativement 52 700 espèces (Fishbase.com) présentant une variété morphologique, physiologique et biochimique très importante (Kuhl *et al.*, (2010)).

La super classe des poissons regroupe une multitude d'espèces dont la variété génétique est vaste. Elle comprend la classe des Chondrichthyens (les poissons cartilagineux) et des Ostéichthyens (les poissons osseux). La famille des cyclostomes qui fait partie des agnathes (des poissons sans mâchoires qui ont un crâne primitif telles que les lamproies) peut également y être ajoutée.

C'est dans la classe des Ostéichthyens que l'on retrouve la majorité des poissons que l'on consomme.

a. Le bar (*Dicentrarchus labrax*)

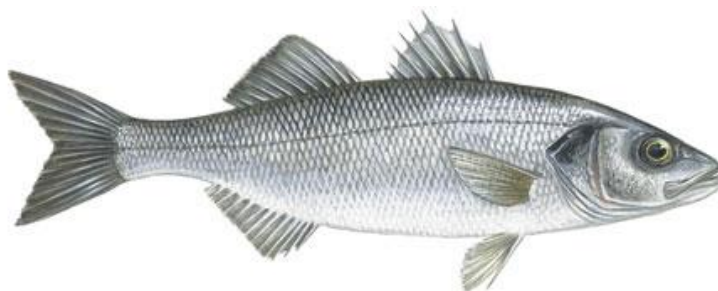


Figure 26 : Le bar (*Dicentrarchus labrax*), (Source FAO)

Le bar (*Dicentrarchus labrax*) fait partie de la classe des Ostéichthyens, la sous-classe des Actinoptérygiens, le super-ordre des Téléostéens, l'ordre des Perciformes, famille des Moronidés (Figure 26 ci-dessus). C'est un poisson assez représentatif des poissons maigres. Le bar est un poisson côtier. Il recherche des eaux oxygénées. Il a un mode de vie grégaire. Sa répartition géographique s'étale du nord de la Norvège jusqu'à la Méditerranée. Son approvisionnement est simplifié car l'élevage de ce poisson s'est beaucoup développé à partir des années 1980. Les premiers essais avaient été réalisés dans les années 1970. La zootechnie est complètement maîtrisée sur cette espèce d'une part, les stades sensibles du développement, dont le passage du stade alevin au stade larvaire, sont bien maîtrisés en France. Cela en fait le premier pays exportateur de larves de bar en Europe (Quéro et Vayne, (1997)). D'autre part, les conditions d'élevage peuvent être maîtrisées pour étudier les

variations de sa composition (Glencross *et al.*, (2008), Gornati *et al.*, (2004), López *et al.*, (2009), Rajkumar et Kumaraguru vasagam, (2006), Richard *et al.*, (2006)).

Bien que le génome du bar (*Dicentrarchus labrax*) ne soit pas séquencé, ce poisson est déjà étudié par de nombreuses équipes comme modèle expérimental (Verrez-Bagnis *et al.*, (2001), Delbarre-Ladrat *et al.*, (2004), Ayala *et al.*, (2005), Valente *et al.*, (2007), Bado-Nilles *et al.*, (2009), Tironi *et al.*, (2010), Terova *et al.*, (2013)).

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi de travailler sur le bar (*Dicentrarchus labrax*) provenant de la ferme aquacole AQUANORD. Cette entreprise est localisée à Gravelines, à quelques dizaines de kilomètres du laboratoire, ce qui permet d'en maîtriser notre approvisionnement. Les larves de bar proviennent de l'Écloserie Marine de Gravelines. Les conditions d'élevage sont semblables d'un lot à l'autre. La qualité de l'eau est contrôlée par des organismes indépendants. Pour ces expérimentations, nous utilisons le bar « taille-portion », 300-450 g par pièce. Ce poids est atteint après 17 mois d'élevage. L'alimentation des poissons est rationalisée et les aliments sont contrôlés régulièrement. Ceux-ci sont principalement composés de farine et d'huile de poisson avec une ration de soja sans OGM. Les poissons sont sacrifiés par asphyxie dans l'eau glacée. Les bars sont ensuite éviscérés avant d'être conditionnés dans des caisses de polystyrène de 5 kg avec de la glace écaillée.

b. Le flétan noir ou flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*)



Figure 27 : Flétan noir (*Reinhardtius hippoglossoides*), (source : Ispolar Ltd)

Le flétan noir commun (*Reinhardtius hippoglossoides*) fait partie de la classe des Actinoptérygiens (poissons à nageoires à rayons), l'ordre des Pleuronectiformes (poissons plats), famille des Pleuronectidés (Figure 27 ci-dessus). La population de ce poisson s'étale du nord de la Norvège au Groenland. L'approvisionnement se fait principalement par les navires de grande pêche qui utilisent le chalut de fond. Ce poisson saisonnier est rare et

recherché pour sa chair fine qui est plus grasse que celle du flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*). Il est très compliqué de l'obtenir frais et sa rareté en fait une denrée coûteuse.

Les suspicions de fraudes de flétan décongelé vendu comme frais sont nombreuses à son encontre. C'est pour cette raison que nous avons une étude sur ce poisson sauvage.

2. La préparation de l'échantillon biologique à partir du tissu musculaire

a. Préparation des filets frais et congelés/décongelés

Les filets de poisson sont préparés au Centre de Formation des Produits de la Mer et de la Terre (CFPMT) de Boulogne sur Mer. L'ensemble du processus de transformation est réalisé dans des conditions professionnelles, l'entreprise étant certifiée ISO 9001. Une fois filetés, les filets de poissons sont pelés. Ils sont ensuite emballés dans des sacs de congélation sous atmosphère modifiée (retrait d'air) pour limiter les phénomènes d'oxydation. Nous avons ensuite suivi les recommandations de la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues » (PFINV) faites aux industriels pour conserver et congeler les filets de poisson. Les filets frais sont conservés dans des sacs plastiques sur un lit de glace écaïlle. Les filets sont également recouverts de glace. Les boîtes de polystyrène, qui contiennent les produits, sont placées dans une chambre froide à 4°C. L'eau de fonte de la glace est évacuée par des trous dans le fond des boîtes. Le glaçage est complété tous les jours.

La congélation est réalisée dans un surgélateur à -30°C. Les filets, dans leurs sacs de congélation, sont placés à plat sur une seule épaisseur directement en contact avec les évaporateurs. La congélation est rapide. Elle dure moins d'une heure. Les produits congelés sont ensuite conservés dans un congélateur à -20°C.

La décongélation est réalisée dans les mêmes conditions que la conservation à l'état frais. C'est-à-dire à 4°C entre deux lits de glace écaïlle. Il faut attendre au moins 18 heures avant que le filet ne soit complètement décongelé.

b. Préparation de l'exsudat

La préparation de l'exsudat se fait à partir de 20 g de chair blanche prélevée dans la partie dorso-médiane du poisson coupée en dés d'approximativement 1 cm de côté.

Dans un tube à centrifuger, on place 20 g de chair, 20 ml de tampon phosphate à 200 mM pH 7,4 et un mélange d'anti-protéases :

- 40 µl de Pepstatine à 0,35 mg/ml dans l'éthanol absolu
- 20 µl du mélange Leupeptine à 0,5 mg/ml et Aprotinine à 1 mg/ml dans l'eau ultra pure
- 200 µl de PMSF à 10 mg/ml dans l'isopropanol

Les tubes sont centrifugés à 34 000 g à 4°C pendant 30 minutes (Duflos *et al.*, (2002)), ce qui correspond à la pression limite avant rupture des membranes (centrifugeuse Beckman, modèle Avanti JE). Avant tout autre traitement, les exsudats sont filtrés avec des filtres seringue Millipore 0,45 µm pour éliminer les débris cellulaires et une partie des lipides qui pourraient rester dans l'exsudat. Le mélange protéique est ensuite récupéré dans des tubes propres. A chacune des étapes de la préparation des exsudats, les tubes sont entreposés sur de la glace en attendant l'étape suivante afin de préserver les protéines.

3. La recherche d'un marqueur par électrophorèse bidimensionnelle comparative

a. Le plan d'échantillonnage

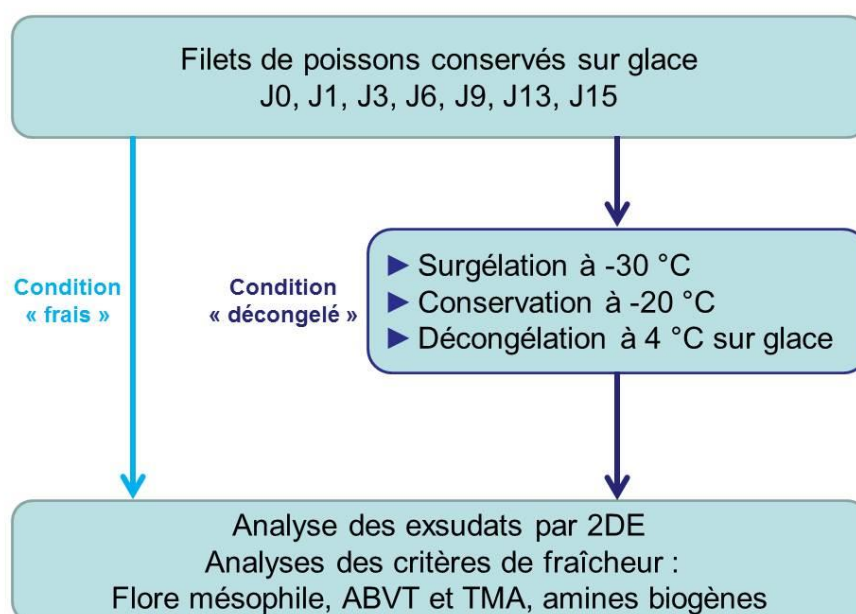


Figure 28 : Diagramme représentant le plan d'échantillonnage pour la recherche d'un marqueur de différenciation frais/décongelé

Nous avons choisi de nous rapprocher le plus possible des conditions industrielles. Nous avons donc traité nos échantillons de bar en reproduisant au mieux les conditions de capture et de conservation des poissons pêchés.

A chaque temps (J0 à J15), une partie des filets frais est analysée, tandis qu'une autre partie est congelée en vue d'analyses ultérieures (Figure 28 page 70).

b. L'électrophorèse bidimensionnelle

La préparation des échantillons et des solutions pour une étude protéomique demande l'application de règles drastiques pour éviter les contaminations par des protéines exogènes, dont principalement la kératine humaine. Nous manipulons avec un masque, des gants et la tête couverte d'une charlotte. Les produits utilisés sont de qualité protéomique (Genomics and Proteomics) et l'eau utilisée est une eau ultra-pure de 18 M Ω (Merck Millipore). Le matériel utilisé est lavé et rincé à l'eau ultra-pure avant son utilisation. Les solutions préparées à l'avance sont filtrées à 0,45 μ m et conservées à -20°C.

L'exsudat est ensuite passé sur un système de filtration Amicon. Une membrane d'un seuil de coupure de 10 kDa a été utilisée afin de pouvoir collecter les molécules d'une masse moléculaire supérieure à ce seuil (les protéines) et d'éliminer une grande partie des sels. Un agitateur magnétique et une mise sous pression sous azote permettent d'accélérer la filtration. Cette étape permet de concentrer les protéines : le mélange retenu par la membrane est concentré d'environ 10 fois. L'échantillon de protéines ainsi extrait peut alors être mélangé avec le tampon de réhydratation.

c. Dosage des protéines

Afin de toujours déposer la même quantité de protéines sur les gels d'électrophorèse, la quantité de protéines est dosée par la méthode de Bradford. L'albumine du sérum bovin est utilisée pour réaliser une gamme de huit dilutions de 0,1 à 0,8 mg.ml⁻¹ en plus du témoin blanc composé uniquement de solution de tampon phosphate utilisée pour faire l'exsudat. Les exsudats filtrés sont dilués par 50 ou 200 dans l'eau distillée pour avoir des valeurs qui rentrent dans la gamme étalon. Tous les points de la gamme et les échantillons sont déposés en triple. 4 μ l des dilutions et 200 μ l du réactif Bio-Rad (dye reagent) dilué par 5 sont déposés dans une plaque de micro-titration selon la méthode adaptée de Bradford, (1976). Pour éviter les effets de bord, les puits périphériques ne sont pas utilisés. Les plaques sont

prises à l'obscurité durant 5 minutes. L'absorbance est lue à 595 nm avec un lecteur de microplaques. Une droite de régression linéaire permet de calculer les concentrations en protéines de chaque échantillon.

• *Préparation de l'échantillon pour l'IsoElectroFocalisation (IEF)*

La solution de réhydratation est composée d'Urée 8 M, de CHAPS 4 %, de DTT 0,3 % et d'ampholytes pH 3-10 Bio-Rad 1 % et de bleu de bromophénol 0,2 %.

L'urée, le CHAPS et le DTT servent d'agents chaotropiques. Ils aident à la solubilisation des protéines sans les dénaturer. Seule leur structure spatiale est atteinte. On considère que l'IEF ne dénature pas les protéines.

On prépare 500 µl d'échantillon à déposer. Il contient 2 mg de protéines dans la solution de réhydratation préparée à l'avance et conservée à -20°C en aliquotes de 1,5ml.

Les bandelettes IPG 3-10, conçues par Bio-Rad pour les électrophorèses IEF en vue d'une électrophorèse bidimensionnelle, sont utilisées. 500µl de l'échantillon sont déposés le long d'un rail du plateau d'électrophorèse. Un rail sur deux est utilisé. La bandelette est déposée en évitant les bulles d'air. On laisse une heure à température ambiante avant de mettre 750 µl d'huile de paraffine sur les bandelettes et le couvercle sur le plateau pour éviter l'évaporation.

La réhydratation passive peut être lancée pour 5 à 11 h. Il s'agit de réhydrater le gel à une température de 20°C sans appliquer de courant électrique. L'huile est évacuée et les bandelettes sont égouttées avant d'être mises en place dans de nouveaux rails propres pour l'étape suivante.

Tableau V : Programme du générateur pour l'IEF

Etape	Voltage (V)	Type montée	Durée
S1	50	Rapide	7h
S2	200	Linéaire	1min
S3	200	Rapide	1h
S4	1000	Linéaire	1h
S5	5000	Linéaire	1h
S6	5000	Rapide	17h

La réhydratation active dure entre 5 et 17 h. Des buvards imbibés de 8 μ l d'eau ultra-pure sont placés sur les électrodes des rails avant d'y déposer les bandelettes hydratées. Les bandelettes sont ensuite recouvertes d'huile de paraffine et le couvercle du plateau est positionné dessus. La température est maintenue à 20°C et le voltage est de 50 V. L'IEF dure 27 h. Le programme de montée en tension est indiqué dans le Tableau V page 72 ci-dessus.

A la fin de cette étape, le programmeur doit afficher 80 000 Vh. Les bandelettes sont alors égouttées et placées sur un plateau sans électrode, la face du gel sur le dessus, prêtes pour l'équilibration. La position des protéines sur la bandelette correspond alors à leur point isoélectrique, c'est-à-dire au pH auquel elles sont de charge globale nulle à l'état de Zwitterion.

L'équilibration se fait en 2 temps :

- Le premier tampon d'équilibration est composé d'urée 6 M, de Tris-HCl 375 mM pH 6,8, de SDS 2 %, de glycérol 20 % et du DTT 2 %.

La solution est préparée en avance et conservée à -20°C. Cette solution est aliquotée dans des tubes de 6 ml. Le volume de l'aliquote correspond à la quantité nécessaire pour une bandelette. Le plateau est placé sur un agitateur horizontal pendant 10 minutes. Les bandelettes sont rincées à l'eau ultra-pure. Le deuxième tampon d'équilibration est alors versé sur les bandelettes. De la même manière que pour le premier tampon, des aliquotes de 6 ml sont prévues.

- Le deuxième tampon est composé d'urée 6 M, de Tris-HCl 375 mM pH 6,8, de SDS 2 %, de glycérol 20 %, d'iodoacétamide 2,5 % et de bleu de bromophénol 0,02 %.

L'iodoacétamide est un agent alkylant qui permet d'éviter la reformation des ponts disulfures. Le bleu de bromophénol est ajouté pour pouvoir observer le front de migration lors du SDS PAGE. Le tampon est mis sur les bandelettes et agité pendant 10 minutes. Les bandelettes sont rincées deux fois 10 minutes à l'eau ultra-pure.

Au cours de ces étapes, les protéines ont été dénaturées par les agents chaotropiques et alkylants et ont été chargées négativement par le SDS.

• **LE SDS-PAGE**

Des gels d'acrylamide à 12,5 % sont coulés au cours de cette étape.

Les gels sont composés de Tris-HCl à 352 mM pH 8-9, de SDS à 0,1 %. Deux agents de polymérisation sont ajoutés au dernier moment : le TEMED et le Persulfate d'Ammonium.

Les gels sont de dimensions 200 X 200 x 1 mm.

Deux dilutions du tampon de migration Tris Glycine SDS sont utilisées : le tampon 2X du côté cathode en haut du gel et le tampon 1X du côté anode. Ces deux dilutions sont préparées à partir du tampon TGS 10X.

Ce tampon 10X est composé de Tris base 250 mM, de la glycine 1,92 M et de SDS à 10 %.

La migration se fait à intensité constante, soit 30 mA par gel. Des paliers à 200, 300, 320 et 350 V sont maintenus entre 10 et 20 minutes pour obtenir une meilleure séparation.

Cette étape permet de séparer les protéines selon leur masse moléculaire : les plus légères passent à travers les mailles du gel de polyacrylamide et migrent plus loin que les protéines de masse moléculaire élevée.

La coloration du gel s'effectue au nitrate d'argent dans le cas du bar, car la coloration au bleu de Coomassie, dans ce cas, ne nous a pas permis de distinguer les spots d'intérêt sur lesquels nous nous sommes focalisés par la suite. Cette méthode est sensible bien que la linéarité entre proportion de protéines et intensité de la coloration ne soit pas optimale (Rabilloud *et al.*, (2010)). Le protocole de coloration est décrit dans le Tableau VI ci-dessus.

Tableau VI : protocole de coloration des gels au nitrate d'argent

Etapes	Composition de la solution	Temps	Agitation
Fixation	300 ml d'éthanol 50 ml d'acide acétique Qsp 1 L d'Eau Ultra Pure (EUP)	1 h à une nuit	Sous la hotte
Lavage	EUP	3 x 15 minutes	mécanique
Sensibilisation	499 ml d'EUP 1 ml de thiosulfate à 10 %	1 minute	1 gel à la fois
Rinçage	EUP	2 x 1 minute	manuelle
Coloration	1 g d'AgNO ₃ 280 µl de formaldéhyde Qsp 1 L d'EUP	45 minutes à 1 h 30	Mécanique
Révélation	24 g de carbonate de sodium 280 µl de formaldéhyde 62,5 µl de thiosulfate à 10 % Qsp 1 L d'EUP	En 2 temps : 200 ml vidés rapidement Puis le reste pendant 5 à 7 minutes	Manuellement 1 gel à la fois

Arrêt	20 ml d'acide acétique 40 g de tris HCl Qsp 1 L d'EUP	15 à 30 minutes	mécanique
Conservation	EUP	1 semaine à 4°C	

Le gel coloré est ensuite numérisé sur un densitomètre Bio-Rad. Les gels sont conservés pour analyse et excision des spots d'intérêt. Les logiciels utilisés sont PD Quest et Quantity One de Bio-Rad.

d. Identification des spots par spectrométrie de masse en tandem

Une fois que les spots d'intérêt sont repérés, ils sont excisés. Toutes les précautions sont prises pour éviter les contaminations par des protéines exogènes. Les gels sont déposés sur des plateaux en verre, des scalpels à usage unique sont utilisés. Les spots sont numérotés, puis ils sont décolorés avec le kit de décoloration Bio-Rad.

Les étapes suivantes ont été réalisées au Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique de Strasbourg par l'équipe du professeur VAN DORSSELAER et Madame Christine CARAPITO.

• Préparation de l'échantillon

La digestion trypsique a lieu dans le gel. Cette opération est automatisée dans une machine le MassPREP (Watters, USA). Les spots sont lavés trois fois dans un mélange 50 % /50 % NH_4HCO_3 , 25 mM / ACN. Les résidus de cystéine sont réduits avec du DTT à 57°C pendant 30 min et alkylés avec de l'iodoacétamide pendant 20 min à température ambiante. Après déshydratation dans l'acétonitrile, les protéines sont digérées dans le gel avec 20 μl de trypsine porcine à 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Promega, Madison, USA) en solution dans du carbonate d'ammonium à 25 mM toute une nuit à température ambiante. Une double extraction est réalisée : d'abord avec de l'acétonitrile à 60 % avec 5 % d'acide formique, puis dans l'acétonitrile pur. Les peptides résultant de la digestion trypsique sont analysés par nano LC-MS/MS sur une HCT Ultra ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) couplé à une HPC 1100 HPLC system et un chip cube (Agilent Technologies, Palo Alto, Canada).

Les peptides passent d'abord dans une colonne d'enrichissement de 40 ml à 4 $\mu\text{l}/\text{ml}$, (Agilent Technologies, Palo Alto, Canada) pour être concentrés et lavés avec une solution à 0,1 %

d'acide formique. La chromatographie est ensuite réalisée sur une colonne capillaire C18 en phase inverse (75 µm X 43 mm) à un débit de 300 nl/min.

L'acquisition des masses est pilotée par la Chem station (Agilent Technologies), Esquire control (Bruker Daltonics) et l'analyse des données se fait sur un logiciel (Bruker Daltonics).

• *La chromatographie LC-ESI-MS/MS*

Cette chromatographie est réalisée sur un spectromètre de masse à trappe d'ions (LCQ Deca XP+, Thermo-electron, San Jose, Californie, USA) équipé d'un nano-électro-spray à source d'ions couplé avec un système de nano chromatographie liquide haute performance (LC, Packings Dionex, Amsterdam, Pays-Bas). L'échantillon de peptides, remis en solution dans 10 µl d'eau contenant 0,1 % d'acide acétique, est injecté dans le spectromètre de masse en utilisant un automate FAmos (LC, Packings Dionex, Amsterdam, Pays-Bas). Après désalinisation, les échantillons sont concentrés sur une pré-colonne de 0,3 mm x 5 mm (Dionex) par un solvant A. Le solvant est composé de 95 % d'eau et 5 % d'Acétonitrile avec 0,1 % d'acide acétique. Le solvant est ensuite délivré dans la colonne par une pompe Switchos (LC, Packings Dionex) à un débit de 10 µl/min pendant 3 minutes. Les peptides sont ensuite séparés sur une colonne C-18 Pepmap (Dionex) 75 µm de diamètre intérieur et 15 cm de long. Le débit est de 200 nl/min. Les peptides sont élués en utilisant un gradient de concentration linéaire de 5 à 100 % de solvant B en 45 minutes. Le solvant B est composé de 20 % d'eau et de 80 % d'acétonitrile avec 0,08 % d'acide acétique. Enfin le solvant B est maintenu 3 minutes.

e. *Etude des critères de fraîcheur*

En parallèle de ces analyses, la fraîcheur est analysée sur au moins trois échantillons pour chaque date et chaque condition (frais ou décongelé). Les analyses sont effectuées à l'ANSES de Boulogne sur mer.

Le dénombrement des microorganismes à 30°C est réalisé selon la norme ISO 17025 (2007).

Les taux d'amines biogènes, en particulier l'histamine, la putrescine, la cadavérine, la spermine et la spermidine, sont évalués par HPLC selon la méthode de référence de l'ANSES, d'après Duflos *et al.*, (1999a), Duflos *et al.*, (1999b).

L'ABVT (Azote Basique Volatil total) et la TMA (TriMéthyle Amine) sont dosés pour calculer leur rapport. La méthode utilisée est la méthode reconnue par l'ANSES, adaptée de Billon *et al.*, (1979), Malle et Tao, (1987).

• *Analyses statistiques*

Pour tous les résultats quantitatifs de dosage notamment le dosage des amines biogènes de l'exsudat, nous avons réalisé une série d'analyses statistiques.

Dans un premier temps, nous faisons un test paramétrique grâce au logiciel XL stat 2011 (Addinsoft, Paris, France). Si la série suit une loi normale, nous pouvons alors réaliser un test paramétrique (test de Student). Si ce n'est pas le cas, nous pouvons réaliser un test non paramétrique (le test de Man Whitney) pour différencier deux échantillons.

Dans le cadre d'une série de données discontinue, comme c'est le cas pour l'étude cinétique de la concentration en amines biogènes, nous pouvons également calculer les sommes cumulées (Ibanez *et al.*, (1993)), (Figure 29 ci-dessous). Les pics qui apparaissent correspondent alors à un point d'inflexion de la courbe cinétique correspondant à la date à laquelle se produit cette inflexion. Cette méthode d'analyse a déjà fait ses preuves dans un autre type d'analyse, notamment en écologie marine (Grattepanche *et al.*, (2011)).

$$S_p = \sum_{i=1}^p x_t - p_k$$

Figure 29 : Formule du calcul des sommes cumulées

Source : Ibanez *et al.*, (1993)

4. Utilisation des propriétés immunologiques de la parvalbumine

a. ELISA indirect

Nous nous sommes inspirés des articles de Celio et Heizmann, (1981) et de Celio et Heizmann, (1982) pour effectuer l'étude du dosage ELISA indirect.

La solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) est utilisée pour toutes ces manipulations. La solution de PBS est composée de phosphate à 10 mM, pH 7,4 et de NaCl à 150 mM. La solution de lavage PBSt est composée de la solution tampon PBS avec en plus du Tween 20 à 0,05 %.

Matériels et méthodes

La gamme de dilution de la parvalbumine α (référence PVALB, Sigma Aldrich), provenant du lapin, est préparée à partir d'une solution mère à 100 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS. Cette gamme de dilution permettra de tracer une droite étalon pour doser la parvalbumine dans l'échantillon. Une gamme de parvalbumine entre les valeurs de 0,1 à 100 $\mu\text{g/ml}$ est préparée. Les échantillons sont également dilués entre 100 et 10 000 fois.

Chaque échantillon et chaque dilution de la gamme étalon sont effectués en triple. La solution tampon est également déposée comme témoin négatif. Les plaques de titration utilisées sont des plaques traitées pour absorber une grande quantité de protéines.

La plaque remplie est laissée couverte à 4°C, toute la nuit. Les sites libres sur les plaques activées fixent les protéines contenues dans la solution. Le lendemain, la plaque est vidée.

Trois lavages de 10 minutes sont effectués avec du PBSt, à l'aide d'un laveur automatique.

Le blocage se fait avec une solution de gélatine de porc à 0,5%. 200 μL de cette solution sont placés dans tous les puits. La plaque est laissée 30 minutes à température ambiante.

Une nouvelle série de trois lavages est réalisée.

La solution de l'anticorps primaire est une dilution par 20 000 de l'anticorps PARV-19 (P3088, Sigma Aldrich) dans le tampon PBSt. 200 μL de cette solution sont déposés dans chaque puits.

La plaque est laissée à incuber 2 heures à température ambiante. Puis une nouvelle série de trois lavages sont opérée.

La solution de l'anticorps secondaire est composée d'anticorps anti-IGg de souris conjugué à la peroxydase dilué par 5 000 dans le PBSt. 200 μL de cette solution d'anticorps secondaire sont placés dans chaque puits pendant 2 heures d'incubation à température ambiante.

Une dernière série de 5 lavages de 10 minutes chacun est effectuée pour bien nettoyer les puits avant la révélation.

La révélation se fait avec le kit Sigma Aldrich OPD Fast. Le substrat de la peroxydase et l'eau oxygénée sont prêts à être dissous dans 20 ml d'eau ultra-pure.

200 μL de substrat fraîchement préparé sont déposés dans chaque puits. La plaque est placée à l'obscurité pendant 30 minutes puis l'absorbance est lue à 410 nm.

Une double transformation logarithmique est nécessaire pour réaliser une courbe d'étalonnage. Les valeurs d'absorbance des dilutions de l'échantillon sont utilisées pour évaluer la quantité de parvalbumine.

b. ELISA par compétition

Cette méthode est basée sur le même principe que l'ELISA indirect. Cette technique permet de doser la quantité d'anticorps qui se sera combinée à son antigène avant de se fixer sur les antigènes liés aux sites de liaison du fond des puits de la plaque de titration (Weber Patrick *et al.*, (2009)).

La même quantité de parvalbumine est déposée dans tous les puits. On laisse une nuit à 4°C avant de laver les puits trois fois 10 minutes avec la solution de lavage PBSt. En parallèle dans un tube à essai, on place la même quantité d'anticorps primaire PARV-19 avec la gamme étalon de l'antigène : la parvalbumine α de lapin. Les tubes sont laissés 2 heures à incuber à température ambiante. 200 μ l de chacun des tubes sont déposés dans chaque puits. Après deux heures d'incubation à température ambiante et un lavage en trois étapes, on reprend le protocole mentionné ci-dessus pour l'ELISA indirect à l'étape de l'ajout de l'anticorps secondaire. Le protocole est schématisé (Figure 30 page 79).

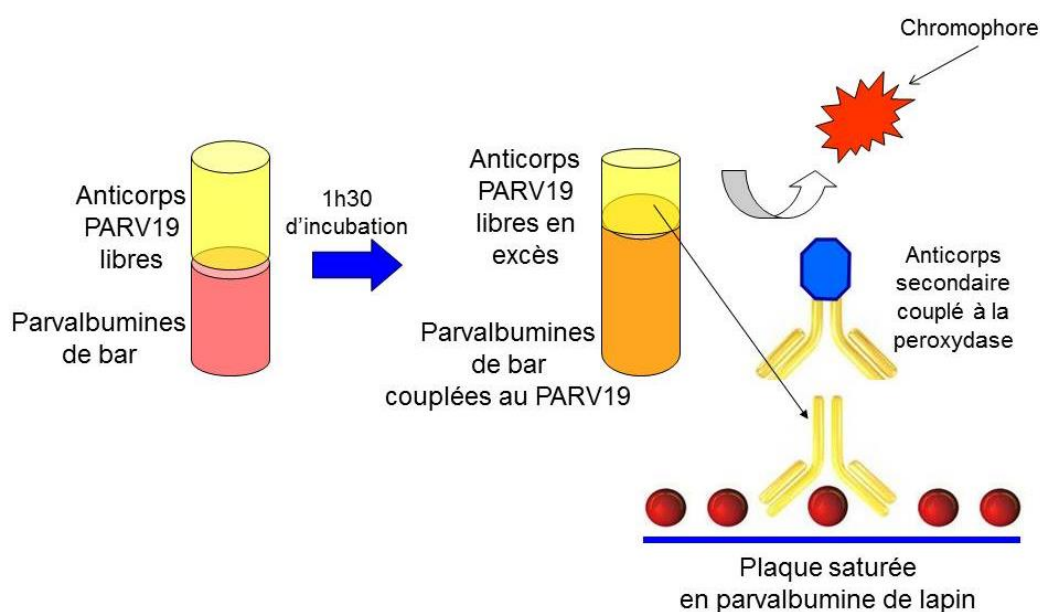


Figure 30 : Schéma expliquant le principe de l'ELISA par compétition

La droite d'étalonnage peut être réalisée en exprimant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de parvalbumine présente dans la gamme et dans les échantillons. La zone la plus linéaire est choisie pour évaluer la concentration inconnue (Figure 31 ci-dessous 80).

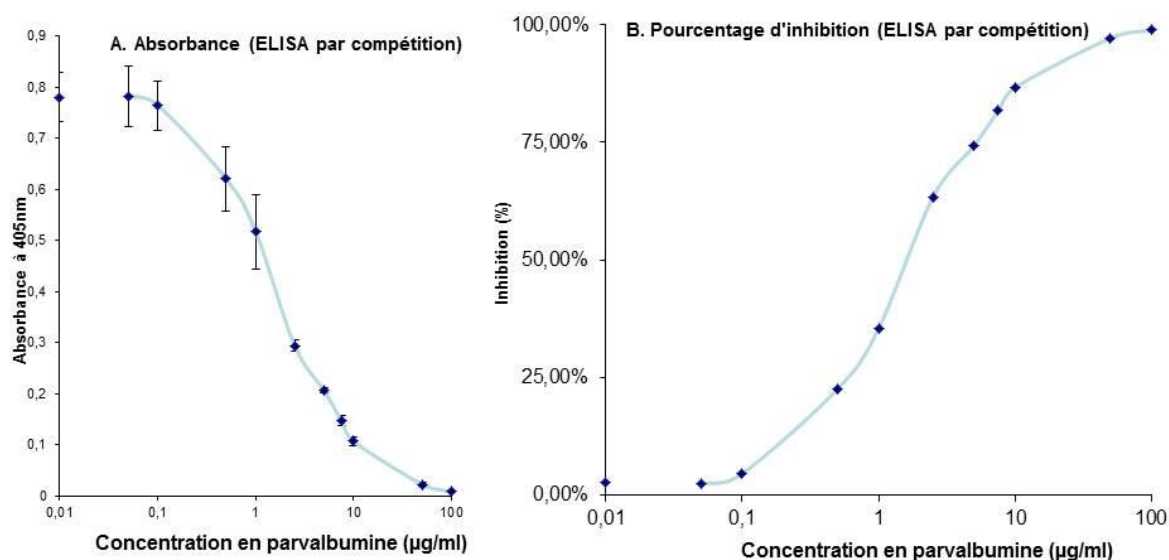


Figure 31 : Courbes étalon de l'absorbance en fonction de la concentration en parvalbumine (A) et du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en parvalbumine (B)

c. Western blot

Le matériel Bio-Rad mini gel est utilisé pour effectuer à la fois les gels et le transfert. Tout comme dans la publication de Chen *et al.*, (2006b), les solutions tampon sont préparées de la façon suivante :

- le tampon de migration : Tris HCl 25 mM, glycine 192 mM et SDS 0,1 %.
- le tampon de transfert : TrisHCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,01 % et éthanol absolu 20 %.
- le tampon de charge : tampon de Laemmli 2X (Laemmli, (1970)) : Tris-HCl à 125 mM, pH 6,8, glycérol à 20 %, SDS à 4 %, bleu de bromophénol à 0,002 % et β mercaptoéthanol à 5 %.

• SDS page et transfert

La migration se fait à voltage constant 200 V pendant 40 minutes environ.

Le transfert des protéines du gel sur membrane de nitrocellulose se fait avec le système de cuve Mini Trans Blot Bio-Rad.

Pour un bon transfert, il faut respecter le sens du montage de la cassette de transfert. Préalablement, les différentes couches du montage sont humidifiées dans le tampon de transfert. Les protéines migrent de l'électrode négative vers l'électrode positive, car les

protéines sont chargées négativement après le SDS-page. La membrane de nitrocellulose retient les protéines.

Le montage des couches pour le transfert se fait de la manière suivante:

- une couche d'amortisseur, une feuille de papier filtre
- le gel de séparation des protéines, la membrane de nitrocellulose, une feuille de papier filtre et un amortisseur.

Pour un bon transfert, il faut être vigilant à ne pas laisser de bulles d'air entre les différentes couches. Le transfert se fait à 100 V pendant 1 heure. Le module de transfert est placé dans une caisse polystyrène avec de la glace disposée autour pour éviter la surchauffe du système.

Pour s'assurer du transfert, une coloration au rouge Ponceau à 0,1 % dans de l'eau distillée avec de l'acide acétique à 5 % peut être réalisée, pendant 30 secondes à 1 minute. Une coloration du gel après transfert permet de visualiser les protéines pour lesquelles le transfert ne se serait pas déroulé. L'utilisation d'un marqueur de taille coloré permet également d'observer le bon transfert des protéines.

Après le transfert, la membrane est mise en saturation dans la même solution de tampon PBS que celle présentée dans le protocole de l'ELISA. Une solution de poudre de lait écrémé à 5 % y est ajoutée. La saturation dure 2 heures à température ambiante. La membrane est ensuite mise à incuber avec l'anticorps primaire, PARV -19 dilué au 1 :5 000 dans le PBS avec de la SAB à 1 %, durant 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Avant le passage dans l'anticorps secondaire, trois lavages de la membrane sont réalisés dans du PBSt pendant 15 minutes. La membrane est ensuite mise à incuber dans l'anticorps secondaire, anti-IGg de souris produit chez la chèvre couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1 :500 pendant 3 heures.

La membrane de nitrocellulose est lavée plusieurs fois au PBSt, puis une dernière fois à l'eau ultra-pure. Elle est ensuite colorée avec le kit de révélation Biorad 170-6432 (Alcaline Phosphate conjugate kit). Les conseils d'utilisation du fabricant sont appliqués. La membrane est rincée à l'eau ultra-pure pendant 10 minutes pour stopper la réaction. L'eau est changée une fois.

La membrane est ensuite numérisée et analysée avec le densitomètre Bio-Rad et le logiciel Quantity One.

d. Mini gels 2D

Le protocole de grand gel d'électrophorèse bidimensionnelle est adapté pour faire de plus petits gels avec des bandelettes IPG de plus petite taille avec un gradient de pH plus étroit. Les bandelettes IPG 7cm pH 3-6 sont alors utilisées.

Les bandelettes sont chargées avec 1 mg de protéines contenu dans 150 µl de tampon de réhydratation. Les étapes de réhydratation sont les mêmes que pour les grands gels. Les recommandations du constructeur Bio-Rad (catalogue 163-2099) sont suivies pour adapter le protocole de l'IEF aux nouvelles bandelettes. Le programme de migration est présenté dans le Tableau VII, ci-dessous.

Tableau VII : Programme de migration de l'isoélectrofocalisation pour les petites bandelettes (7cm, pH 3-6)

Etape	Voltage (V)	Type monté	Durée (minutes)
1	200	Rapide	20
2	450	Rapide	15
3	750	Rapide	15
4	2000	Rapide	30
5	2000	rapide	Jusqu'à atteindre 8 000 Vh

L'équilibration se fait avec 3 ml des deux tampons d'équilibration préalablement utilisés.

Les gels pour la deuxième dimension sont des gels de SDS PAGE classiques à 14 % d'acrylamide. Les bandelettes sont bloquées sur le gel avec un gel d'agarose à 1 % préparé à partir du tampon de migration TGS 1X. La migration se fait à tension constante de 200 V. La migration dure environ 40 min.

Les gels sont colorés au bleu de Coomassie G-250 (brilliant blue Coomassie). Le protocole donné par le constructeur est utilisé. Il se déroule en deux étapes :

- Au cours de la première étape, le gel est placé dans la solution de coloration durant 30 minutes. La solution de coloration est composée de 45 % d'éthanol, de 5 % d'acide acétique et de 0,1 % de bleu de Coomassie.
- Au cours de la deuxième étape, le gel est placé dans un bain de décoloration pendant 1 heure. La solution de décoloration est composée de 5 % d'éthanol et de 7,5 % d'acide acétique.

e. Purification de la parvalbumine

Dans la littérature, plusieurs articles présentent des méthodes pour purifier les parvalbumines en utilisant leurs propriétés de solubilité, leur petite taille et leur résistance au traitement thermique (Arif, (2009), Arif, (2010), Chen *et al.*, (2006b), Coughlin David J., (2007), Weber Patrick *et al.*, (2009)).

Pour extraire et purifier les parvalbumines du muscle blanc de bar, 100 g de muscle blanc sont prélevés dans la partie dorsale du poisson. Le muscle brun est retiré. La chair est mixée une première fois dans un mixeur ménager. 100 ml de tampon phosphate sont ajoutés à la chair mixée. Le mélange est placé dans 2 tubes avant de broyer leur contenu à l'ultra-turrax à 8000 tours/min. Le mélange est agité 20 minutes sur un agitateur mécanique. Les 2 tubes sont équilibrés pour être centrifugés pendant 30 minutes à 10000 g à la température de 4°C. Le surnageant est récupéré (Weber Patrick *et al.*, (2009)) puis il est chauffé pendant 30 minutes à 70°C au bain-Marie. Le contenu refroidi est centrifugé à 10000 g pendant 30 minutes.

Le surnageant est récupéré et filtré sur un filtre seringue 0,45 µm pour éliminer les agrégats qui pourraient rester en suspension. Le surnageant est mis à dialyser 24 à 48 heures en renouvelant 3 fois l'eau pour éliminer les sels et les petites molécules. Le mélange est ensuite lyophilisé avant la chromatographie.

Une partie du lyophilisat est remis en solution dans 4 ml d'eau ultra-pure avec 150 mM de NaCl. Une colonne Pharmacia 2,6 cm par 80 cm Sephadex G-50 est utilisée pour séparer les molécules selon leur taille. Des fractions de 200 gouttes sont récupérées dans des tubes en verre par un collecteur. Pour réaliser un chromatogramme, 10 µl de chaque fraction sont déposés par puits sur une plaque. 200 µl du réactif de Bradford Bio-Rad dilué par 5 sont ajoutés. Les plaques sont placées 10 minutes à l'obscurité avant d'en lire l'absorbance à 595 nm.

Les fractions d'intérêt sont regroupées et sont dialysées ensemble avant d'être lyophilisées. L'opération peut être renouvelée afin de bien séparer les protéines qui pourraient avoir des tailles très proches. La qualité de la chromatographie est contrôlée en réalisant des SDS-PAGE et la présence de la parvalbumine est contrôlée en réalisant un western blot.

5. Analyse multi-variée des composés de l'exsudat de bar frais et décongelé

a. Protocole opératoire

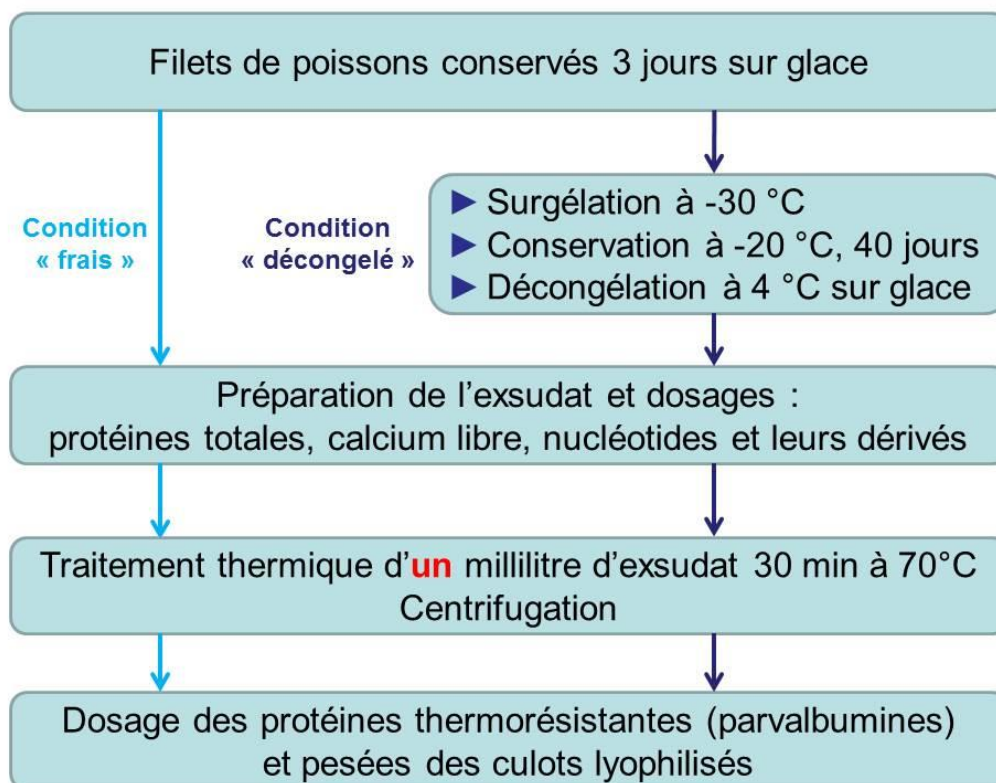


Figure 32 : Protocole opératoire de l'analyse multi-variée des exsudats de bar frais et décongelé

Dans cette étape, deux lots de filets de bar provenant d'un même panel de production sont analysés. Le premier lot correspond à la condition « filet de poisson frais » ou « frais ». Les filets sont conservés 3 jours sur glace fondante avant l'analyse. La moitié des filets sont congelés dans les mêmes conditions que pour la recherche du marqueur protéique. Les filets sont décongelés après 40 jours de congélation à -20°C. La décongélation se fait sur glace fondante à 4°C pendant 18 heures. Ce dernier lot est la condition « filet de poisson décongelé » ou « décongelé ». Douze exsudats sont réalisés à partir de douze filets par condition. Puis, les différents échantillons seront respectivement utilisés pour la préparation des exsudats ou dosage, le traitement thermique des exsudats et le dosage des protéines thermorésistantes (Figure 32 ci-dessus).

b. Dosage du calcium

Nous utilisons le kit Abcam (référence ab 102505). De l'eau ultrapure 18 mΩ et du matériel en plastique à usage unique sont requis pour éviter les traces de calcaire qui pourraient rester sur le matériel en verre.

Nous réalisons une gamme étalon à partir de 5 points triplés de 0 à 2 µg de calcium déposés par puits pour un volume final de 50 µl. Pour les échantillons, nous déposons 10 µl d'exsudat avec 40 µl d'eau ultra pure. Nous ajoutons 90 µl de chromogène. Après une douce agitation, nous ajoutons 60 µl de tampon puis on agite doucement. Nous laissons 5 à 10 min à l'obscurité, pour lire l'absorbance à une longueur d'onde de 575 nm. Pour les échantillons, nous corrigeons l'absorbance en faisant une lecture de l'absorbance sur 10 µl du tampon phosphate utilisé pour préparer les exsudats avec 40 µl d'eau ultra pure. L'absorbance lue dans le puits contenant uniquement de la solution tampon sera soustraite à toutes les absorbances des échantillons afin de ne pas comptabiliser le calcium qui pourrait être présent dans la solution tampon utilisée. A partir de la droite d'étalonnage, on détermine la concentration en calcium dans les exsudats.

c. Dosage des nucléotides et de leurs dérivés

La spectrométrie UV est utilisée pour doser l'ADN dans les exsudats. Les absorbances des points de la gamme étalon (5/10/20/30/40 µg/ml) sont lues à 260 nm (Marrubini *et al.*, (2012)), ce qui correspond à la longueur d'onde d'absorbance des bases azotées puriques et pyrimidiques des nucléotides. Cette lecture s'effectue en triple. La gamme étalon est réalisée à partir d'ADN dénaturé de sperme de hareng. Pour les échantillons, les exsudats sont dilués par 50 dans un tube à hémolyse en verre avec de l'eau ultra pure. Une droite de régression linéaire est réalisée pour calculer les concentrations en nucléotides et dérivés dans les exsudats.

d. Dosage de l'activité de l'α-glucosidase

L'activité spécifique est mesurée d'après une méthode déjà utilisée pour différencier les filets de poisson frais des filets décongelés (Benjakul Soottawat et Thongkaew Chutima, (2003), Duflos *et al.*, (2002), Rehbein, (1979)).

Brièvement, le substrat de synthèse, para-nitro-phényl- α -D-glucopyranoside (N1377, Sigma Aldrich) est utilisé. Dans un tube à hémolyse en plastique, on place 200 μ l du substrat à 7,53 mg/ml. On y ajoute 300 μ l de solution tampon de citrate de potassium pH 4,5 à 200 mM ainsi que 200 μ l de chlorure de sodium à 1 M. Le tout est mélangé au vortex. D'autre part, on prépare 2,5 ml d'exsudat dilué par 5. 200 μ l de l'exsudat dilué et 300 μ l d'eau ultra pure sont ajoutés au tube contenant les réactifs. Les tubes sont mis à incuber dans une étuve à 37°C pendant 2 heures. A la fin du temps d'incubation, 1 ml de potasse (KOH) à 200 mM est ajouté au mélange puis est mélangé rapidement afin de lire l'absorbance à la longueur d'onde de 405 nm. Les valeurs d'absorbance sont corrigées par la valeur de l'absorbance obtenue avec des tubes où la potasse est placée avant l'exsudat sans incubation. On calcule l'activité spécifique en absorbance $\lambda_{405nm} \cdot h^{-1}$ par mg de protéine contenu dans l'exsudat ($Abs_{\lambda_{405nm}} \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$). Pour calculer l'activité spécifique de l'enzyme, on utilise l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique de } \alpha\text{-glucosidase} = \frac{(\text{Abs éch.} - \text{Abs témoin})}{[\text{Protéines conc.}] \times 2 \times 0,5} (\text{Abs}_{\lambda_{405nm}} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$$

e. Analyse statistique des données

Pour chaque série de résultats, un test de normalité est réalisé avec le logiciel XL stat 2011. Quatre méthodes sont utilisées pour déterminer si l'échantillon suit une loi Normale. Le test de Shapiro-Wilk ($\alpha=0,05$) ; le test de Anderson-Darling ($\alpha=0,05$) ; le test de Lilliefors ($\alpha=0,05$) et enfin le test de Jacques Berca (ddl=2).

Lorsque les données suivent une loi normale, un test paramétrique (le test de Student) permet de dire si les différences entre les deux séries d'échantillons frais et décongelés sont significatives.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type de la série. La série est composée de 12 filets ($n=12$). Deux tests bilatéraux sont effectués : le test de Fisher ($\alpha=0,05$) et le test de Levene ($\alpha=0,05$).

f. La Classification Hiérarchique Ascendante (CHA)

Afin de réaliser une classification hiérarchique ascendante (CHA), les données sont linéarisées en prenant le logarithme de l'ensemble des valeurs. Le principe de cette méthode est simple. Toutes les données d'une même variable (conditions exsudats frais et

décongelés) sont agrégées par un calcul d'agrégation par un lien flexible. Puis, un calcul de la dissimilarité des variables est réalisé selon la distance de Bray-Curtis (Bray et Curtis, (1957)) avec le logiciel XL Stat 2011. L'index de cette méthode est le suivant. Si la distance est de 1, les variables sont complètement dissimilaires. Si la distance est de 0, les variables sont similaires. Nous choisissons un seuil de regroupement de 0,2. Nous appelons cela une troncature. C'est-à-dire que si les variables ont une dissimilarité inférieure à 0,2, alors ces variables font partie du même cluster (groupe).

La CHA est représentée sous forme d'un dendrogramme : il s'agit d'une arborescence des variables qui se séparent selon leur dissimilarité. Plus les branches se séparent rapidement, plus les variables qui composent ces branches sont dissimilaires entre elles. Les variables qui font partie d'un même cluster donnent des informations similaires.

6. Etude préliminaire sur la spectrométrie de fluorescence

La spectrométrie de fluorescence a été utilisée en collaboration avec l'équipe « Ingénierie de Formulation des Aliments et Altérations » (IFAA), du Professeur Rhomdane KAROUI, localisée au sein de l'Adrianor à Tilloy-lès-Mofflaines, dans le Pas-de-Calais. Cette équipe fait partie de l'Université d'Artois.

Afin de conforter les résultats de comparaison de l'état frais de l'état décongelé des filets de bar (*Dicentrarchus labrax*) sans peau obtenus par électrophorèse bidimensionnelle, ces manipulations ont consisté à déterminer un protocole précis afin d'effectuer des analyses statistiques significatives, comme l'ont démontré Karoui *et al.*, (2006). Cette méthode n'avait encore jamais été utilisée sur cette espèce de poisson. Les filets frais utilisés proviennent du même lot que celui utilisé pour préparer les exsudats dans la méthode précédente.

Les filets décongelés avaient été congelés à -20 °C, 72 h après la pêche du poisson sous forme de filets sans peau. La conservation des filets congelés de ces échantillons a duré 40 jours. La décongélation a été réalisée sous glace fondante à 4 °C et a duré 36 heures.

Nous avons préparé quatre éprouvettes pour les analyses de spectrométrie de fluorescence, provenant de 4 filets différents (2 filets frais et 2 filets décongelés). Une éprouvette est une petite bande de muscle d'un centimètre de large et de quelques dizaines de millimètres d'épaisseur. Pour chaque éprouvette, deux séries d'analyses sont réalisées : une sur la face

externe du filet et une sur la face interne fraîchement mise à découvert lors de la préparation des échantillons.

Les échantillons ont été numérotés de la manière suivante :

- bar 1 : filet frais face interne (bar1i) et face externe côté peau (bar1e)
- bar 2 : filet de bar décongelé face interne (bar2i) et face externe côté peau (bar2e)
- bar 3 : filet de bar décongelé face interne (bar3i) et face externe côté ventral (bar3e)
- bar4 : filet frais face interne (bar4i) et face externe côté peau (bar4e)

Nous avons testé 4 protocoles de détection de fluorochromes différents :

- Protocole « NADH » : excitation 340 nm, émission de 360 à 580 nm
- Protocole « oxydation des lipides » : excitation à 380 nm, émission entre 390 et 680 nm
- Protocole « tryptophane » : excitation à 290 nm, émission entre 305 et 490 nm
- Protocole « synchrone » : excitation à différentes longueurs d'onde λ et émission à $\lambda+20$ nm

Une fois les spectres obtenus, nous effectuons une analyse en Composantes Principales avec le logiciel XL Stat 2011. Cette méthode nous permet de savoir à quelles longueurs d'onde nous avons des intensités significativement différentes pour distinguer les filets frais des filets décongelés.

RÉSULTATS ET

DISCUSSION

Etat des lieux des travaux avant le début de la thèse

Le projet d'halio-authenticité sur la différenciation filet de poisson frais, filet décongelé a démarré en 2007 avec l'accueil d'une stagiaire en master 2 : Mylène GOBERT. La mise au point du protocole pour réaliser l'électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée à cette époque. Nous sommes restés sur le plan d'échantillonnage présenté dans la partie matériel et méthodes (cf Figure 28, page 70) qui avait été défini depuis le début de l'étude. Pour chaque date de la cinétique, plusieurs gels avaient été réalisés sur les filets frais mais tous n'avaient pas été reproduits sur les filets congelés. D'autre part, les analyses de critères de fraîcheur n'avaient pas été réalisées pour toutes les dates.

Rappelons ici que plutôt que de s'intéresser à l'ensemble du protéome du muscle de bar (*Dicentrarchus labrax*) afin de différencier les filets frais des filets décongelés, le choix s'était porté sur l'exsudat : le jus de presse extrait de la chair de poisson tel qu'il a été décrit par Morel, (1979). En effet, celui-ci est différent selon les conditions de stockage du filet (frais ou congelé/décongelé).

Ces études antérieures avaient permis d'identifier deux spots présents dans les exsudats de poisson décongelé et absents dans les filets de poisson frais. L'identification des spots était partielle car la quantité de protéines était insuffisante. Les résultats précédents étaient encourageants, mais une étape de confirmation était nécessaire pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

Le premier objectif de ma thèse a été de réaliser des gels d'électrophorèse bidimensionnelle sur les filets frais pour confirmer l'absence des spots qui semblent caractériser les filets de bar décongelés. Ensuite, il fallait produire en plus grande quantité les gels d'exsudat de bar décongelé pour avoir suffisamment de matériel pour identifier les protéines composant ces spots. Le but était de collecter plus d'une trentaine de spots caractérisés afin d'identifier plus précisément les protéines composant ces spots. De plus, il fallait s'assurer qu'un autre manipulateur retrouverait bien des différences entre les deux conditions testées et que ces différences observées seraient les mêmes. Nous avons ensuite complété les analyses sur les critères de fraîcheur pour avoir au moins en triplicat toutes les valeurs pour chaque échantillon présenté dans le plan d'échantillonnage.

L'appropriation de la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle a duré plusieurs mois. Afin de gagner du temps, j'ai adapté la technique de dosage des protéines avant la

préparation des échantillons en dosant les protéines sur microplaque plutôt que dans des tubes à essai. Cette technique a permis de gagner du temps, précieux à cette étape de la préparation de l'échantillon car les exsudats ne sont pas encore mélangés au tampon de charge. Cette technique a également permis de gagner en précision car le coefficient de corrélation R^2 de la régression linéaire, permettant de calculer la concentration en protéines, a été amélioré.

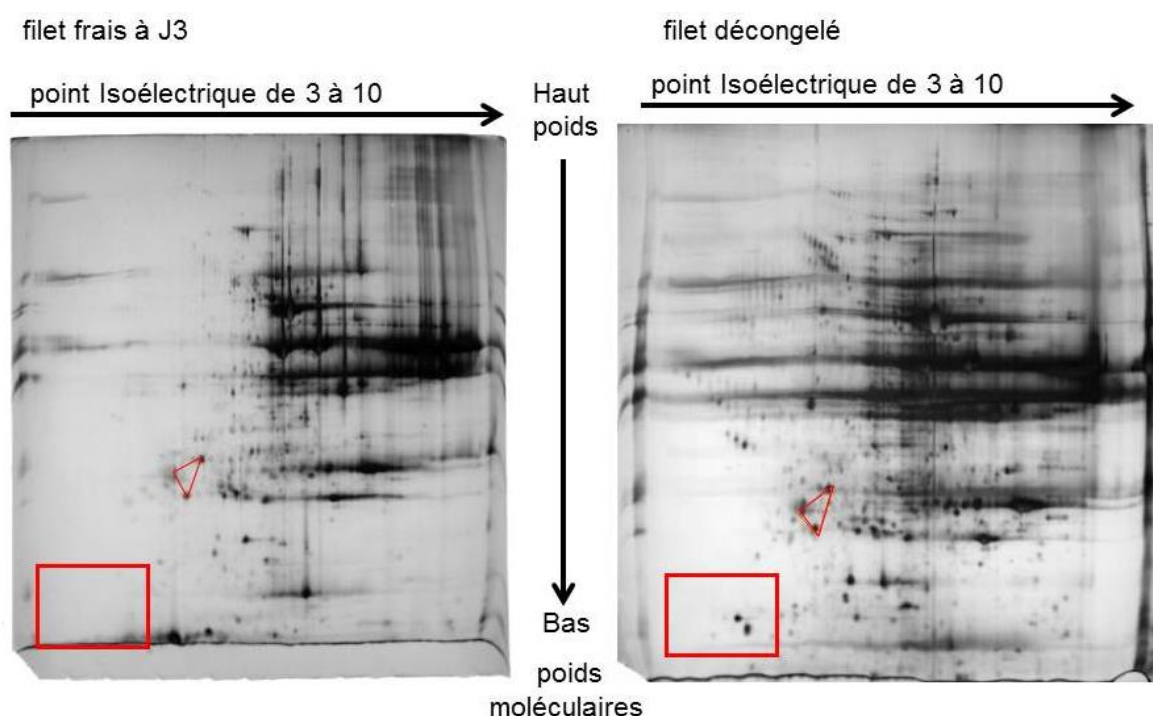
L'autre point important testé est la technique de coloration. Si la technique de coloration au nitrate d'argent est plus sensible que celle au bleu de Coomassie, elle entraîne des modifications des protéines qui peuvent compliquer l'identification des protéines par LC/MS/MS. Une technique hybride a été présentée dans une publication de Chevallet *et al.*, (2008). Cette technique avait l'avantage de ne pas utiliser de formaldéhyde, ce qui rendait les protéines colorées plus stables pour l'identification. Une dizaine de gels a été colorée par cette technique mais nous perdions en résolution, point fort de la coloration au nitrate d'argent. En conséquence, nous avons finalement gardé le même protocole que celui utilisé avant le début de ces essais.

1. Recherche d'un marqueur par électrophorèse bidimensionnelle et par techniques immunologiques

a. La recherche d'un marqueur par électrophorèse bidimensionnelle comparative sur le bar (*Dicentrarchus labrax*)

• *L'électrophorèse bidimensionnelle comparative*

Dans un premier temps, la présence de deux spots dans la région des bas poids moléculaires et des points isoélectriques faibles a été confirmée. Ces spots sont présents dans les exsudats de filet de bar décongelé mais pas dans les exsudats de filet de bar frais. Ces résultats ont été retrouvés plus d'une quarantaine de fois sur différents filets de bar et différents individus. On retrouve les spots d'intérêt dans le rectangle rouge de la Figure 33 page 92.

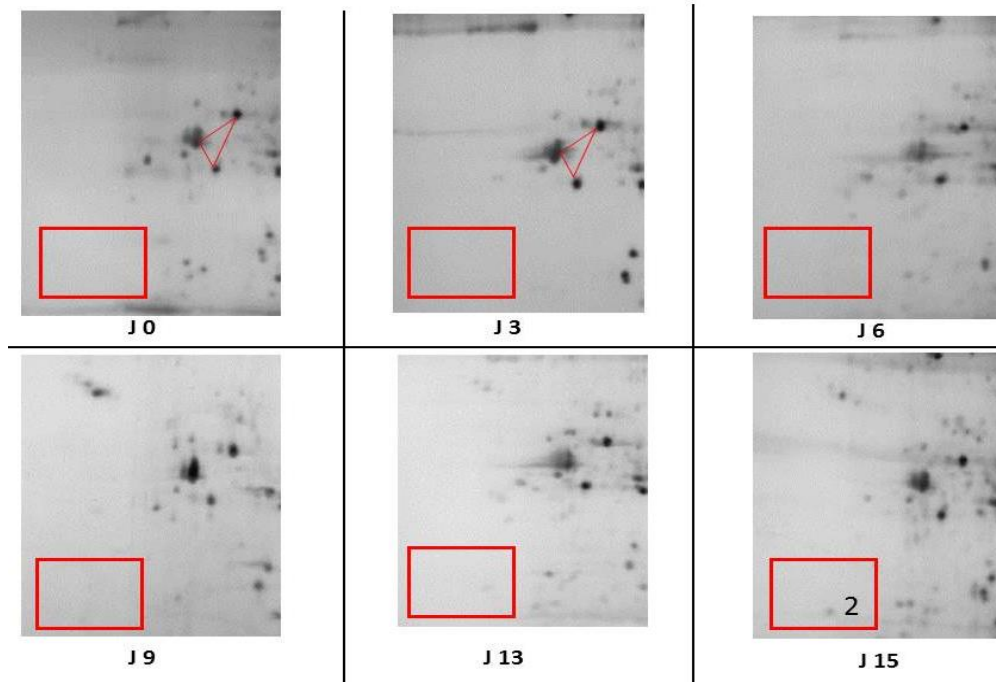


Gel d'électrophorèse bidimensionnelle : pHi 3-10, gel d'acrylamide à 12,5%. Coloration au nitrate d'argent. Le rectangle rouge représente la zone d'intérêt et le triangle rouge, les spots qui ont servi de repère pour comparer les deux images.

Figure 33 : Electrophorèse bidimensionnelle comparative de filets de bar frais vs décongelé

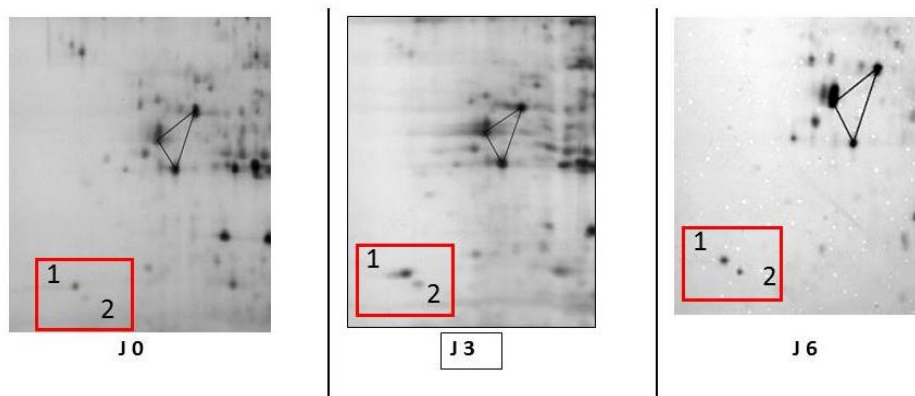
Les gels ont été reproduits à différentes dates de conservation après la mort du bar comme nous l'avons décrit dans la partie « matériels et méthodes » (Figure 28 page 70). Nous avons toujours observé l'absence des spots dans la zone d'intérêt pour les filets de bar qui avaient moins de 13 jours de conservation en condition fraîche, sur glace réfrigérée à 4 °C, proche des conditions de conservation des industriels.

Un zoom sur la zone d'intérêt du gel d'électrophorèse est présenté à différentes dates après la mort du bar. Les gels sont représentés dans la Figure 34 page 93 pour les filets frais et Figure 35 page 93 pour les filets décongelés.



Zooms sur les images des gels d'électrophorèse bidimensionnelle des exsudats des filets de bar frais à différentes dates après la mort du poisson. Le rectangle rouge encadre la zone d'intérêt. 2 indique la présence du spot 2 à J 15

Figure 34 : Zone d'intérêt des gels des filets de bar frais en fonction du temps post-mortem



Zooms sur les images des gels d'électrophorèse bidimensionnelle des exsudats des filets de bar congelés à différentes dates après la mort du poisson puis décongelés après une courte période de congélation. Le rectangle rouge encadre la zone d'intérêt et les étiquettes 1 et 2 correspondent aux noms donnés aux spots d'intérêt.

Figure 35 : zone d'intérêt des gels des filets de bar décongelés en fonction du temps post-mortem

Concernant le frais, l'absence des spots dans la zone d'intérêt (rectangle rouge, Figure 34, ci-dessus) a été confirmée. Sur tous les gels réalisés sur les exsudats de filet de bar entre J0 et J9, aucune trace des spots 1 et 2 n'a été trouvée, même en variant les contrastes avec le logiciel d'analyse PD Quest. Par contre, nous avons systématiquement retrouvé les spots d'intérêt 1 et 2 dans les gels d'électrophorèse 2D des exsudats de bar décongelé. Les

observations faites les années précédentes ont été confirmées. La réalisation de plus d'une cinquantaine de gels 2D sur les exsudats de bar décongelé nous a permis de collecter les spots 1 et 2 en quantité suffisante pour faire une identification (Figure 35 page 93).

Les deux spots ont été analysés par spectrométrie de masse, comme indiqué dans la « Matériels et méthodes ». D'autres gels ont été réalisés par le laboratoire LSMBO de Strasbourg sur le flétan. Les spots d'intérêt ont également été analysés. Ces résultats sur l'identification des protéines et les résultats sur les gels d'électrophorèse 2D sur le flétan (*Reinhardtius hippoglossoides*) seront présentés à la suite de l'analyse des critères de fraîcheur réalisée sur le bar.

• *Analyse des critères de fraîcheur*

Le but de cette analyse des critères de fraîcheur est de comparer les résultats par électrophorèse 2D à ceux obtenus par ces analyses de fraîcheur classiques. Cela nous a permis de nous assurer de la qualité des filets utilisés. Nous avons utilisé les critères les plus usités dans l'industrie agroalimentaire :

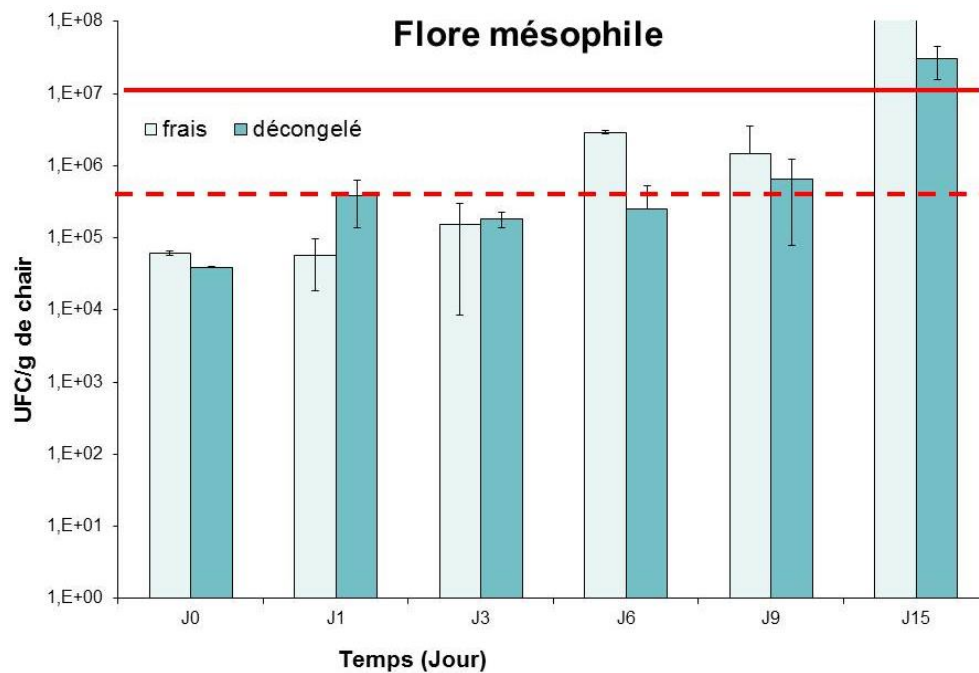
- Le dénombrement de la flore mésophile permet de connaître l'importance de la contamination microbienne d'un aliment.
- Les dosages de l'ABVT et de la TMA sont des indicateurs de l'état de fraîcheur du poisson simples et rapides à utiliser.
- Le dosage des amines biogènes est un indicateur plus pointu qui révèle un état d'altération avancé car les amines biogènes proviennent de la dégradation des acides aminés par les microorganismes.

Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec l'ANSES de Boulogne sur mer.

Le dénombrement de la flore mésophile

Toutes les conditions ont été analysées 3 fois dans ce laboratoire certifié pour ce type d'analyses. A chaque date, deux moyennes sont représentées : le poisson frais, le poisson décongelé après conservation à -20°C pendant 15 jours (Figure 36 page 95).

Résultats et discussion



Le dénombrement est réalisé sur un gramme de chair et exprimé en UFC/g (Unité Formant Colonie/g). n=3.

En bleu clair, les filets frais. En bleu cyan, les filets congelés à la même date, puis décongelés.

La ligne rouge pleine correspond à la limite de la méthode de dénombrement.

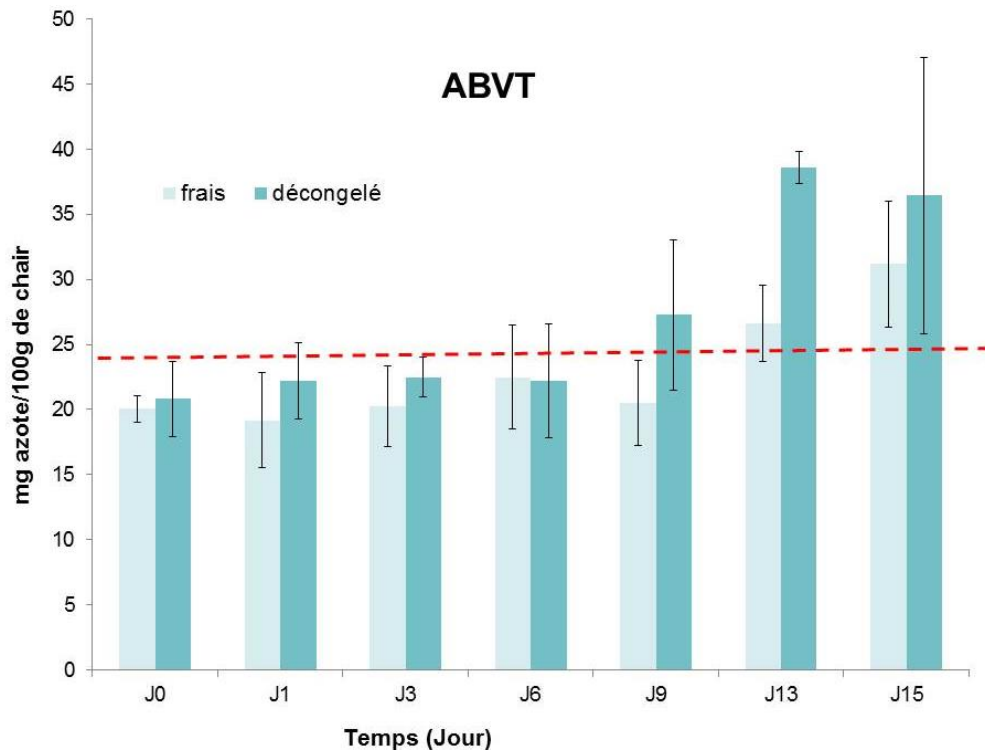
La ligne rouge pointillée correspond au seuil d'acceptabilité de la qualité du poisson.

Figure 36 : Evolution de la flore mésophile des filets de bar frais et décongelés

Les résultats sur la flore mésophile nous montrent que l'ensemble des flores des filets frais et décongelés restent inférieure à 500 000 UFC par gramme) jusqu'au 9^{ème} jour de conservation à 4°C, sous glace. Ils sont considérés comme acceptables.

Dosages de l'ABVT et de la TMA

Les résultats les plus significatifs proviennent des études de l'ABVT. Pour l'ensemble des échantillons, le rapport ABVT/TMA a été acceptable.



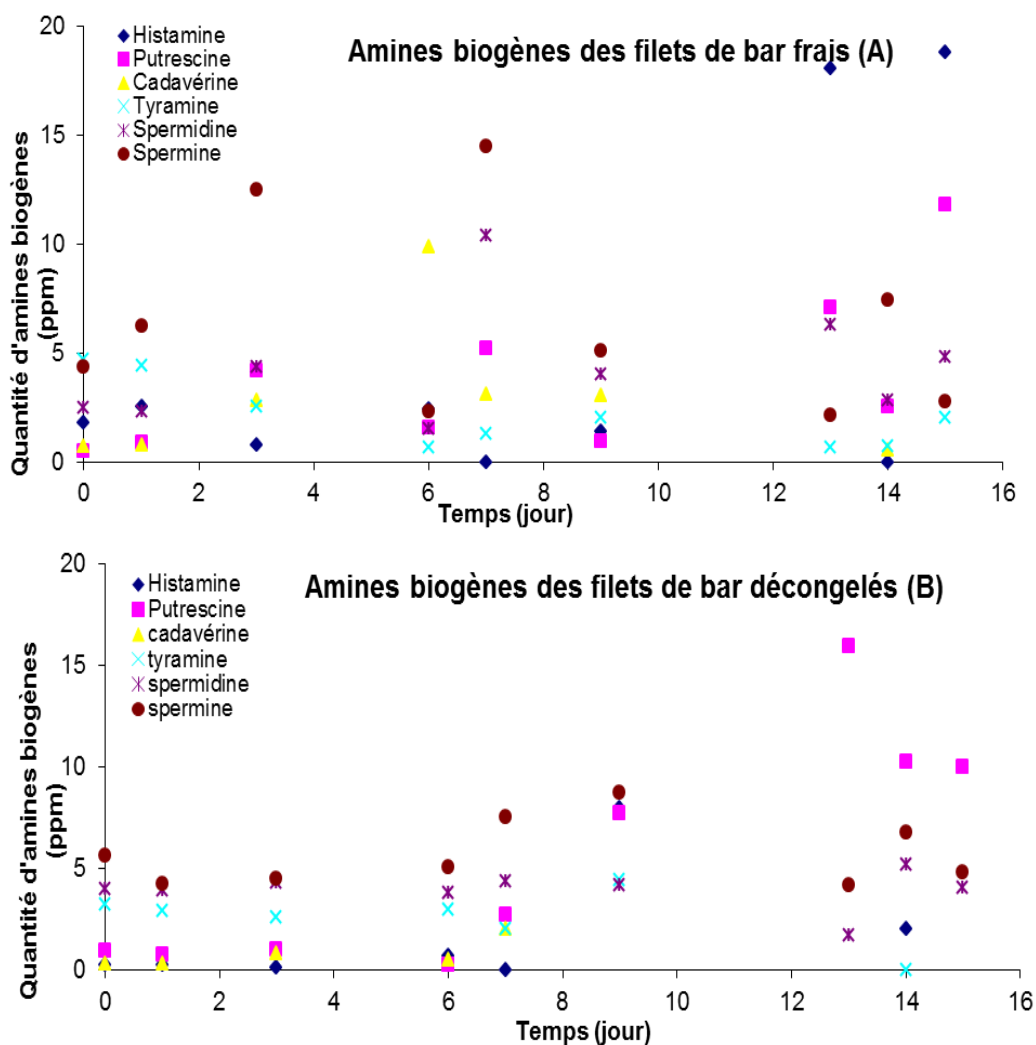
En bleu clair, les filets frais. En bleu cyan, les filets congelés à la même date, puis décongelés. n=3. La ligne rouge pointillée correspond au seuil d'acceptabilité de la qualité du poisson.

Figure 37 : Evolution de l'ABVT dans les filets de bar frais et décongelés

Les niveaux d'Azote Basique Volatil Total et de Tri-Méthyle Amine (ABVT et TMA) augmentent en fonction des dates de conservation et nous n'observons pas de différence significative entre les taux dans les filets frais et les taux dans les filets décongelés, tout comme cela a également été rapporté par Vinagre *et al.*, (2011) concernant le saumon argenté (*Oncorhynchus kisutch*). A partir de J9, les concentrations en ABVT révèlent un état de fraîcheur du filet non satisfaisant (au-delà de 25 ppm d'ABVT : ligne en pointillés rouges de la Figure 37). Mais le taux d'ABVT, utilisé seul, ne permet pas de conclure à un état de fraîcheur significatif (Castro *et al.*, (2006)). De ce fait, nous avons calculé le rapport TMA/ABVT comme le préconisent Malle et Tao, (1987). Ce rapport doit être inférieur à 17 % (voir Tableau I page 30) pour refléter un état de fraîcheur satisfaisant. Pour l'ensemble des échantillons, nous avons obtenu des rapports inférieurs à 17 % (satisfaisant), hormis pour l'échantillon de bar décongelé à J15 (20 % : acceptable).

Dosage des amines biogènes

Pour ce qui est des amines biogènes, des différences plus importantes apparaissent concernant trois amines sur les cinq étudiées. Bien que cette méthode soit critiquée comme critère de fraîcheur, le dosage des amines biogènes reste un bon indicateur de l'altération du poisson (Castro *et al.*, (2006)).



Les valeurs sont exprimées en ppm (partie par million) : μg d'amines biogènes par gramme de chair pour les filets frais et les filets décongelés ayant subi une congélation durant 15 jours.

Figure 38 : Evolution des concentrations en amines biogènes dans les filets de bar frais (A) et décongelés (B)

Discussion sur les analyses des critères de fraîcheur

Nous avons réalisé des tests de normalité sur les données provenant de l'ensemble des dosages (flore mésophile, ABVT et TMA, amines biogènes) et en avons déduit qu'aucune variable ne suivait de loi normale. Nous avons alors réalisé un test non paramétrique pour

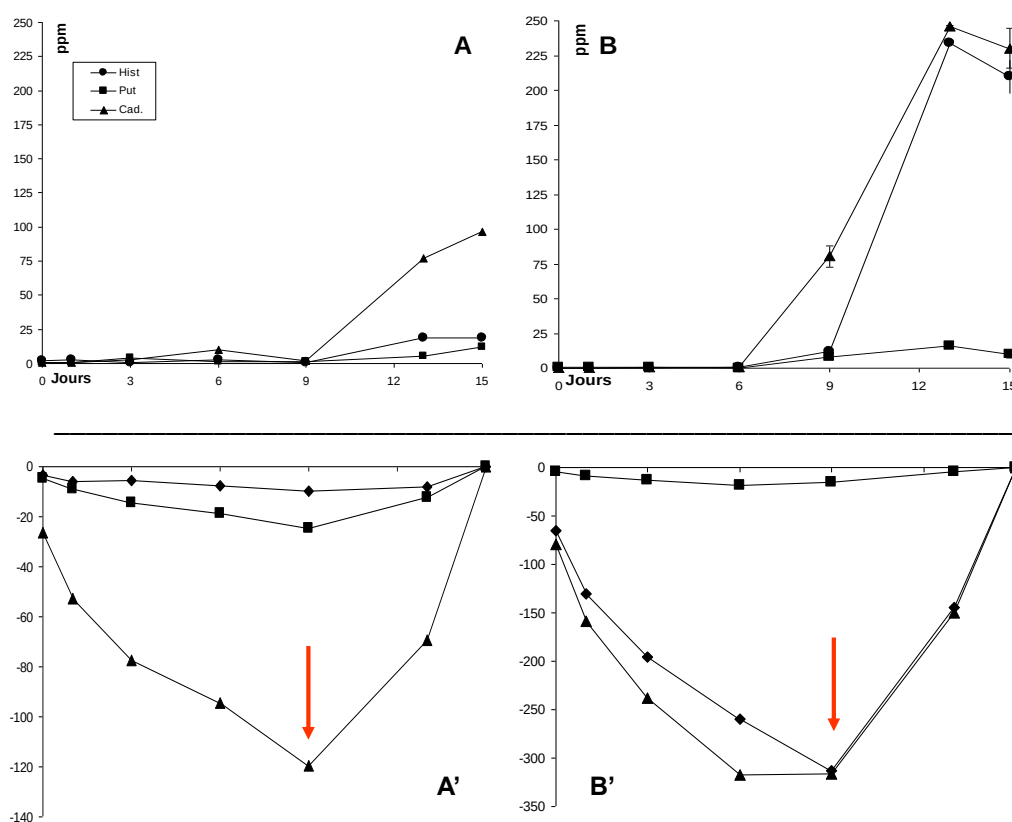
Résultats et discussion

discerner s'il y avait des différences significatives entre le poisson frais et le poisson décongelé, selon ces critères biochimiques et microbiologiques.

L'analyse de ces critères ne nous a pas permis de différencier les filets frais des filets décongelés. On note simplement une augmentation de la contamination microbienne et des indicateurs biochimiques de cette contamination, mais aucun ne donne de résultat statistiquement significatif.

L'ensemble des données obtenues par le dosage des amines biogènes nous donne des informations cohérentes mais qui ne nous permettent pas de différencier un filet de bar frais d'un filet de bar décongelé (Figure 38 page 97). Cependant, nous avons choisi de nous focaliser sur trois des amines biogènes dont l'évolution est la plus significative : l'histamine, la putrescine et la cadavérine (Figure 39 ci-dessous). Ces critères sont ceux qui représentent le mieux l'évolution de l'altération des filets dans les conditions expérimentales adoptées.

La Figure 39 nous indique que les évolutions des trois amines biogènes sont très similaires entre les filets frais (A) et les filets décongelés (B). On constate que les taux d'histamine et de cadavérine bondissent à partir de J9 (A et B).



Evolution de la concentration des amines biogènes (Hist. : Histamine, Put. : Putrescine, Cad. : Cadavérine) dans les filets de bar frais (A) et dans les filets de bar décongelés (B).

Courbes des sommes cumulées pour ces 3 variables dans les deux conditions « frais » (A') et « décongelé » (B'). La flèche rouge indique le point de rupture dans la cinétique.

Figure 39 : Evolution des concentrations en amines biogènes dans les filets de bar frais et décongelés

Comme le suivi a été discontinu (une analyse tous les trois jours), un calcul des sommes cumulées a été réalisé. Les courbes A' et B' de la Figure 39 nous montrent les résultats du calcul des sommes cumulées.

On note que la courbe de la cadavérine esquisse son inflexion avant les deux autres à J6. La date correspondant à un réel changement est le neuvième jour après la mort du poisson, que le poisson soit frais ou décongelé. Les taux atteints par l'histamine et la cadavérine sont plus importants dans les filets décongelés que dans les frais à partir de cette date, ce qui s'explique par le développement de la flore mésophile plus important dans les filets décongelés (Figure 36 page 95).

Cette étude nous donne des informations précieuses pour interpréter les résultats obtenus sur les gels 2DE. A compter du neuvième jour après la mort, que le poisson ait été conservé à l'état frais ou congelé/décongelé, l'état d'altération est trop avancé. Le poisson ne peut plus être considéré comme frais. Toute analyse de différenciation est alors inutile.

Synthèse des résultats de l'électrophorèse bidimensionnelle et de l'analyse des critères de fraîcheur

On constate que l'apparition des spots 1 et 2 dans les filets de bar décongelés dès J0 pourrait être utilisée comme marqueur d'une congélation. Ces spots n'apparaissent qu'à partir de J9 dans l'exsudat de filet frais mais à cette date, l'altération du bar est déjà très avancée et le poisson ne peut être considéré comme frais. L'apparition des spots 1 et 2 dans un exsudat de filet de bar dans un état de fraîcheur correct permet d'indiquer que le filet est un filet décongelé. L'état de fraîcheur dégradé apparaît à partir des dates symbolisées par une flèche rouge (Figure 40 ci-dessous). Nous pouvons donc essayer d'identifier les protéines qui composent ces spots pour savoir si elles peuvent servir de marqueurs.

Résultats et discussion

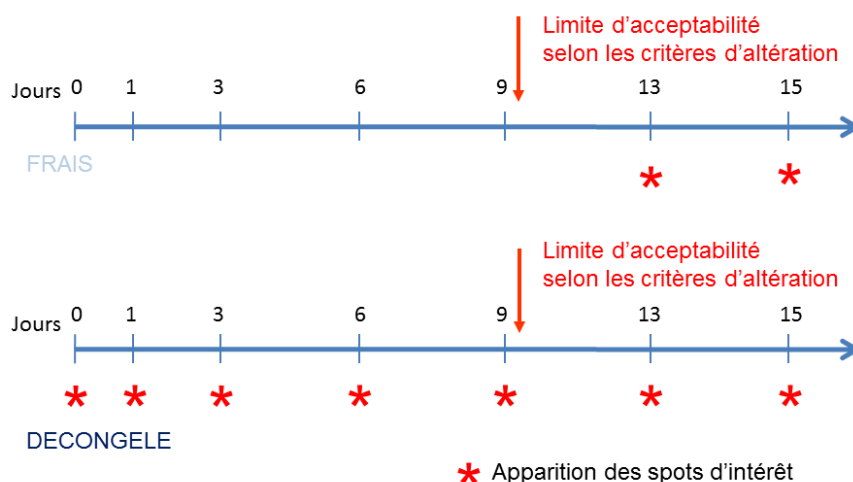


Figure 40 : Comparaison des cinétiques des critères de fraîcheur et de l'apparition des spots d'intérêt dans les profils 2D issus de filets de bar frais ou décongelés

• Identification des protéines composant les spots d'intérêt

Dans un premier temps nous avons les résultats de l'identification des spots obtenus avant les travaux de thèse (Tableau VIII ci-dessous).

Tableau VIII : Identification des spots par Mascot obtenue avant 2010

Spots	Résultat	Chez	Technique	Masse
1	parvalbumine α (A1)	<i>Cyprinus carpio</i> (Carpe)	Nano LC MS/MS	11313
2	Protéine inconnue (à caractériser)	-	Nano LC MS/MS	-

Ces identifications ont été réalisées au laboratoire LSBO de Strasbourg dans le cadre d'une collaboration scientifique. Les résultats de l'identification des protéines par les méthodes de novo et Mascot sont présentés dans le Tableau IX ci-dessous.

Tableau IX : Identification des protéines composant les spots 1 et 2 en 2010

Spot	Mascot/ de novo	Protein name	Protein accession numbers	Protein M.W. (Da)
Spot 1	Mascot	Parvalbumin α OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227,sp Q9I8V0	11433,4
Spot 1	Mascot	Parvalbumin α OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227,sp Q9I8V0	11433,4
Spot 1	Mascot	Parvalbumin α OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227,sp Q9I8V0	11433,4

Résultats et discussion

Spot 1	Mascot	Parvalbumin β OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=1	p P02618	11429
spot 2	Mascot	Parvalbumin α OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227,sp Q9I8V0	11433,4
	de novo	Parvalbumin β 542 (Arctic char)	Q8AYB4	
Spot 2	Mascot	Parvalbumin α OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227,sp Q9I8V0	11433,4
	de novo	Parvalbumin 2 (Kryptolebias marmoratus)	Q6B4H7	

Comme le séquençage du génome du bar n'est pas total, des identifications avec le génome d'autres espèces proches ont été réalisées. Dans les deux spots, la parvalbumine apparaît systématiquement. La position des spots, (Figure 33 page 92), correspond aux caractéristiques des parvalbumines (Carrera *et al.*, (2006), Chen *et al.*, (2006b)). Les spots sont en bas à gauche des gels, la zone des bas poids moléculaires et des points isoélectriques acides, ce qui correspond aux caractéristiques des parvalbumines. Huriaux *et al.*, (1996) avaient déjà identifié deux isoformes de parvalbumines : l'une a un point isoélectrique de $4,99 \pm 0,05$ et une masse moléculaire de 12,1 kDa, l'autre a un point isoélectrique de $4,54 \pm 0,03$ et une masse moléculaire de 11,6 kDa. Ces résultats sont cohérents par rapport à l'emplacement de nos spots. Depuis, Terova *et al.*, (2013) ont également identifié deux isoformes de parvalbumines chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) par électrophorèse bidimensionnelle couplée à une identification par spectrométrie de masse en tandem (voir Tableau X ci-dessous). Cette seconde publication donne des informations plus précises sur l'emplacement des parvalbumines sur les gels 2DE. Bien que le matériel utilisé soit différent, les spots se trouvent dans la même zone de gel que ce que nous avons pu déterminer. Il semblerait que Huriaux *et al.*, (1996) aient un peu surestimé les masses moléculaires et les points isoélectriques des parvalbumines, les techniques utilisées à l'époque n'étant pas si performantes.

Comme l'ont démontré par ailleurs Rogowska-Wrzesinska *et al.*, (2013), la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle et l'identification par spectrométrie de masse en tandem par à un séquençage de novo reste un moyen très efficace pour caractériser un protéome d'une espèce dont le génome n'a toujours pas été entièrement caractérisé.

Tableau X : masses moléculaires et points isoélectriques théoriques et pratiques des 2 isoformes de parvalbumines du bar

D'après Terova *et al.*, (2013)

parvalbumine	Théorique		Pratique	
	Point isoélectrique	Masse moléculaire (kDa)	Point isoélectrique	Masse moléculaire (kDa)
1	4,46	11,68	4,35	15
2	4,46	11,62	3,98	14

Les masses moléculaires trouvées dans notre étude sont assez proches de celles trouvées auparavant : 11,43 kDa. Voir Tableau IX page 100.

La parvalbumine est une protéine sarcoplasmique (cytoplasme des cellules musculaires). La congélation/décongélation lyse les membranes et libère le contenu de la cellule dans le milieu extracellulaire (Ayala *et al.*, (2005)). Les protéines solubles issues des différents compartiments subcellulaires affectés par ce phénomène se retrouvent dans l'exsudat, comme c'est le cas de l' α -glucosidase (Duflos *et al.*, (2002), Morel, (1979)). C'est donc assez naturellement que l'on retrouve la parvalbumine dans l'exsudat de filet décongelé et pas dans l'exsudat de filet frais ou simplement à partir du moment où l'altération du filet est trop avancée à J13. A partir de cette date, on retrouve la parvalbumine dans l'exsudat de filet frais car le tissu musculaire a subi l'effet de facteurs d'altération dus à l'activité microbienne.

L'ensemble des résultats cités ci-dessus font l'objet d'un article à soumettre dont la version de travail figure en Annexe 1 page 155.

Comme évoqué dans la première partie, la parvalbumine semble être un excellent candidat pour être un marqueur de différenciation. Elle résiste aux traitements thermiques et aux attaques des protéases. Les protéases sont en effet très actives après la mort du bar (Verrez-Bagnis *et al.*, (2001)).

Les parvalbumines ont déjà servi de marqueurs pour identifier des espèces de poissons entre elles (Carrera *et al.*, (2006), Etienne *et al.*, (2000), Rehbein *et al.*, (2000), Tilghman, (1996)). Leurs propriétés immunologiques en font un type de protéines identifiable par techniques immunologiques dans un exsudat de manière rapide et efficace afin de différencier un filet

frais d'un filet décongelé, dans la mesure où les résultats obtenus sur le bar seraient reproductibles pour d'autres espèces.

b. La recherche de parvalbumine dans l'exsudat par des méthodes immunologiques

Nous avons identifié les parvalbumines α et β dans les spots 1 et 2 de manière beaucoup plus sûre après la reproduction des résultats de l'étape précédente et l'identification par LC MS/MS des peptides (Tableau VIII et Tableau IX page 100). Comme dans l'étude antérieure de Huriaux *et al.*, (1996), nous observons dans le bar (*Dicentrarchus labrax*), deux types de parvalbumine qui ont des poids moléculaires et des pHi légèrement différents. Les gels 2D ont montré leur présence uniquement dans les exsudats de filets de bar décongelés. Nous avons également retrouvé la parvalbumine α avec des concentrations différentes entre le frais et le décongelé dans le flétan noir *Reinhardtius hippoglossoides* (voir paragraphe Etude par électrophorèse bidimensionnelle comparative sur le flétan noir : (*Reinhardtius hippoglossoides*) page 112).

Compte-tenu des propriétés immunologiques de cette protéine et étant donné les attentes des professionnels qui souhaiteraient un test d'authentification rapide, de l'ordre d'une demi-journée au plus, nous nous sommes dirigés vers un test ELISA pour détecter la présence des parvalbumines dans les exsudats. Ce test nous permettrait d'authentifier un filet de bar frais n'ayant pas subi de congélation/décongélation en cas d'absence de parvalbumine dans l'exsudat, d'autant plus que l'anticorps commercial PARV-19 permet de détecter les parvalbumines de poisson (Weber Patrick *et al.*, (2009)). L'optimisation d'un test ELISA permettrait son transfert technologique et son utilisation en routine y compris sur d'autres espèces.

• L'ELISA indirect

La méthode de dosage ELISA indirect est la plus simple à mettre en œuvre quand un anticorps spécifique à l'antigène, que l'on souhaite doser, existe. Plusieurs étapes ont été nécessaires pour mettre au point cette technique. En utilisant comme étalon la parvalbumine α de muscle blanc de lapin, nous obtenons une droite de régression semi-logarithmique. Nous avons utilisé la poudre de lait écrémé comme agent de saturation qui donne un bruit de fond légèrement moins élevé que l'albumine du sérum bovin. Les droites

étalon avec la parvalbumine α de lapin donnent toujours une bonne proportionnalité en échelle semi-logarithmique.

Par contre, les résultats obtenus sur les exsudats de bar ne sont pas reproductibles et même parfois inexploitable.

L'exsudat est un mélange complexe, ce qui peut fausser le dosage lors de l'étape de fixation des protéines sur le support plastique. Il y a une compétition qui se met en place entre les protéines de l'exsudat. Holzhauser et Vieths, (1999) recommandent de réaliser des ELISA par compétition sur les matrices alimentaires pour éviter ce genre de problème. Cette technique est utilisée pour doser les allergènes de la cacahuète dans divers aliments. Nous notons également que la gélatine de poisson est particulièrement compétitive pour se fixer sur les sites de liaison dans les puits des microplaques. Le collagène de poisson semble être le meilleur agent de saturation pour les dosage ELISA (Vogt Jr *et al.*, (1987)). La compétition entre protéines au moment de la fixation est peut-être en défaveur des antigènes que l'on souhaite doser, ce qui fausserait les résultats.

Nous notons également que le test ELISA est systématiquement positif pour les exsudats de bar frais mais nous ne pouvons savoir s'il s'agit d'une réaction croisée entre l'anticorps PARV-19 et une autre protéine de l'exsudat ou s'il s'agit de la présence de parvalbumine dans l'exsudat de filet frais, mais à une concentration plus faible.

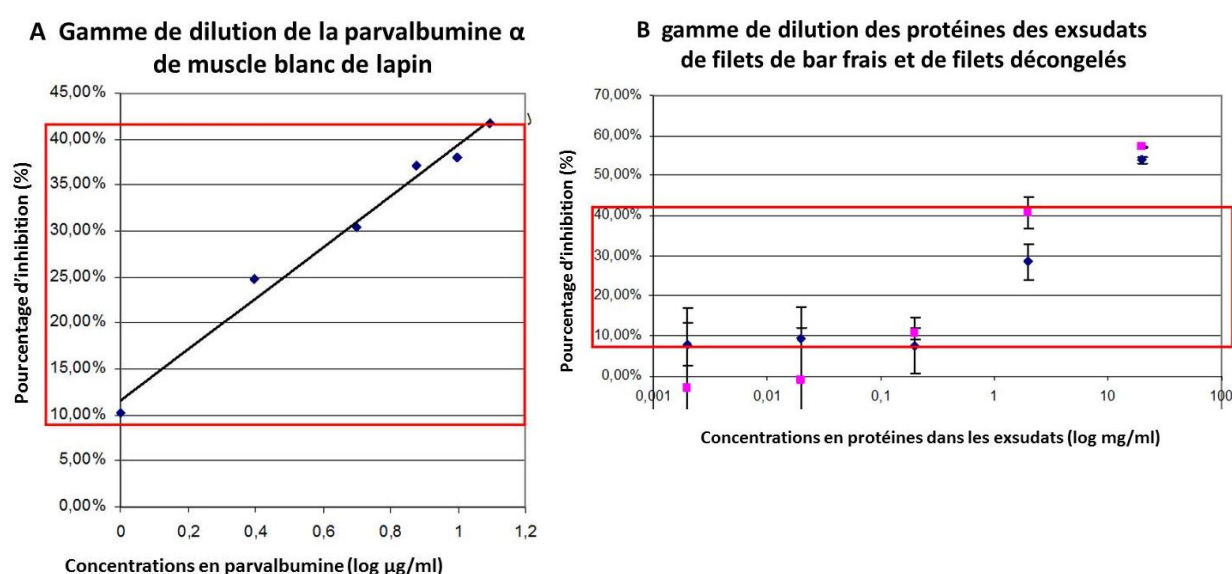
Ne sachant pas si l'anticorps PARV-19 réagit uniquement avec les parvalbumines, (dans ce cas, il faut se diriger vers une méthode d'analyse quantitative et non plus qualitative) ou si l'anticorps PARV-19 réagit avec d'autres protéines que la parvalbumine dans l'exsudat de poisson frais, nous avons décidé de mettre en œuvre d'autres analyses, notamment le test ELISA par compétition.

• *L'ELISA par compétition*

Pour mettre au point cette technique, il faut déjà avoir trouvé les conditions optimales de l'ELISA indirect. Ceci nous permet de savoir à quelle concentration nous aurons une réaction et donc une coloration maximale. Ces conditions ont été optimisées grâce à l'étape précédente. Nous avons mesuré l'inhibition de la réaction en faisant réagir l'anticorps primaire avec les échantillons avant de le déposer dans les puits saturés en antigène. Nous

nous libérons ainsi de l'étape de compétition qui existe entre les protéines de l'échantillon pour être absorbé par le support en plastique (Figure 30 page 79).

Le pourcentage d'inhibition est calculé pour différentes concentrations connues (Figure 41.A page 105). Nous réalisons alors la régression semi-logarithmique pour déterminer la courbe étalon. La droite ne peut être utilisée qu'entre 10 et 45 % d'inhibition car la régression linéaire n'est acceptable qu'entre ces points. Deux dilutions rentrent dans cette gamme (Figure 41.B). Mais ces deux dilutions donnent des résultats contradictoires : la concentration dans l'exsudat du filet frais peut être supérieure ou inférieure à celle de l'exsudat du filet décongelé selon les dilutions de protéines.



A : losange bleu : dilution de la parvalbumine α . Rectangle rouge : zone de proportionnalité

B : losange bleu : exsudat frais, carré rose : exsudat décongelé. Rectangle rouge : zone de proportionnalité

Figure 41 : Dosage de la parvalbumine par ELISA par compétition

Cette manipulation a été réalisée plus de dix fois, mais les résultats sur de mêmes exsudats varient. Le manque de reproductibilité et de répétabilité nous ont conduit à constater l'échec de cette méthode pour doser la parvalbumine dans les exsudats avec cet anticorps. Weber Patrick *et al.*, (2009) proposent d'utiliser une régression paramétrique à quatre paramètres pour pouvoir améliorer l'analyse des données. Ils démontrent que le risque de voir l'anticorps PARV-19 réagir avec d'autres protéines que la parvalbumine est important. Dans leur étude, les auteurs travaillent sur des produits très raffinés pour doser la parvalbumine : les gélatines de poissons utilisées comme agents de clarification dans la production de bière, par exemple.

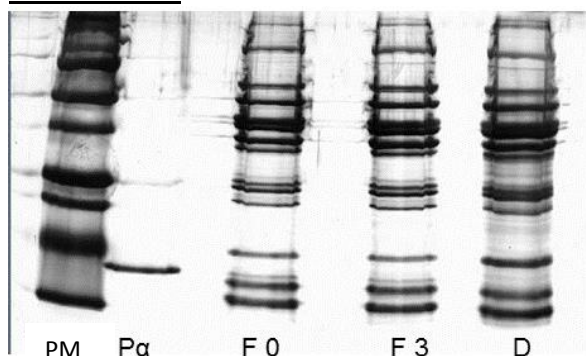
Dans notre étude, nous notons une constante. L'anticorps réagit toujours avec des protéines dans l'exsudat de filet frais. L'antigène utilisé pour faire la gamme de dilution et pour saturer les puits est la parvalbumine α de lapin. Les différences entre la parvalbumine de lapin et celle de poisson sont peut-être trop importantes pour être utilisées en tant qu'étalon pour la gamme de dilution. Nous constatons aussi que l'anticorps utilisé réagit différemment selon l'espèce dont est extrait la parvalbumine, même lorsqu'il s'agit d'espèces de poisson telles que l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), le lieu noir (*Pollachius virens*), l'esturgeon (*Acipenser sturio*), le cabillaud (*Gadus Morhua*), le merlu (*Merluccius merluccius*) ou le tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Weber Patrick *et al.*, (2009)).

Enfin, il a été décrit que l'anticorps utilisé dans cette étude donne des absorbances différentes en fonction de la présence de calcium ou de la présence d'EGTA (agent chélateur du calcium). Le changement de configuration de la protéine liée ou non liée au calcium est tellement important que les anticorps réagissent différemment (Bugajska-Schretter *et al.*, (2000), Koppelman *et al.*, (2010)). Il s'avère donc difficile de réaliser un dosage précis par méthode ELISA par compétition sans maîtriser la concentration en calcium. C'est peut être une des raisons pour lesquelles nous obtenons des différences très importantes lors de nos dosages pour une même condition. Cela nous a conduit à envisager des manipulations permettant de doser le calcium (voir paragraphe « Le dosage du calcium libre et le dosage des nucléotides et de leurs dérivés » page 123).

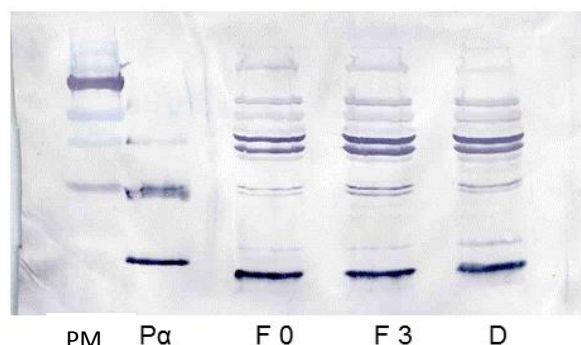
c. SDS PAGE et Western Blots des exsudats de filets de bar frais et décongelés

Les ELISA ne nous ayant pas permis d'obtenir les résultats escomptés sur la différenciation frais/décongelé, nous avons décidé d'effectuer un Western Blot à partir des exsudats de filets de bar frais à J0 et J3, ainsi qu'à partir d'un exsudat de filet congelé à J3 puis décongelé après 10 jours de conservation à -20°C en utilisant l'anticorps PARV-19 (Figure 42.B page 107). Ce Western Blot avait été précédé d'un SDS PAGE sur ces mêmes protéines (Figure 42.A).

A : SDS-PAGE



B : Western Blot



A : SDS-PAGE des exsudats de bar. PM : échelle des poids moléculaires, Pα : parvalbumine α de muscle blanc de lapin, F0 : exsudat de filet frais à J0, F3 : exsudat de filet frais à J3 et D : exsudat de filet décongelé

Remarques : SDS page : gel d'acrylamide à 16 % coloré au nitrate d'argent.

B : Western Blot du SDS-PAGE décrit en A, révélé par l'anticorps PARV-19

Figure 42 : SDS-PAGE et Western Blot des exsudats de filets de bar frais et décongelés

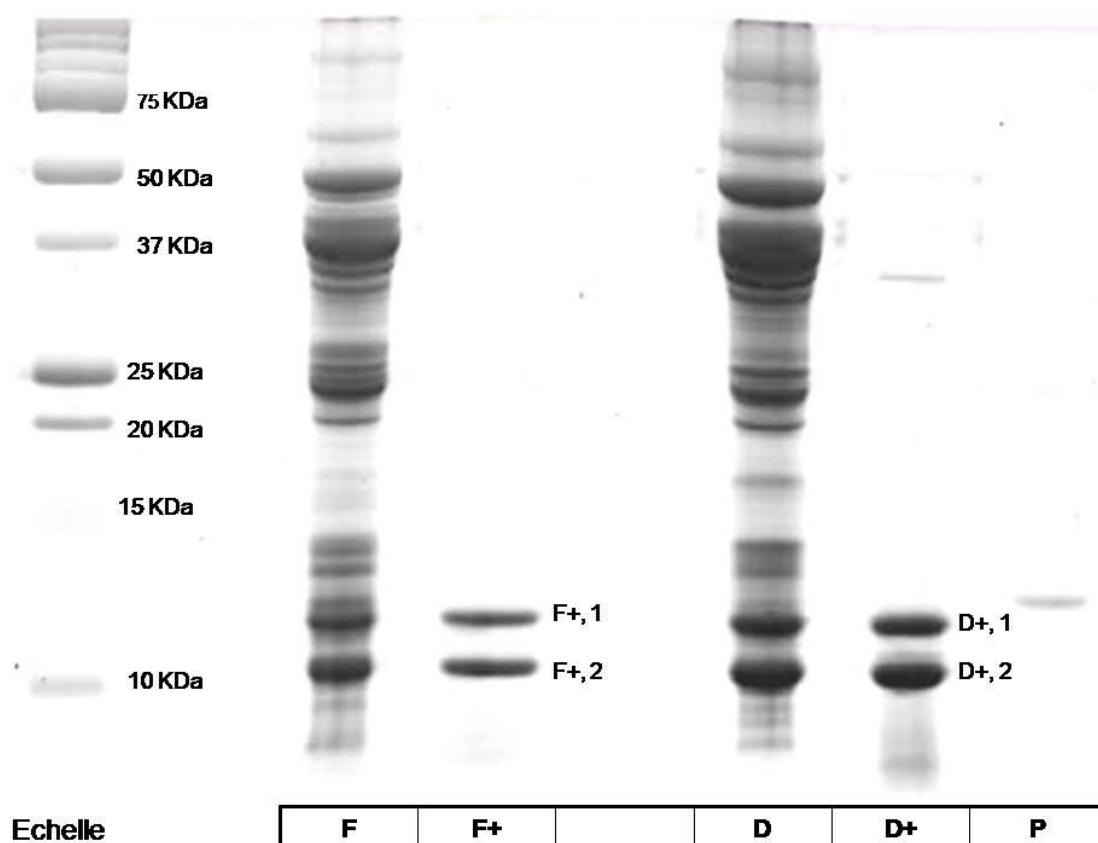
Grâce au témoin positif (Pα) constitué de la parvalbumine α de muscle blanc de lapin, le Western Blot nous permet de caractériser les parvalbumines dans les exsudats de bar révélés par l'anticorps PARV-19 (Figure 42 page 107).

Il est à noter que l'anticorps PARV-19 réagit également avec des protéines de plus haut poids moléculaire tels que l'avaient montré Galland *et al.*, (1998) et Chen *et al.*, (2006c). L'anticorps utilisé ne semble donc pas être très spécifique. Beale *et al.*, (2009) ont démontré que cet anticorps reconnaissait le motif « EF hand » à l'origine du caractère allergène que l'on retrouve sur d'autres protéines. On note d'ailleurs que beaucoup de patients allergiques au pollen le sont également au poisson (Wopfner *et al.*, (2007)). Le point commun entre ces deux allergènes est le motif « EF-hand ». Les autres protéines détectées dans les exsudats pourraient simplement être des protéines contenant le motif « EF-hand », comme la troponine C (Demaille *et al.*, (1974), Francois *et al.*, (1997)). Ce qui explique que nos résultats précédents obtenus par technique ELISA n'étaient pas satisfaisants dans les conditions expérimentales adoptées.

d. SDS PAGE et Western Blots des exsudats de filets de bar frais et décongelés traités thermiquement

- *SDS PAGE des exsudats de filets de bar frais et décongelés traités thermiquement*

Les parvalbumines sont des protéines thermorésistantes. Afin d'éliminer les protéines de haut poids moléculaire réagissant avec l'anticorps PARV-19, nous avons effectué un traitement thermique des protéines des exsudats de filets de bar frais (J3) et décongelés. Puis, nous avons procédé à un SDS PAGE de ces exsudats issus de filets frais et décongelés, révélé au bleu de Coomassie (Figure 43 page 109). Nous avons pu quantifier l'intensité des bandes de bas poids moléculaire (Tableau XI page 109) correspondant aux exsudats traités thermiquement (F^+ ou D^+). Les courbes des intensités ont été obtenues avec le logiciel Quantity One de Biorad. La Figure 43 montre bien la différence d'intensité qui existe entre les pistes F^+ et les pistes D^+ . Le ratio des rapports d'intensité des bandes D^{+1} / F^{+1} est de 1,44 et celui de D^{+2} / F^{+2} est de 1,59 (Tableau XI). Les intensités des bandes D^+ sont supérieures aux intensités des bandes F^+ . Ces bandes se trouvent entre 10 et 15 kDa selon l'échelle des marqueurs de taille et sont proches de la masse moléculaire de la parvalbumine α de lapin (P) qui est de 11,9 kDa (Figure 43).



SDS-page : coloration au bleu de Coomassie, gel à 14 % d'acrylamide. Pistes : Echelle : poids moléculaires des marqueurs de taille. F : exsudat de filet de bar Frais. F⁺ : le même exsudat traité thermiquement. D: exsudat de filet de bar Décongelé. D⁺ : le même exsudat traité thermiquement. P : parvalbumine α de lapin

Figure 43 : SDS-page des exsudats de filets de bar frais et décongelés, traités ou non traités thermiquement

Tableau XI : Intensité des bandes du SDS-page de la Figure 43

	Exsudat de filet frais traité thermiquement F ⁺ Abs.mm ⁻²	Exsudat de filet décongelé traité thermiquement D ⁺ Abs.mm ⁻²	Ratios frais/décongelé
Bandes 1	F ⁺ 1 : 3,5152	D ⁺ 1 : 5,0816	1,445
Bandes 2	F ⁺ 2 : 4,4161	D ⁺ 2 : 7,0269	1,591
Total	7,9313	12,1085	1,526

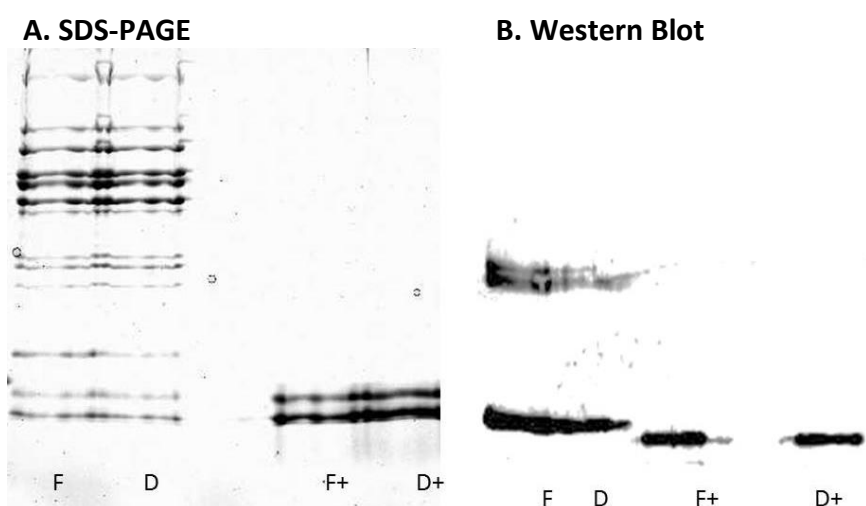
Abs : absorbance

• *Western blot des exsudats de filets de bar frais et décongelés traités thermiquement*

Afin de déterminer si les bandes des exsudats traités thermiquement (Figure 43 page109) réagissent avec l'anticorps PARV19, nous avons réalisé un Western Blot à partir du SDS PAGE précédent. Grâce au témoin positif (P α) constitué de la parvalbumine α de muscle blanc de lapin, le Western Blot nous permet de caractériser les parvalbumines dans les exsudats de

bar traités thermiquement et révélés par l'anticorps PARV-19. Il s'avère que parmi les deux bandes de bas poids moléculaire révélées par SDS PAGE, ce sont les bandes proches de 12 kDa qui réagissent le mieux avec l'anticorps PARV-19.

En conclusion, le traitement thermique des exsudats de filets de bar frais ou décongelés permet de purifier partiellement la parvalbumine de bar. Ce résultat sera exploité dans le paragraphe « Traitement thermique des exsudats » page 120.



A : SDS-page : coloration au bleu de Coomassie, gel à 14 % d'acrylamide. Pistes : F : exsudat de filet de bar Frais. D: exsudat de filet de bar Décongelé. F⁺ : le même exsudat traité thermiquement. D⁺ : le même exsudat traité thermiquement.

B : Western Blot du SDS-PAGE décrit en A, révélaté par l'anticorps PARV-19

Figure 44 : SDS-PAGE et Western Blot des exsudats de filets de bar frais et décongelés, traités ou non traités thermiquement

Le Western Blot met en évidence que les bandes du SDS-PAGE correspondant aux protéines des exsudats de filets de bar frais et décongelés (F⁺ et D⁺) sont révélées par l'anticorps PARV-19 (Figure 44 ci-dessus).

e. Purification des parvalbumines du bar (*Dicentrarchus labrax*)

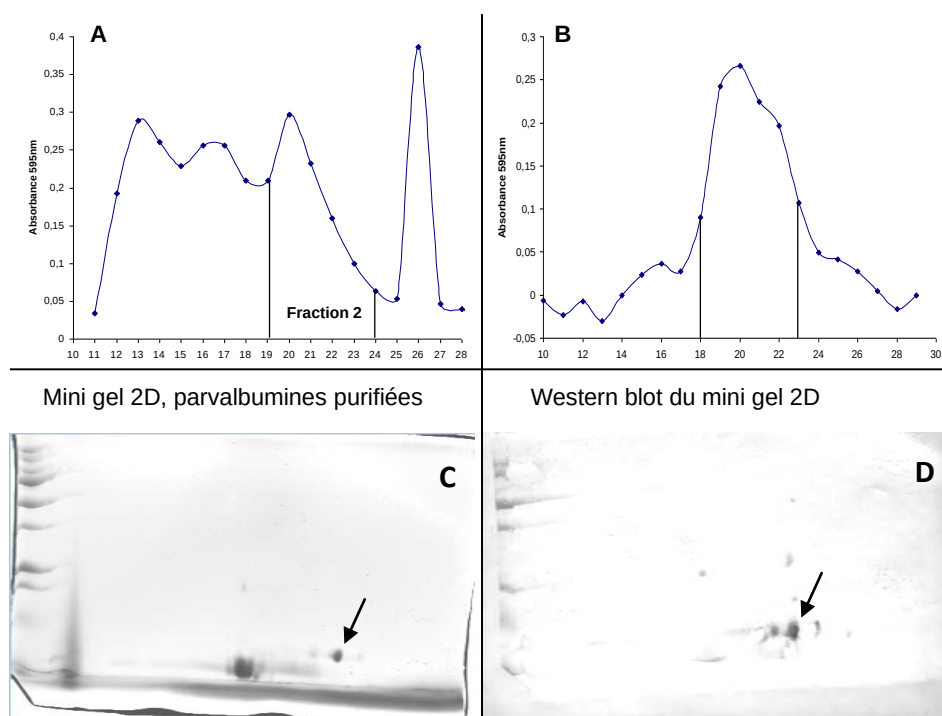
Nous avons décidé de purifier les parvalbumines de bar (*Dicentrarchus labrax*) afin de déterminer comment réagissait précisément l'anticorps PARV-19 avec ces protéines. De plus, il nous semblait important de réaliser nos gammes étalon à partir des parvalbumines de bar et non à partir de celles de lapin.

La purification est réalisée en utilisant les propriétés des parvalbumines de résistance aux hautes températures (Arif, (2010), Weber Patrick *et al.*, (2009)).

La chromatographie est réalisée en deux phases. La première permet de sélectionner les protéines de petite taille dans la fraction 2 (Figure 45 page 111, courbe A, fraction 2). Nous

Résultats et discussion

obtenons principalement dans cette fraction des protéines dont la taille oscille entre 5 et 15 kDa. Ces protéines sont éluées une deuxième fois sur la colonne, afin d'optimiser la purification. La fraction située entre la 18^{ème} et le 23^{ème} tube (Figure 45, courbe B) est dialysée et lyophilisée avant d'être utilisée pour effectuer un mini gel 2D (Figure 45.C). Un Western blot (Figure 45.D) issu de ce gel 2D est réalisé, ce qui permet de les identifier comme l'ont décrit précédemment Chen *et al.*, (2006a). La flèche noire indique d'une part la parvalbumine sur le gel 2D révélé au bleu de Coomassie (Figure 45.C) et d'autre part la parvalbumine révélée par l'anticorps PARV-19 sur le Western blot qui en découle (Figure 45.D).



A : premier chromatogramme permettant de purifier la fraction 2, contenant les parvalbumines.

B : deuxième chromatogramme permettant d'optimiser la purification de la fraction récupérée précédemment (fraction 2 du graphe A).

C : mini gel 2D des parvalbumines purifiées constitué d'un gel d'acrylamide à 18 % avec un pHi entre 3 et 6. Coloré au bleu de Coomassie.

D : western blot révélé par l'anticorps PARV-19.

Flèche noire : Indication de la parvalbumine

Figure 45 : Purification des parvalbumines du bar (*Dicentrarchus labrax*)

La méthode de purification partielle de la parvalbumine a été optimisée. Ces résultats constituent une première étape dans l'optique de produire des anticorps à partir de parvalbumines de bar dans le but d'obtenir un anticorps plus spécifique.

f. Etude par électrophorèse bidimensionnelle comparative sur le flétan noir : (*Reinhardtius hippoglossoides*)

Afin de conforter des résultats encourageants sur le bar *Dicentrarchus labrax*, nous avons décidé de tester quelques échantillons d'une espèce à haute valeur ajoutée dont les industriels suspectent régulièrement des fraudes. Il s'agit du flétan noir ou flétan du Groenland : (*Reinhardtius hippoglossoides*).

En contact avec un importateur de poisson, Monsieur Henri HELLIN (Viviers Marins, Boulogne sur mer), qui maîtrise sa chaîne d'approvisionnement, nous nous sommes procuré un flétan noir entier lors de sa saison de pêche. La qualité du poisson a été certifiée par la responsable qualité de cette entreprise comme un poisson ayant moins de trois jours de capture selon les critères d'analyse sensorielle. Ceci a été confirmé par la fiche de traçabilité du produit qui nous indiquait que le poisson était parti un jour plus tôt de Norvège, son lieu de capture. Les filets ont été préparés par les employés de l'usine Viviers Marins. Une étude des critères de fraîcheur a été réalisée avec l'ANSES. Nous avons réalisé un dosage de l'ABVT et de la TMA ainsi qu'un dénombrement de la flore mésophile. Les résultats correspondaient à ceux d'un poisson frais.

Les analyses n'ont été effectuées que sur un seul spécimen, contrairement au bar. En effet, l'approvisionnement est plus compliqué que pour le poisson d'élevage compte tenu de sa saisonnalité et de sa rareté.

Le but de l'étude de ces échantillons consistait à déceler si nous observions également des différences de profil 2DE entre un filet de flétan frais et un filet décongelé.

Suite aux résultats obtenus sur le bar (*Dicentrarchus labrax*), qui nous ont permis d'identifier la parvalbumine comme étant un bon marqueur pour différencier le frais du décongelé, nous avons traité thermiquement les exsudats de façon à l'enrichir en parvalbumine, protéine thermorésistante (Arif, (2010)).

Nous avons ensuite envoyé nos échantillons traités et non traités thermiquement aux partenaires du laboratoire LSMBO de Strasbourg. Cela nous a permis de différencier les profils des gels d'électrophorèse 2D entre les exsudats traités thermiquement des filets frais et des décongelés, Tableau XII, ci-dessous.

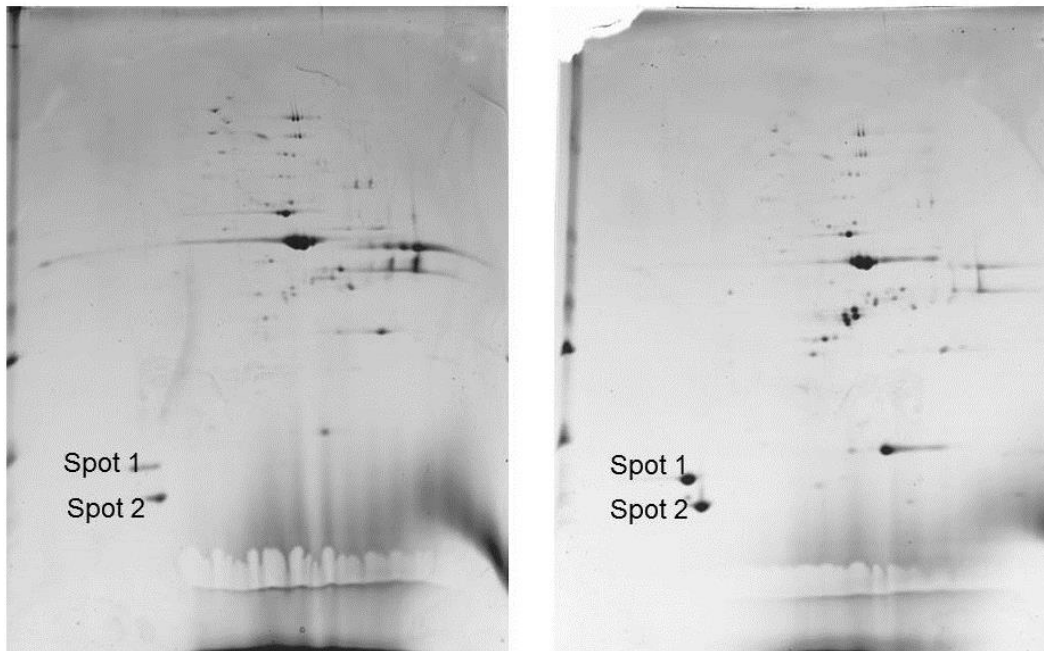
Tableau XII : Liste des échantillons de flétan préparés pour des analyses par électrophorèse bidimensionnelle.

N°	Nom	Exsudat de filet de flétan noir
1	FNF	Flétan noir Frais
2	FNC	Flétan noir Congelé (15 jours)
3	FNF ⁺	Flétan Noir Frais traité thermiquement (+)
4	FNC ⁺	Flétan Noir Congelé traité thermiquement (+)

Le LSMBO a traité nos échantillons selon leur propre mode opératoire. Les échantillons 1 et 2 ont été complétés à 400 µl avec du tampon de focalisation. Les échantillons 3 et 4 ont été lyophilisés et repris dans 400 µl de tampon de focalisation (8M Urée ; 2 M Thiourée ; 4 % Chaps ; 1 % DTT ; Inhibiteur de protéase ; TLCK ; 2 % Pharmalyte).

- Pour les gels réalisés sur les exsudats non traités thermiquement (gels 1 et 2), la première dimension a été effectuée sur bandelette pH 3-10, avec un voltage final de 85 464 Vh. La deuxième dimension a été réalisée sur gel en gradient 8-20 %, coloration au bleu de Coomassie.
- Pour les gels réalisés sur les exsudats traités thermiquement (gels 3 et 4), la première dimension a été effectuée de façon identique. La deuxième dimension a été réalisée sur gel en gradient 8-18 %, coloration bleu de Coomassie car ces gels sont enrichis en parvalbumine de faible poids moléculaire.

• *Résultats sur le flétan*



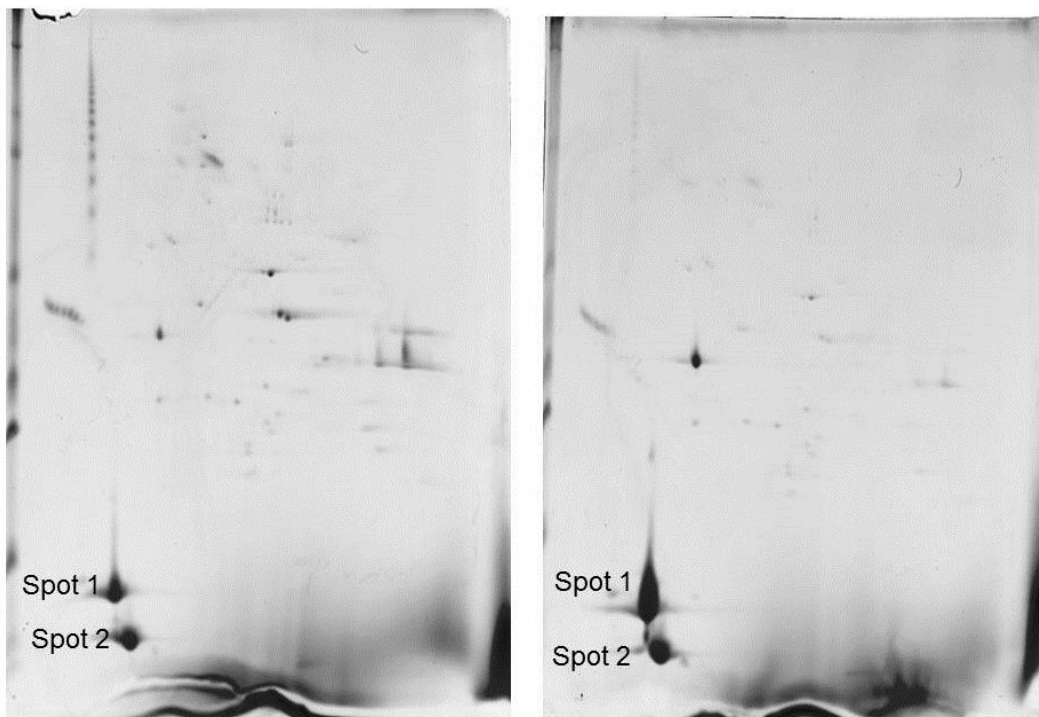
N°1 : FNF (coloration bleu de Coomassie)

N°2 : FNC (coloration bleu de Coomassie)

FNF : Flétan noir Frais

FNC : Flétan noir Congelé (15 jours)

Figure 46 : Gels d'électrophorèse bidimensionnelle sur les exsudats non traités thermiquement de flétan noir (*Reinhardtius hippoglossoides*)



N°3 : FNF⁺ (coloration bleu de Coomassie)

N°4 : FNC⁺ (coloration bleu de Coomassie)

FNF⁺ : Flétan Noir Frais traité thermiquement (+)

FNC⁺ : Flétan Noir Congelé traité thermiquement (+)

Figure 47 : Gels d'électrophorèse bidimensionnelle sur les exsudats traités thermiquement de flétan noir (*Reinhardtius hippoglossoides*)

Cette étude complémentaire sur le flétan du Groenland, même partielle, est encourageante. Nous observons des différences de profils entre filet de flétan noir frais et filet décongelé (Figure 46, n°1 et n°2 page 114). Le traitement thermique des exsudats permet de sélectionner des protéines à analyser et permet également de voir des différences entre filet de flétan noir frais et filet décongelé (Figure 47, n°1 et n°2 page 114).

Les gels révélés au bleu de Coomassie permettent de différencier des filets de flétan noir frais de filets décongelés contrairement aux filets de bar pour lesquels une coloration au nitrate d'argent était nécessaire pour observer de telles différences.

Dans le cas présent, nous observons que les spots 1 et 2 identifiés au bleu de Coomassie sont présents à la fois dans les filets de flétan noir frais et les filets décongelés mais à des intensités différentes (Figure 46, n°1 et n°2 et Figure 47, n°1 et n°2).

L'identification des spots 1 et 2 (Tableau XIII page 115) permet de caractériser la parvalbumine α .

Tableau XIII : Identification des spots d'intérêt sur les échantillons de flétan du Groenland

Biological sample name	Protein name	Total number of peptides	Protein molecular weight (Da)
Spot 1	Parvalbumin α OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	2	11 433,40
Spot 2	Parvalbumin α OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	2	11 433,40

• *Bilan sur la caractérisation d'un marqueur protéique potentiel*

Le Tableau XIV page 116 synthétise nos résultats pour le bar et le flétan concernant la caractérisation d'un marqueur protéique de différenciation frais/décongelé par électrophorèse bidimensionnelle et techniques immunologiques.

Les résultats obtenus pour le bar en électrophorèse bidimensionnelle n'ont pas été corroborés par la technique ELISA. En effet, alors que les gels d'électrophorèse bidimensionnelle mettaient en évidence l'absence de parvalbumine dans les filets frais jusque J 13, les techniques immunologiques ne nous ont pas permis d'obtenir une telle discrimination entre le frais et le décongelé, mais elles ont révélé des différences d'intensité de la caractérisation de la parvalbumine. Ainsi, il s'avère plus difficile de mettre au point un

test rapide de différenciation en utilisant la parvalbumine comme marqueur concernant le bar.

Tableau XIV: Synthèse des résultats obtenus avant fin 2012

Techniques utilisées	Exsudat de filet frais	Exsudat de filet décongelé
Electrophorèse 2D sur le bar <i>Dicentrarchus labrax</i> (coloration au nitrate d'argent)	Absence de spots dans la zone d'intérêt jusque J13	Présence de spots et identification de la parvalbumine
Electrophorèse 2D sur le flétan noir, <i>Reinhardtius hippoglossoides</i> (coloration au bleu de Coomassie)	Intensité faible des spots dans la zone d'intérêt	Intensité des spots deux fois plus importante et identification de la parvalbumine
Electrophorèse 2D sur le flétan noir (coloration au bleu de Coomassie) sur des exsudats traités thermiquement	Présence de spots à faible intensité dans la zone d'intérêt correspondant à la parvalbumine	Présence de ces mêmes spots à des intensités plus importantes dans la condition décongelé
ELISA par compétition	Présence de parvalbumine	Présence de parvalbumine en quantité double
SDS-PAGE sur les exsudats traités thermiquement, coloration bleu de Coomassie	Présence des deux bandes entre 10 et 15 KDa positif à l'anticorps PARV-19	On retrouve les deux mêmes bandes avec une intensité plus importante

La parvalbumine a également été caractérisée en tant que marqueur quantitatif de différenciation frais/décongelé pour le flétan noir.

Ce ne sont pas les mêmes espèces. Les protocoles expérimentaux ne sont pas identiques. Cependant, la parvalbumine apparaît comme un bon marqueur protéique potentiel pour différencier un filet frais d'un filet décongelé concernant ces deux espèces. Il serait intéressant de tester d'autres espèces de poisson maigre à haute valeur ajoutée pour conclure à l'éventualité de cette protéine en tant que marqueur ubiquitaire de poisson maigre.

Enfin, dans le Tableau XIV ci-dessus, il apparaît clairement que ce n'est pas un simple test qualitatif qui permettra de différencier les deux conditions de conservation mais bien un test quantitatif. Les modes d'analyse précédemment utilisés étaient réalisés sur une quantité de protéines ou sur un volume d'exsudat relatif à une quantité de chair prélevée. Nous constatons qu'il y a toujours plus de protéines libérées dans les exsudats de poisson décongelé que dans ceux de poisson frais. Cette variable peut également être mesurée.

C'est pourquoi nous avons décidé de travailler, non pas sur un seul marqueur tel que la parvalbumine, mais sur différents indicateurs permettant d'obtenir des résultats complémentaires et significatifs d'une différenciation frais/décongelé.

2. Dosage des différents composants des exsudats de filets frais et décongelés

La parvalbumine contenue dans l'exsudat est un marqueur potentiel de différenciation d'un filet frais d'un filet décongelé, qu'il s'agisse du bar ou du flétan.

Mais, les techniques immunologiques basées sur des tests ELISA utilisant un anticorps commercial dirigé contre la parvalbumine ne nous ont pas permis d'effectuer cette différenciation avec précision.

De ce fait, l'exsudat étant un mélange complexe contenant une grande variété de composés biochimiques, nous nous sommes intéressés à d'autres constituants ou d'autres paramètres de l'exsudat, telles que :

- la composition totale en protéines,
- la purification partielle en parvalbumine par traitement thermique,
- la teneur en calcium,
- la concentration en nucléotides

Pour ce faire, nous nous sommes aussi intéressés à la méthode la plus utilisée pour différencier des filets frais par rapport à des filets décongelés basée sur le dosage de l' α -glucosidase lysosomique.

Pour étudier l'ensemble de ces variables, nous nous sommes focalisés sur deux conditions :

- les filets de bar frais à J3, n'ayant pas encore subi d'altération microbienne trop importante et dont l'état de *rigor mortis* est résolu.
- les filets décongelés provenant d'un même lot que les filets frais mais ayant subi une congélation de 40 jours et une décongélation douce de 18 heures sur un lit de glace dans des conditions de conservation à 4°C.

Afin de se rapprocher le plus possible d'un contexte de contrôle qualité, nous avons analysé ces variables, strictement de la même manière pour les deux conditions. Dans l'optique de créer une méthode normalisable, nous sommes partis de l'exsudat préparé selon le

protocole défini dans la partie « Matériels et méthodes » (page 84). Afin d'optimiser les analyses statistiques, nous avons utilisé 12 filets par série d'échantillons.

L'ensemble des variables étudiées dans ce paragraphe suivent des lois normales et sont significativement différentes entre les exsudats de filets frais et les exsudats des filets décongelés d'après un test de Student avec un intervalle de confiance de 95 %.

a. Le dosage des protéines

Les histogrammes correspondant à l'étude de ces variables sont représentés dans la Figure 49 page 120. Les moyennes des concentrations en protéines avant (Figure 49.A) et après (Figure 49.B) le traitement thermique ainsi que le poids des culots lyophilisés (Figure 49.C) après le traitement thermique sont représentés dans le Tableau XV ci-dessous.

Le mode opératoire suit le protocole détaillé sur la Figure 48 ci-dessous.

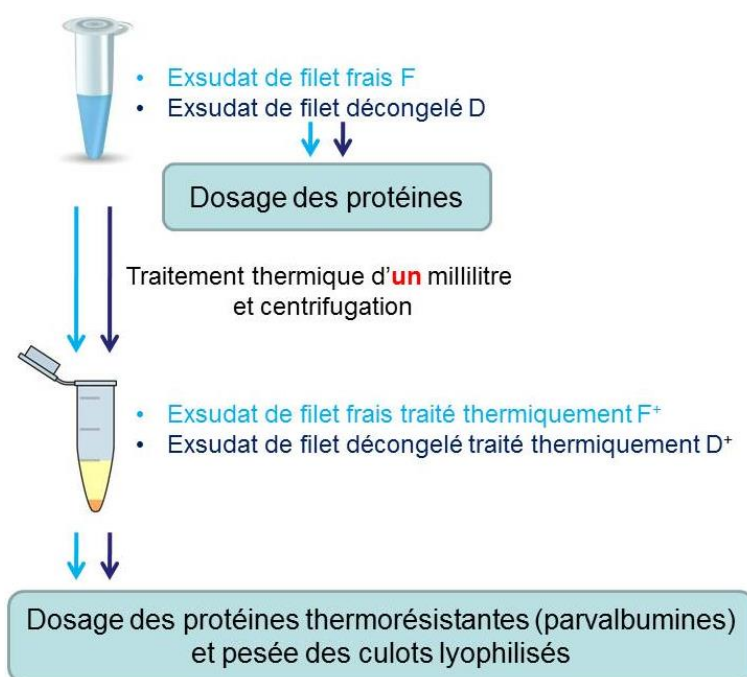
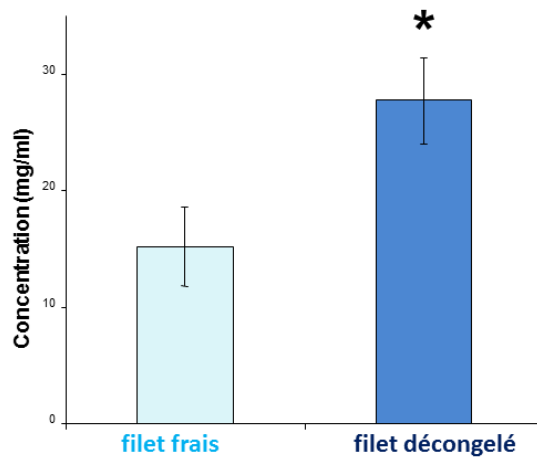
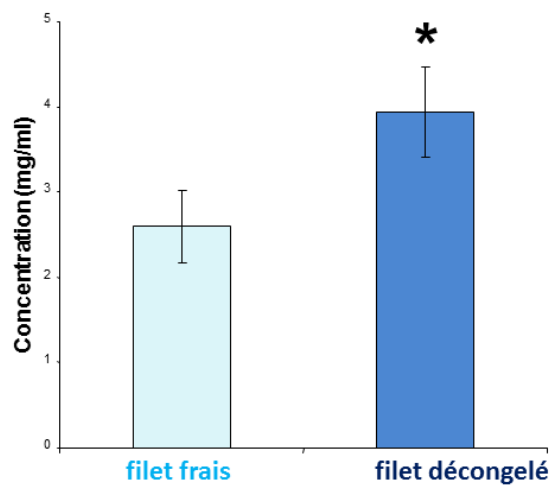


Figure 48 : Mode opératoire du dosage des protéines natives, thermorésistantes et pesée des culots lyophilisés

A Concentrations en protéines totales



B Concentrations en protéines thermorésistantes (parvalbumines)



C Poids des culots lyophilisés

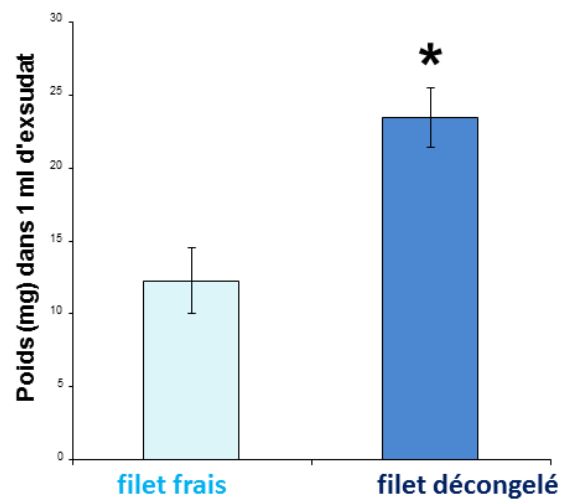


Figure 49: Moyennes des concentrations en protéines des exsudats de filets de bar frais et décongelés avant (protéines totales) (A) et après traitement thermique (« parvalbumines ») (B) et poids des culots lyophilisés après traitement thermique (C). (n=12)

Tableau XV : Concentrations des protéines et des poids des culots dans les exsudats (n=12)

	Frais			Décongelé		
	Concentration en protéines (mg/ml)	Concentration en parvalbumines (mg/ml)	Poids des culots lyophilisés (mg)	Concentration en protéines (mg/ml)	Concentration en parvalbumines (mg/ml)	Poids des culots lyophilisés (mg)
moyenne	15,195	2,597	65,47	27,696	3,940	130,825
Ecart type	3,409	0,421	24,199	3,641	0,537	29,259
Erreur type	0,984	0,121	6,986	1,051	0,155	8,446

- *Concentration en protéines*

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford, (1976) est simple à mettre en œuvre et donne des résultats statistiquement significatifs (Tableau XV et Figure 49.A page 120). Il apparaît clairement que les concentrations en protéines des filets de bar frais (15,2 mg/ml en moyenne) sont systématiquement inférieures aux concentrations en protéines des filets de bar décongelé (27,7 mg/ml en moyenne).

- *Concentrations en protéines des exsudats traités thermiquement*

Le traitement thermique des exsudats permet de dénaturer de nombreuses protéines et ainsi de récupérer une fraction très enrichie en parvalbumines après centrifugation. Ces manipulations sont basées sur le travail décrit précédemment dans le paragraphe « SDS PAGE des exsudats de filets de bar frais et décongelés traités thermiquement » page 108. Cette méthode, simple et rapide à mettre en place, s'avère suffisante pour quantifier les parvalbumines dans les exsudats.

La concentration en protéines des exsudats traités thermiquement (« parvalbumines » essentiellement) est de 2,6 mg/ml en moyenne concernant le « frais » et de 3,9 mg/ml concernant le « décongelé ». Le ratio décongelé/frais est de 1,52 (Tableau XV page 120 et Figure 49.B page 120).

Il est du même ordre de grandeur que le ratio obtenu pour la mesure de l'intensité cumulée des bandes correspondant aux exsudats de bar frais et décongelés traités thermiquement (Tableau XI et Figure 43 page 109).

Les parvalbumines sont donc environ 1,5 fois plus présentes dans les exsudats de filets décongelés que dans ceux de filets frais. Deux manipulations menées sur le flétan noir (*Reinhardtius hippoglossoides*) laissent percevoir la même constatation.

• Poids des culots lyophilisés après traitement thermique

La masse ou poids des culots obtenus après centrifugation est très différente, 65,5 mg pour le frais et 130,9 mg pour le décongelé (Tableau XV page 120 et Figure 49.C page 120).

La différence entre les protéines totales soustraites des quantités de parvalbumines ne suffit pas à expliquer une telle différence de poids. Il y a donc d'autres molécules qui sont dégradées lors du traitement thermique. Ces composés pourraient être autant d'autres pistes pour sélectionner des marqueurs. Il pourrait s'agir de nucléotides, de nombreux sels, des dérivés lipidiques...

b. L'activité spécifique de l' α -glucosidase lysosomique

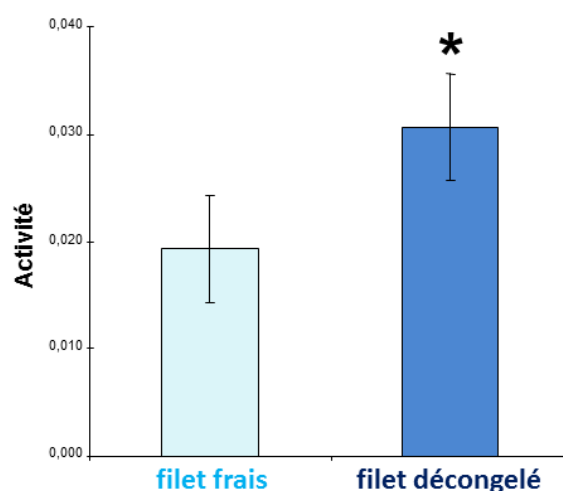
Le dosage de l' α -glucosidase lysosomique dans les exsudats est un bon indicateur de la lyse cellulaire. Il permet de différencier un poisson frais d'un poisson décongelé (Benjakul et Bauer, (2000), Duflos *et al.*, (2002)). Ce dosage constitue un marqueur historique et il est d'ailleurs le plus connu des industriels concernant cette différenciation. Cependant, ce paramètre n'a jamais été testé sur le bar (*Dicentrarchus labrax*).

Pour calculer l'activité spécifique de cette enzyme, nous avons mesuré l'activité enzymatique dans un millilitre d'exsudat puis nous l'avons divisé par la concentration en protéines pour avoir une activité spécifique par milligramme de protéines contenu dans l'exsudat (Tableau XVI page 122). Les moyennes sont représentées dans l'histogramme (Figure 50 page 122).

Tableau XVI : Activité Enzymatique (AE) et Activité Spécifique (AS) des exsudats (n=12)

	Frais			Décongelé		
	Protéines (mg/ml)	AE (Abs ₄₀₅ , h ⁻¹ , ml ⁻¹)	AS (Abs ₄₀₅ .h ⁻¹ .mg ⁻¹)	Protéines (mg/ml)	AE (Abs ₄₀₅ , h ⁻¹ , ml ⁻¹)	AS (Abs ₄₀₅ .h ⁻¹ .mg ⁻¹)
moyenne	15,195	2,66	0,187	27,696	6,770	0,249
Ecart type	3,41	0,617	0,075	3,641	0,652	0,044
Erreur type	0,984	0,178	0,022	1,051	0,188	0,013

Activité de l' α -glucosidase


Figure 50 : Moyennes des activités spécifiques de l' α -glucosidase dans les exsudats des filets de bar frais et décongelés (n=12)

L'activité de l' α -glucosidase permet de différencier les filets dans les deux conditions testées. C'est la première fois que ce marqueur est utilisé sur des filets de bar (*Dicentrarchus labrax*). Les valeurs obtenues sont différentes des valeurs obtenues sur d'autres espèces (Benjakul Soottawat et Thongkaew Chutima, (2003)). Cette observation a déjà été donnée par Duflos *et al.*, (2002). L'activité de cette enzyme reste un bon moyen de différencier les filets frais des filets décongelés. Comme toute méthode de dosage enzymatique, il faut bien respecter l'ensemble des conditions d'expérimentation : la température, le pH... Cette méthode est la méthode qui laisse la plus grande marge d'erreurs (écart-type) (Tableau XVI page 122 et Figure 50 page 122).

c. Le dosage du calcium libre et le dosage des nucléotides et de leurs dérivés

Le dosage de la quantité de calcium dans les exsudats s'est avéré intéressant suite aux résultats obtenus sur le dosage des parvalbumines par des méthodes immunologiques compte tenu de l'influence du calcium sur celui-ci.

Parallèlement, le dosage des nucléotides nous a été inspiré par l'étude de Le Grand *et al.*, (2013) montrant que l'ADN était altéré par un processus de congélation/décongélation.

Tout d'abord, le calcium libre permet d'étudier le relargage de calcium dans l'exsudat pourrait être un marqueur pour différencier les filets frais des filets décongelés (Tableau XVII ci-dessous et Figure 51 page 123).

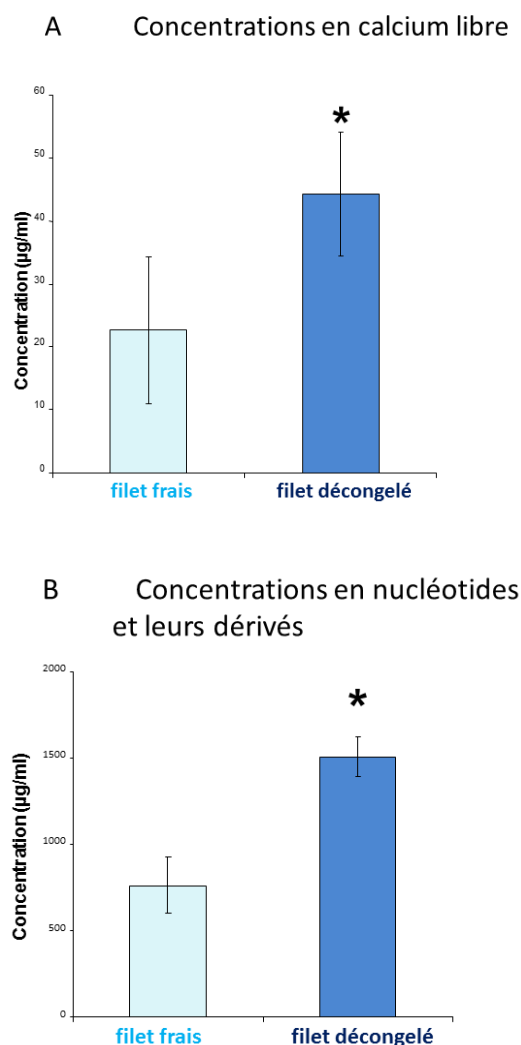


Figure 51: Moyennes des concentrations du calcium libre (A) et des nucléotides et de leurs dérivés (B) dans les exsudats de filets de bar frais et décongelés (n=12)

Il apparaît clairement que le dosage du calcium (Figure 51.A) ou celui des nucléotides et de leurs dérivés (Figure 51.B) constituent de bons indicateurs pour différencier le poisson frais du poisson décongelé.

Le calcium est un ion très important dans le cycle de contraction, décontraction et relaxation du muscle (Arif, (2009)). A la mort du poisson, le calcium se retrouve libre dans le sarcoplasme des cellules musculaires (Luther *et al.*, (1995)). Une partie de ce calcium pourra être réabsorbée par les protéines « canaux » du réticulum sarcoplasmique jusqu'à consommation totale de l'ATP disponible. Ces protéines « canaux » sont ATP dépendantes.

Les nucléotides et leurs dérivés constituent un indicateur mesurant le degré de dégradation de l'ADN et l'importance de la libération des nucléotides induite par le mode de conservation par congélation.

Tableau XVII : Dosage du calcium et des nucléotides et dérivés dans les exsudats

	frais		décongelé	
	Calcium libre	Nucléotides et dérivés	Calcium libre	Nucléotides et dérivés
unités	g/ (mg/ml)	µg/ml	g/ (mg/ml)	µg/ml
moyenne	22,613	762,383	44,230	1509,036
Ecart type	5,177	164,755	9,846	113,812
Erreur type	1,494	47,561	2,842	32,855

d. Synthèse des résultats

Les différentes variables sont présentées dans le tableau de synthèse dans les deux conditions testées. Ces valeurs sont reprises dans le Tableau XVIII ci-dessous sous la forme moyenne $\pm$ écart-type.

Tableau XVIII: Synthèse des variables étudiées dans les exsudats (n=12)

	Concentration en protéines totales (mg/ml)	Concentration des parvalbumines (mg/ml)	Poids des culots lyophilisés (mg)	Concentration en calcium libre (µg/ml)	Activité spécifique (10^{-2} Abs ₄₀₅ h ⁻¹ mg ⁻¹)	Concentration en nucléotides et leurs dérivés (µg/ml)
Frais	15,20 $\pm$ 3,41	2,60 $\pm$ 0,42	12,3 $\pm$ 2,30	22,61 $\pm$ 11,68	2,22 $\pm$ 0,86	762,38 $\pm$ 164,76
Décongelé	27,70 $\pm$ 3,64	3,94 $\pm$ 0,54	23,46 $\pm$ 2,04	44,23 $\pm$ 9,85	2,93 $\pm$ 0,56	1509,04 $\pm$ 113,81

Le dosage des protéines thermorésistantes dans les exsudats paraît être un bon moyen pour doser les parvalbumines. Nous nous tournons définitivement vers une méthode quantitative pour utiliser la parvalbumine comme marqueur de congélation/décongélation. La variation

importante de la concentration en calcium libre permettrait d'expliquer les difficultés rencontrées à mettre au point une méthode de dosage par technique immunologique fiable des parvalbumines dans les exsudats.

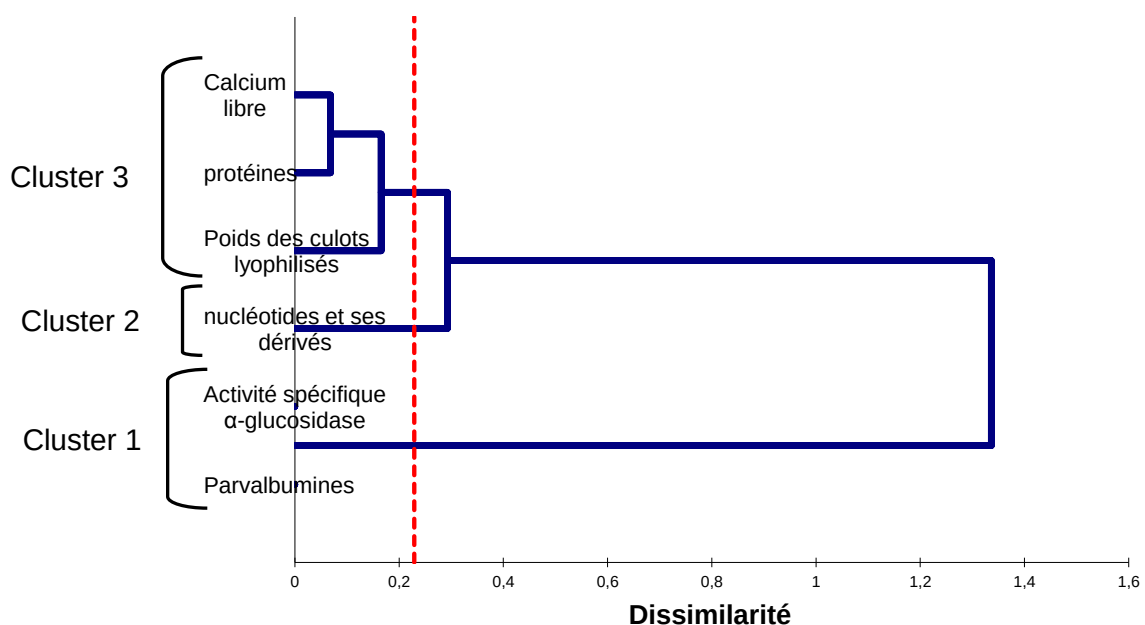
Toutes ces variables sont statistiquement fiables et montrent des différences marquées entre « frais » et « décongelé » (Tableau XVIII page 124), bien que l'étude n'ait été menée que pour les filets à J3.

e. La classification hiérarchique ascendante

La classification hiérarchique ascendante est une méthode d'analyse statistique permettant de mesurer la dissimilarité des variables entre elles. Les variables les moins dissimilaires peuvent être regroupées au sein d'un même cluster.

Les six variables étudiées précédemment (concentration des protéines totales, concentration des parvalbumines, poids des culots lyophilisés, activité de l' α -glucosidase, concentration du calcium libre et concentration des nucléotides et de leurs dérivés) sont significativement différentes pour différencier les filets de bar frais des filets décongelés. Ces variables peuvent être regroupées dans un cluster en fonction de leur similarité.

Une classification hiérarchique ascendante est toujours représentée par un dendrogramme (Figure 52 ci-dessous).



La ligne en pointillés rouges représente la troncature (seuil à partir duquel les différents clusters sont définis).

Figure 52: Le dendrogramme des variables étudiées sur les exsudats

• *Présentation des trois clusters*

D'après les résultats obtenus statistiquement comme indiqué dans la partie « Matériels et méthodes » page 86, nous avons regroupé les variables selon trois clusters.

- Le cluster 1 est composé de deux variables : la concentration en parvalbumine et l'activité spécifique de l' α -glucosidase. Ce cluster a une grande dissimilarité avec les autres variables car leurs branches se séparent rapidement (Figure 52 ci-dessus).

La seconde branche regroupe deux clusters.

- Le cluster 2 est composé d'une seule variable, la concentration en nucléotides et leurs dérivés. Ce cluster 2 se sépare du cluster 3 juste avant troncature (ligne en pointillés rouges (Figure 52)).
- Le cluster 3 regroupe trois variables : le poids des culots lyophilisés, la concentration en protéines totales et la concentration en calcium libre. Les deux dernières variables sont les plus similaires. Ce sont les deux variables dont le nœud qui les regroupe est le plus proche de la valeur zéro (Figure 52, page 125).

• *Détails des trois clusters*

Le cluster 1 regroupe les variables suivantes : la concentration en parvalbumines et l'activité spécifique de l' α -glucosidase. La concentration en parvalbumines est un indicateur de lyse cellulaire car ce sont des protéines du cytoplasme libérées après la rupture des membranes provoquée par le choc congélation/décongélation (Ayala *et al.*, (2005)). L'augmentation de l'activité spécifique de l' α -glucosidase est le reflet de la destruction des membranes du lysosome qui libère cette enzyme dans le milieu extracellulaire (Duflos *et al.*, (2002)). La méthode de dosage des parvalbumines paraît plus significative que celle de l'activité spécifique de l' α -glucosidase. En effet, les barres d'erreur sont plus importantes pour l' α -glucosidase (Figure 50 page 122). Le point commun entre ces deux variables est que leur dosage est le reflet d'une dégradation tissulaire ou subcellulaire provoquée par le choc congélation/décongélation.

Le cluster 1 peut être considéré comme un indicateur de lyse cellulaire.

Le cluster 2 est composé d'une seule variable : la concentration en nucléotides et de leurs dérivés qui est caractérisée par les composés contenant une base purique ou pyrimidique

(absorbance à 260nm). Ces composés proviennent de la dégradation de l'ADN (Le Grand *et al.*, (2013), Zilli *et al.*, (2003)), de la libération de certains nucléotides comme le NADH (Karoui *et al.*, (2006)) ou de l'ATP (Özogul *et al.*, (2008)). Cet indicateur mesure le degré de dégradation de l'ADN et l'importance de la libération des nucléotides induite par le mode de conservation par congélation.

Le cluster 2 peut être considéré comme un indicateur d'altération des nucléotides.

Le cluster 3 regroupe trois variables : la concentration en protéines, la concentration en calcium libre et le poids des culots lyophilisés après traitement thermique des exsudats. Le procédé de congélation dénature les protéines et altère leur configuration spatiale (Lund *et al.*, (2011)). Le poids des culots lyophilisés est plus important dans les exsudats de filets décongelés que dans les filets frais. Les protéines dénaturées par traitement thermique se retrouvent dans le culot (Jensen *et al.*, (2003)). Les protéines myofibrillaires sont plus sujettes à la dénaturation que les protéines sarcoplasmiques par ce mode de conservation (Lee *et al.*, (2012)).

La concentration en calcium peut être liée à la concentration en protéines dans l'exsudat. Ces deux variables sont les plus similaires entre elles. Le calcium est un important cation bivalent dans les processus d'activation des protéases entraînant la nécrose du poisson (Rehbein *et al.*, (2000)). Les enzymes activées sont les calpaïnes et les cathepsines (Ladrat *et al.*, (2003)). Ces protéases hydrolysent les protéines en peptides qui deviendront plus solubles (Benjakul Sootawat et Thongkaew Chutima, (2003)). C'est ce qui explique qu'une quantité plus importante de protéines est dosée dans les exsudats de filets décongelés.

Ces indicateurs témoignent de la lyse moléculaire lors du procédé de congélation/décongélation.

Le cluster 3 peut être considéré comme un indicateur d'altération des protéines.

Toutes ces variables donnent des résultats fiables. Tous ces dosages peuvent être réalisés en moins d'une journée. Les techniques utilisées sont relativement simples à mettre en œuvre et nécessitent du personnel de formation « technicien de laboratoire ». D'un point de vue matériel, les coûts sont faibles. Comme toutes ces analyses se font sur une microplaque, une automatisation est facilement envisageable. C'est ce qui est d'ailleurs recherché par les industriels à l'instar de ce que décrivent Fuentes *et al.*, (2013).

L'étude que nous avons menée a été réalisée sur le bar (*Dicentrarchus labrax*). D'autres espèces peuvent être testées pour confirmer cette technique d'analyse.

L'analyse d'une variable par cluster, c'est-à-dire par type d'indicateur, pourrait permettre d'identifier plus finement les filets qui ont subi une congélation, par regroupement complémentaire des méthodes. Cette stratégie devra être confirmée en comparant les résultats de cette méthode avec des résultats provenant d'autres méthodes physiques ou histologiques réalisées en parallèle (Fernández-Segovia *et al.*, (2012)).

De nombreux phénomènes se produisent pendant la congélation, la décongélation et l'entreposage à température négative. L'étude biochimique de ces variables dans l'exsudat de poisson est une bonne approche. Les divers modes de congélation/décongélation entraînent différentes altérations allant de l'altération des molécules biologiques jusqu'à l'altération tissulaire.

Il semble évident, au vu des résultats obtenus jusqu'à présent (voir Tableau IV page 64), qu'il sera pratiquement impossible de mettre au point une méthode unique et ubiquitaire fonctionnant sur plusieurs espèces de poissons différentes. Cependant, une étude de plusieurs variables qui donnerait des informations complémentaires et dissimilaires permettraient d'avoir une convergence d'indicateurs afin d'obtenir un des informations suffisamment objectives pour conclure à une différenciation frais/décongelé correcte et acceptable pour les industriels (Figure 53, ci-dessous).

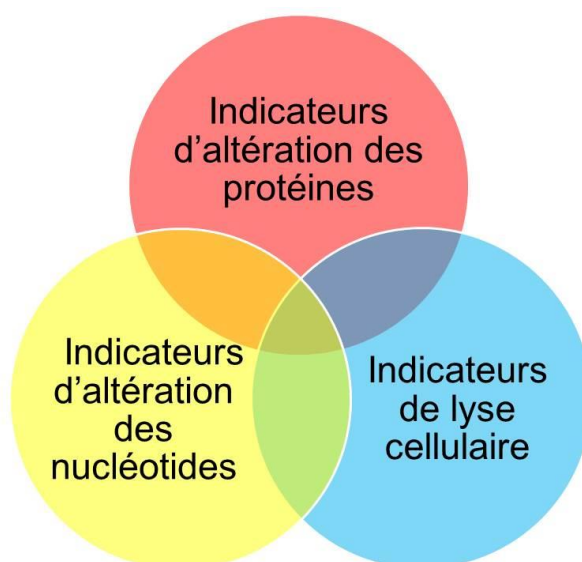


Figure 53: Complémentarité des méthodes de différenciation filet frais, congelé/décongelé

Ces méthodes d'analyses biochimiques pourraient être complétées avec des méthodes d'analyses physiques telles que la spectrométrie. Nous avons ainsi testé la méthode de spectrométrie de fluorescence sur les mêmes filets que ceux utilisés dans le dosage des différents composants des exsudats de filets frais et décongelés. Ces méthodes d'analyses biochimiques et physiques présentent l'avantage d'être rapides, ce qui correspond aux attentes des professionnels.

3. Analyse préliminaire des filets de bar par spectrométrie de fluorescence

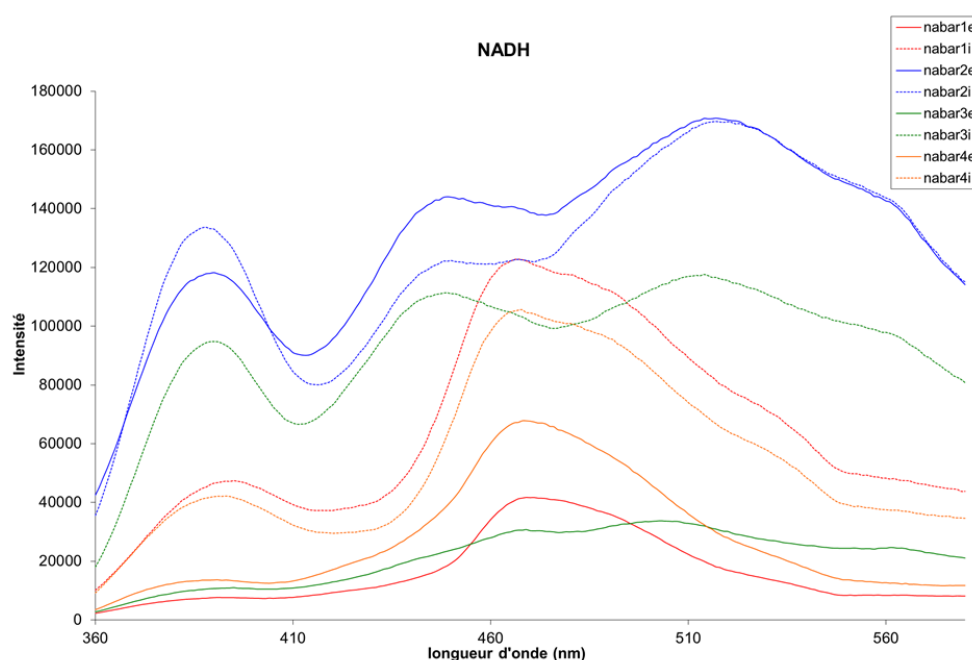
a. Introduction

La spectrométrie de fluorescence est une ancienne technique d'analyse utilisée pour déterminer la structure des molécules en chimie et en biochimie. Son utilisation pour déterminer la qualité des aliments est plus récente. Ces éléments ont été synthétisés dans la revue de Karoui et Blecker, (2011). Cette technique est basée sur la détection de fluorochromes. Un fluorochrome est un composé chimique ou biochimique qui émet une lumière suite à l'absorption d'ultraviolet ou de lumière visible. Le fluorochrome absorbe une faible longueur d'onde spécifique du composé et libère l'énergie à une longueur d'onde plus élevée. La spectrométrie de fluorescence est réalisée à la surface de l'échantillon car le filet est opaque.

Le but de ces manipulations est de différencier les filets de poisson frais des filets décongelés sur le modèle du bar (*Dicentrarchus labrax*) en utilisant les techniques de spectrométrie de fluorescence qui s'inspirent du travail préalable de Karoui *et al.*, (2006) basé sur l'étude de deux fluorochromes : le NADH et le tryptophane. Nous avons ainsi testé ces deux fluorochromes auxquels nous avons adjoint l'étude de deux nouveaux protocoles : l'oxydation des lipides et la méthode synchrone.

• Résultats des spectres de fluorescence

NADH



Protocole NADH : excitation 340 nm, émission de 360 à 580 nm

- bar1 : filet de bar frais face externe côté peau (nabar1e) et face interne (nabar1i)
- bar 2 : filet de bar décongelé face externe côté peau (nabar2e) et face interne (nabar2i)
- bar 3 : filet de bar décongelé face externe côté ventral (nabar3e) et face interne (nabar3i)
- bar4 : face de bar frais externe côté peau (nabar4e) et face interne (nabar4i)

Les spectres correspondant aux filets frais sont exprimés avec des couleurs chaudes (rouge et orange). Les spectres correspondant aux filets décongelés sont exprimés avec des couleurs froides (bleu et vert).

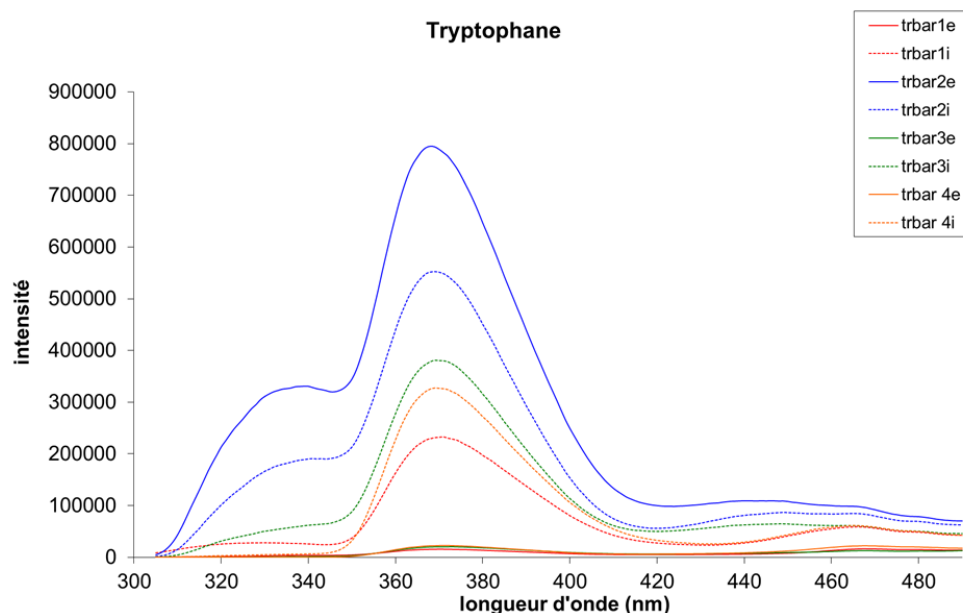
Figure 54 : Spectre de fluorescence de filets de bar frais ou décongelés en utilisant le NADH comme fluorochrome

Les quatre spectres correspondant aux filets frais se superposent bien que présentant des intensités différentes.

Trois des quatre spectres correspondant aux filets décongelés se superposent bien que présentant des intensités différentes. Le quatrième spectre (nabar3e) est le seul échantillon à avoir été réalisé sur la face ventrale, ce qui pourrait expliquer ses différences d'intensité. Cet échantillon s'avère ne pas être le plus intéressant à étudier.

De ce fait, en faisant abstraction de ce dernier échantillon, nous constatons des différences marquées entre les spectres des filets de bar frais et décongelés. En effet, les spectres de filets frais présentent deux maxima aux valeurs respectives de 390 et 468 nm, alors que les spectres de filets décongelés présentent trois maxima aux valeurs respectives de 390, 450 et 520 nm. Ces résultats confirment que le NADH est un bon marqueur pour différencier des filets frais de filets décongelés (Karoui *et al.*, (2006)).

Tryptophane



Protocole Tryptophane : excitation à 290 nm, émission entre 305 et 490 nm

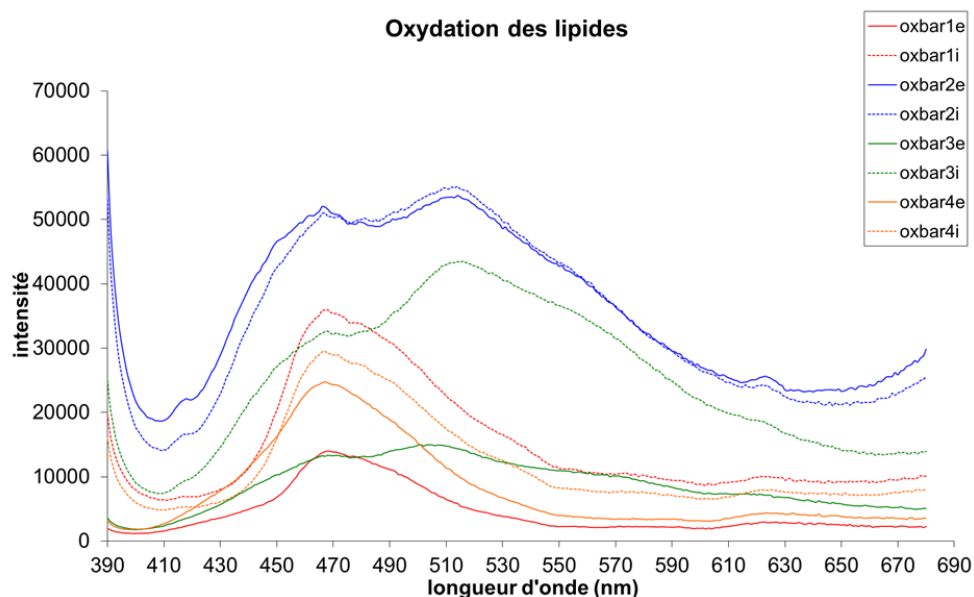
- bar1 : filet de bar frais face externe côté peau (trbar1e) et face interne (trbar1i)
- bar 2 : filet de bar décongelé face externe côté peau (trbar2e) et face interne (trbar2i)
- bar 3 : filet de bar décongelé face externe côté ventral (trbar3e) et face interne (trbar3i)
- bar4 : filet de bar frais face externe côté peau (trbar4e) et face interne (trbar4i)

Les spectres correspondant aux filets frais sont exprimés avec des couleurs chaudes (rouge et orange). Les spectres correspondant aux filets décongelés sont exprimés avec des couleurs froides (bleu et vert).

Figure 55 : Spectre de fluorescence de filets de bar frais ou décongelés en utilisant le tryptophane comme fluorochrome

Dans le cas présent, l'ensemble des spectres se superposent et ne montrent pas de différence tangible entre les filets frais et les filets décongelés. Tout comme l'avaient précédemment montré Karoui *et al.*, (2006) sur le merlan, le tryptophane n'est pas un bon marqueur pour différencier des filets de bar frais de filets décongelés.

Oxydation des lipides



Protocole Oxydation des lipides : excitation à 380 nm, émission entre 390 et 680 nm

- bar1 : filet de bar frais face externe côté peau (oxbar1e) et face interne (oxbar1i)
- bar 2 : filet de bar décongelé face externe côté peau (oxbar2e) et face interne (oxbar2i)
- bar 3 : filet de bar décongelé face externe côté ventral (oxbar3e) et face interne (oxbar3i)
- bar4 : filet de bar frais face externe côté peau (oxbar4e) et face interne (oxbar4i)

Les spectres correspondant aux filets frais sont exprimés avec des couleurs chaudes (rouge et orange). Les spectres correspondant aux filets décongelés sont exprimés avec des couleurs froides (bleu et vert).

Figure 56 : Spectre de fluorescence de filets de bar frais ou décongelés en utilisant le protocole d'oxydation des lipides

Le protocole d'oxydation des lipides a été mené en partant du principe que cette oxydation était favorisée par le phénomène de congélation/décongélation (Baron *et al.*, (2007)) en comparaison d'un filet laissé à l'état frais au cours d'une même durée.

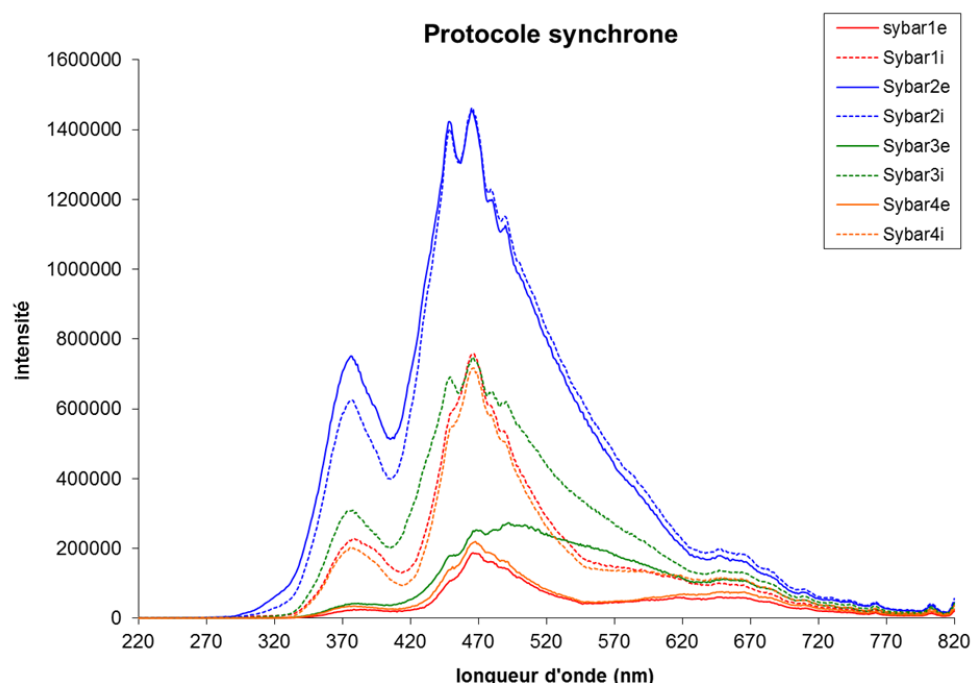
Les quatre spectres correspondant aux filets frais se superposent bien que présentant des intensités différentes.

Tout comme pour l'étude du NADH, trois des quatre spectres correspondant aux filets décongelés se superposent bien que présentant des intensités différentes. Le quatrième spectre (oxbar3e) est le seul échantillon à avoir été réalisé sur la face ventrale, ce qui pourrait expliquer ses différences d'intensité. De la même façon, cet échantillon s'avère ne pas être le plus intéressant à étudier.

De fait, en faisant abstraction de ce dernier échantillon, nous constatons des différences marquées entre les spectres des filets de bar frais et décongelés. En effet, les spectres de filets frais présentent un maximum d'intensité à 468 nm, alors que les spectres de filets décongelés présentent deux maxima aux valeurs respectives de 468 et 512 nm. Ces résultats

indiquent que le protocole d'oxydation des lipides pourrait être un bon marqueur pour différencier des filets de bar frais de filets décongelés.

Protocole synchrone



Protocole synchrone : excitation à différentes longueurs d'onde λ nm et émission à $\lambda+20$ nm

- bar1 : filet de bar frais face externe côté peau (sybar1e) et face interne (sybar1i)
- bar 2 : filet de bar décongelé face externe côté peau (sybar2e) et face interne (sybar2i)
- bar 3 : filet de bar décongelé face externe côté ventral (sybar3e) et face interne (sybar3i)
- bar4 : filet de bar frais face externe côté peau (sybar4e) et face interne (sybar4i)

Les spectres correspondant aux filets frais sont exprimés avec des couleurs chaudes (rouge et orange). Les spectres correspondant aux filets décongelés sont exprimés avec des couleurs froides (bleu et vert).

Figure 57 : Spectre de fluorescence de filets de bar frais ou décongelés en utilisant le protocole synchrone

Le protocole synchrone a été mené en partant du principe que la congélation/décongélation induit modifications moléculaires qui peuvent être visualisées en spectrométrie de fluorescence en appliquant le protocole synchrone qui se caractérise par l'excitation à différentes longueurs d'onde (λ nm) et l'émission à $\lambda+20$ nm).

Concernant le protocole synchrone, les spectres correspondant aux filets frais sont exprimés avec des couleurs chaudes (rouge et orange). Les spectres correspondant aux filets décongelés sont exprimés avec des couleurs froides (bleu et vert).

Les quatre spectres correspondant aux filets frais se superposent totalement bien que présentant des intensités différentes.

Tout comme pour l'étude du NADH, trois des quatre spectres correspondant aux filets décongelés se superposent bien que présentant des intensités différentes. Le quatrième spectre (sybar3e) est le seul échantillon à avoir été réalisé sur la face ventrale, ce qui pourrait expliquer ses différences d'intensité. De la même façon, cet échantillon s'avère ne pas être le plus intéressant à étudier.

De nouveau, en faisant abstraction de ce dernier échantillon, nous constatons des différences entre les spectres des filets de bar frais et décongelés. En effet, les trois spectres des filets décongelés (Sybar2e, Sybar2i et Sybar3i) présentent deux maxima aux valeurs respectives de 449 et 465 nm, alors que les spectres de filets frais présentent tous un seul maximum à la longueur d'onde de 466 nm.

Ces résultats indiquent que le protocole synchrone nous permettrait de trouver des nouveaux fluorochromes qui pourraient être des marqueurs pour différencier des filets de bar frais de filets décongelés.

• *Analyse en composantes principales concernant le NADH*

Suite à l'obtention de ces différents spectres, nous avons choisi de réaliser une analyse en composantes principales concernant le NADH, car il s'agit de la méthode ayant présentée des résultats les plus marquants et qui par ailleurs a été validée sur une autre espèce, le merlan (*Merlangius merlangus*) (Karoui *et al.*, (2006)).

Nous avons utilisé le logiciel XL Stat 2011. Nous avons obtenu deux facteurs discriminants F1 et F2 correspondant aux longueurs d'ondes du fluorochrome étudié : le NADH (Figure 58 ci-dessous). Ces facteurs nous ont permis de mettre en évidence deux groupes d'échantillons correspondant chacun aux conditions respectives « condition frais » et « condition décongelé ».

Résultats et discussion

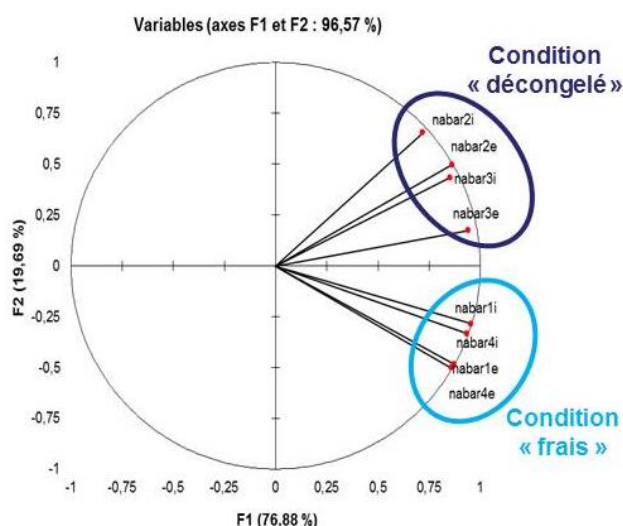


Figure 58: Le diagramme de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les spectres du NADH

L'analyse en composants principaux concernant le NADH permet ainsi de différencier les filets de bar frais des filets décongelés.

A partir de ces résultats, pour obtenir une méthode rapide de discrimination frais/décongelé, nous avons comparé les rapports de l'intensité des absorbances du NADH entre l'intensité à 455 nm et l'intensité à 340 nm comme cela avait été présentée par Karoui *et al.*, (2006). Ces valeurs sont reportées dans le Tableau XIX ci-dessous.

Tableau XIX: Rapport entre les intensités (i) des absorbances d'émission à 455 nm et celles d'excitation à 340 nm du NADH

	nabar1e (frais)	nabar1i (frais)	nabar2e (décongelé)	nabar2i (décongelé)	nabar3e (décongelé)	nabar3i (décongelé)	nabar4e (frais)	nabar4i (frais)
i455/i 340	3,56	2,33	1,41	1,19	2,45	1,43	3,99	2,27

Ces rapports sont significativement différents selon un test de Student effectué sur quatre valeurs par condition.

Une différence significative apparaît entre les échantillons de poissons frais et ceux de poisson décongelés (Tableau XIX ci-dessus). De la même façon que décrite précédemment sur la partie consacrée aux spectres de fluorescence du NADH (page 130), le rapport des intensités concernant l'échantillon nabar3i (prélèvement côté ventral) est différent des autres échantillons décongelés. Une méthode de prélèvement d'échantillons précis est donc à préconiser pour obtenir des résultats fiables quant à la différenciation frais/décongelé.

• *Conclusion sur la spectrométrie de fluorescence*

Nous n'avons étudié dans cette étude que quatre filets (deux étant frais, deux étant décongelés) à la seule date de J3. Il faudra reproduire ces résultats en utilisant non seulement, au moins quatre filets frais ou décongelés et trois éprouvettes par filet frais ou décongelé, mais également à des dates de cinétique différentes (J0, J3, J6, J9, J13). Pour chacune de ces conditions, il serait judicieux d'utiliser les protocoles « NADH » et « Oxydation des lipides ».

Ce n'est qu'après ce travail qu'il sera possible d'intégrer cette nouvelle variable basée sur une étude physique dans la classification hiérarchique ascendante développée page 125 et ainsi d'établir dans quel cluster cette technique pourrait trouver sa place.

CONCLUSION ET

PERSPECTIVES

1. Conclusion

L'objectif de la thèse consistait à mettre au point et à optimiser des méthodes de différenciation des filets de poisson frais de filets décongelés.

La stratégie utilisée a consisté à identifier un marqueur protéique en utilisant la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle comparative couplée à la spectrométrie de masse à partir des exsudats de filets. Concernant le bar, nous avons formellement identifié la parvalbumine comme étant un marqueur de différenciation frais/décongelé. Néanmoins, pour éviter les erreurs d'appréciation, il est nécessaire d'associer à cette première méthode, une analyse des critères de fraîcheur.

Afin de vérifier que la parvalbumine n'est pas seulement un marqueur de différenciation frais/décongelé concernant le bar, nous avons effectué la différenciation des protéines issues de filets frais ou décongelés de flétan noir. Nous avons ainsi démontré que la parvalbumine est également un marqueur de différenciation frais/décongelé pour cette espèce.

Les parvalbumines ont déjà servi de marqueurs pour identifier des espèces de poissons entre elles. Leurs propriétés immunologiques en font des protéines à grand intérêt pour les utiliser en tant que marqueurs de différenciation frais/décongelé pour d'éventuels autres produits de la mer.

Dans les conditions expérimentales que nous avons choisies, le développement de tests ELISA permettant de doser la parvalbumine dans des exsudats de filets de bar frais ou décongelés a montré qu'il devrait être modifié et affiné afin de rendre la méthode plus fiable.

Afin de poursuivre nos investigations, nous avons utilisé la composition des exsudats comme source potentielle d'autres indicateurs pour différencier les filets frais des filets décongelés.

Nous nous sommes ainsi intéressés à différents paramètres tels que la quantité de protéines totales dans les culots lyophilisés provenant des exsudats traités ou non traités thermiquement, l'activité de l' α -glucosidase lysosomique (indicateur historique de la différenciation frais/décongelé), le dosage du calcium libre et le dosage des nucléotides et de leurs dérivés.

Conclusion et perspectives

Nous avons procédé à une analyse statistique par Classification Hiérarchique Ascendante (CHA) et nous avons ainsi mis en évidence trois groupes (ou clusters) de paramètres dissimilaires :

- Le *cluster 1* peut être considéré comme un *indicateur de lyse cellulaire*
- Le *cluster 2* peut être considéré comme un *indicateur d'altération des nucléotides*
- Le *cluster 3* peut être considéré comme un *indicateur d'altération des protéines*

L'analyse d'une seule variable par cluster pourrait ainsi permettre de différencier un filet frais d'un filet décongelé. Cette stratégie devra être confirmée en comparant les résultats que nous avons obtenus avec des résultats provenant d'autres méthodes physiques ou histologiques réalisées en parallèle.

Le choix du paramètre à étudier devra se porter finalement sur la technique la plus simple et la moins coûteuse à mettre en œuvre.

De ce fait, il semblerait judicieux d'utiliser le dosage des protéines dans les exsudats, le dosage et la purification des protéines thermorésistantes (parvalbumines) et le dosage des nucléotides.

Ces trois techniques sont relativement simples à mettre en œuvre et ne nécessitent pas de personnel particulièrement qualifié. D'un point de vue matériel, les coûts sont faibles. Comme toutes ces analyses se font sur une microplaque, une automatisation pourrait facilement être envisageable. C'est ce qui est d'ailleurs recherché par les industriels.

Enfin, une dernière méthode a été testée sur le bar et n'a pas été intégrée dans la CHA. Il s'agit de la spectrométrie de fluorescence.

Le matériel est certes coûteux et pourrait être acquis au sein d'un centre technique local chargé d'effectuer ce transfert de technologies auprès des entreprises du Boulonnais.

Les résultats obtenus sont très prometteurs concernant les paramètres « NADH » et « oxydation des lipides ». Cependant, il faudra reproduire nos résultats non seulement sur un nombre plus important de filets mais en y intégrant de plus une cinétique sur la fraîcheur des filets allant jusqu'à leur date d'altération non acceptable.

Ce n'est qu'après ce travail qu'il sera possible d'intégrer cette nouvelle variable basée sur une étude physique dans la Classification Hiérarchique Ascendante et ainsi d'établir dans quel cluster cette technique pourrait apparaître.

Nous disposerons ainsi d'un « kit » de différenciation frais/décongelé à proposer aux industriels.

2. Perspectives

La recherche de marqueurs de différenciation frais/décongelé a été réalisée sur le bar (*Dicentrarchus labrax*) et expérimentée sur le flétan noir (*Reinhardtius hippoglossoides*). Chez ces deux espèces, les parvalbumines α et β ont été identifiées comme marqueurs potentiels de différenciation frais/décongelé. L'analyse de la composition de parvalbumines dans les exsudats pourrait directement être effectuée sur d'autres espèces d'intérêt commercial pour lesquelles existe une forte présomption de fraude. Il s'agit notamment de la sole (*Solea solea*), la noix de Saint Jacques (*Pecten maximus*), le cabillaud (*Gadus morhua*) et le saumon (*Salmo salar*).

Nous nous sommes intéressés à des conditions de congélation de courte durée. Il serait opportun d'étendre l'étude non seulement à différents temps de congélation, mais aussi à la technique de double congélation de plus en plus suspectée dans les produits de la mer importés. De la même façon, les modes de conservation hybride, qui se situent entre la congélation et la conservation à l'état frais (« chilling » et « super chilling ») et pour lesquels subsiste un flou réglementaire, mériteraient des études approfondies.

Enfin, la détection des cryoprotecteurs, indicateurs d'une congélation potentielle, serait une piste intéressante à explorer dans les techniques de différenciation frais/décongelé.

BIBLIOGRAPHIE

- Acker, J. P., Elliott, J. A. W. et McGann, L. E. (2001) Intercellular Ice Propagation: Experimental Evidence for Ice Growth through Membrane Pores. *Biophysical Journal* 81, 3, pp 1389-1397.
- Addis, M. F., Pisanu, S., Preziosa, E., Bernardini, G., Pagnozzi, D., Roggio, T., Uzzau, S., Saroglia, M. et Terova, G. (2012) 2D DIGE/MS to investigate the impact of slaughtering techniques on postmortem integrity of fish filet proteins. *Journal of Proteomics* 75, 12, pp 3654-3664.
- Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Zubcov, E., Shahidi, F. et Alexis, M. (2002) Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry* 79, 2, pp 145-150.
- Alizadeh, E., Chapleau, N., de Lamballerie, M. et Le-Bail, A. (2007) Effect of different freezing processes on the microstructure of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 4, pp 493-499.
- Altinelataman, C., Kündiger, R., Cakli, S. et Rehbein, H. (2009) Comparison of IEF patterns of sarcoplasmic proteins of fish from North Atlantic and Aegean Sea. *Food Control* 20, 11, pp 980-985.
- Andersen, C. M. et Jørgensen, B. M. (2004) On the Relation Between Water Pools and Water Holding Capacity in Cod Muscle. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 13, 1, pp 13-23.
- Arif, S. H. (2009) A Ca(2+)-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *Bioessays* 31, 4, pp 410-21.
- Arif, S. H. (2010) A major cross-reactive fish allergen with exceptional stability: Parvalbumin. *Food Chemistry* 119, 3, pp 109-114.
- Asensio Luis, I. G., Teresa Garcia, Rosario Martin,. (2008) Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Food Control. *Food Control* 19, 1, pp 1-8.
- Aubourg, S., Sotelo, C. et Pérez-Martín, R. (1998) Assessment of quality changes in frozen sardine (*Sardina pilchardus*) by fluorescence detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75, 5, pp 575-580.
- Aubourg, S. P., Torres, J. A., Saraiva, J. A., Guerra-Rodríguez, E. et Vázquez, M. (2013) Effect of high-pressure treatments applied before freezing and frozen storage on the functional and sensory properties of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *LWT - Food Science and Technology* 53, 1, pp 100-106.
- Ayala, M. D., López Albors, O., Blanco, A., García Alcázar, A., Abellán, E., Ramírez Zarzosa, G. et Gil, F. (2005) Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture* 250, 1-2, pp 215-231.
- Bado-Nilles, A., Quentel, C., Auffret, M., Le Floch, S., Gagnaire, B., Renault, T. et Thomas-Guyon, H. (2009) Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 5, pp 1446-1454.
- Bahuaud, D., Mørkøre, T., Langsrud, Ø., Sinnes, K., Veiseth, E., Ofstad, R. et Thomassen, M. S. (2008) Effects of -1.5°C Super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo*

- salar) pre-rigor Fillets: Cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chemistry* 111, 2, pp 329-339.
- Ballin, N. Z. et Lametsch, R.** (2008) Analytical methods for authentication of fresh vs. thawed meat : A review. *Meat Science* 80, 2, pp 151-158.
- Baron, C. P., Kjaersgard, I. V., Jessen, F. et Jacobsen, C.** (2007) Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Agric Food Chem* 55, 20, pp 8118-25.
- Beale, J. E., Jeebhay, M. F. et Lopata, A. L.** (2009) Characterisation of purified parvalbumin from five fish species and nucleotide sequencing of this major allergen from Pacific pilchard, *Sardinops sagax*. *Molecular Immunology* 46, 15, pp 2985-2993.
- Beattie, R. J., Bell, S. J., Farmer, L. J., Moss, B. W. et Patterson, D.** (2004) Preliminary investigation of the application of Raman spectroscopy to the prediction of the sensory quality of beef silverside. *Meat Science* 66, 4, pp 903-913.
- Bechmann, I. E.** (1996) Determination of formaldehyde in frozen fish with formaldehyde dehydrogenase using a flow injection system with an incorporated gel-filtration chromatography column. *Analytica Chimica Acta* 320, 2-3, pp 155-164.
- Bell, G. H., Emslie-Smith, D. et Paterson, C. R.** (1976) *Textbook of physiology and biochemistry*, ed., Churchill Livingstone.
- Benjakul, S. et Bauer, F.** (2000) Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze-thaw cycles. *J. Sci. Food Agric.* 80, 8, pp 1145-1150.
- Benjakul Soottawat, V. W. et Thongkaew Chutima, T. M.** (2003) Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage. *Food Research International* 36, 787-795.
- Berg, J. M. T. J. L. S. L.** (2002) *Biochemistry*, 5th ed., W.H. Freeman, New York.
- Berrini, A., Tepedino, V., Borromeo, V. et Secchi, C.** (2006) Identification of freshwater fish commercially labelled "perch" by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Food Chemistry* 96, 1, pp 163-168.
- Billon, J., Ollieuz, N. et Tao, S. H.** (1979) Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'azote basique volatil total (ABVT) pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. *Tech. Vét. de l'Alimentation* 149, p 6.
- Boonsumrej, S., Chaiwanichsiri, S., Tantratian, S., Suzuki, T. et Takai, R.** (2007) Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. *Journal of Food Engineering* 80, 1, pp 292-299.
- Bozzetta, E., Pezzolato, M., Cencetti, E., Varello, K., Abramo, F., Mutinelli, F., Ingravalle, F. et Teneggi, E.** (2012) Histology as a Valid and Reliable Tool To Differentiate Fresh from Frozen-Thawed Fish. *Journal of Food Protection* 75, 8, pp 1536-1541.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, pp 248-254.
- Bray, J. R. et Curtis, J. T.** (1957) An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27, 4, pp 325-349.
- Bremner, H. A.** (2002) *Safety and quality issues in fish processing*, ed., CRC Press ; Woodhead Pub., Boca Raton, FL; Cambridge, Eng.
- Bugajska-Schretter, A., Grote, M., Vangelista, L., Valent, P., Sperr, W. R., Rumpold, H., Pastore, A., Reichelt, R., Valenta, R. et Spitzauer, S.** (2000) Purification, biochemical,

- and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut* 46, 5, pp 661-9.
- Caballero, M. J., Betancor, M., Escrig, J. C., Montero, D., Espinosa de los Monteros, A., Castro, P., Ginés, R. et Izquierdo, M.** (2009) Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 291, 3-4, pp 210-216.
- Carrera, M., Cañas, B. et Gallardo, J. M.** (2012) Proteomics for the assessment of quality and safety of fishery products. *Food Research International*, 0.
- Carrera, M., Canas, B., Pineiro, C., Vazquez, J. et Gallardo, J. M.** (2006) Identification of commercial hake and grenadier species by proteomic analysis of the parvalbumin fraction. *Proteomics* 6, 19, pp 5278-87.
- Castro, P., Penedo Padron, J. C., Caballero Cansino, M. J., Sanjuan Velazquez, E. et Millan De Larriva, R.** (2006) Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control* 17, 4, pp 245-248.
- Celio, M. R. et Heizmann, C. W.** (1981) Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature* 293, 5830, pp 300-2.
- Celio, M. R. et Heizmann, C. W.** (1982) Calcium-binding protein parvalbumin is associated with fast contracting muscle fibres. *Nature* 297, 5866, pp 504-6.
- Chen, B. N., Qin, J. G., Kumar, M. S., Hutchinson, W. G. et Clarke, S. M.** (2006a) Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 260, 1-4, pp 264-271.
- Chen, L., Hefle, S. L. et Goodman, R. E.** (2006b) Detection of Parvalbumin in Various Fish Species by 1D and 2D Electrophoresis and Western Blots Using a Commercially Available Anti-frog Parvalbumin MAb. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 2, Supplement 1, p S41.
- Chen, L., Hefle, S. L., Taylor, S. L., Swoboda, I. et Goodman, R. E.** (2006c) Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG. *J Agric Food Chem* 54, 15, pp 5577-82.
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton, M. d. et Verrez-Bagnis, V.** (2007) Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry* 101, 4, pp 1474-1479.
- Chevallet, M., Luche, S., Diemer, H., Strub, J. M., Van Dorsselaer, A. et Rabilloud, T.** (2008) Sweet silver: a formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry. *Proteomics* 8, 23-24, pp 4853-61.
- Connell, J. J.** (1995) *Control fish quality*, ;4 edition ed., Wiley-Blackwell; 4 edition.
- Coughlin David J., S. S., Wilwet Jennifer L.** (2007) Parvalbumin expression in trout swimming muscle correlates relaxation rate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 147, pp 1074-1082.
- D'Alessandro, A. et Zolla, L.** (2012) We are what we eat: food safety and proteomics. *J Proteome Res* 11, 1, pp 26-36.
- Dall'Antonia, F., Pavkov-Keller, T., Zangger, K. et Keller, W.** (2013) Structure of allergens and structure based epitope predictions. *Methods*, 0.
- Damez, J.-L. et Clerjon, S.** (2008) Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Science* 80, 1, pp 132-149.

- Dapkevicius, M. L. N. E., Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., Houben, J. H. et Wymenga, W.** (2000) Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 57, 1–2, pp 107-114.
- Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noel, J. et Fleurence, J.** (2004) Proteolytic potential in white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during post mortem storage on ice: time-dependent changes in the activity of the components of the calpain system. *Food Chemistry* 84, 3, pp 441-446.
- Demaillie, J., Dutruge, E., Eisenberg, E., Capony, J.-P. et Pechere, J.-F.** (1974) Troponins C from reptile and fish muscles and their relation to muscular parvalbumins. *FEBS Letters* 42, 2, pp 173-178.
- Duflos, G., Dervin, C., Malle, P. et Bouquelet, S.** (1999a) *Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (Pleuronectes platessa) and whiting (Merlangus merlangus)*, Vol. 82, ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, ETATS-UNIS.
- Duflos, G., Dervin, C., Malle, P. et Bouquelet, S.** (1999b) Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *J AOAC Int* 82, 6, pp 1357-63.
- Duflos, G., Leduc, F., N'Guessan, A., Krzewinski, F., Kol, O. et Malle, P.** (2010) Freshness characterisation of whiting (*Merlangus merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *J Sci Food Agric* 90, 15, pp 2568-75.
- Duflos, G., Lefur, B., Mulak, V., Becel, P. et 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, pp 1341-1345.
- Duun, A. S. et Rustad, T.** (2007) Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. *Food Chemistry* 105, 3, pp 1067-1075.
- Erikson, U., Misimi, E. et Gallart-Jornet, L.** (2011) Superchilling of rested Atlantic salmon: Different chilling strategies and effects on fish and fillet quality. *Food Chemistry* 127, 4, pp 1427-1437.
- Etienne, M.** (1998) Méthodes d'évaluation de la qualité. *Recherches Marines* 18, 6.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Costa, H. et Martinez, I.** (2001) Species identification of formed fishery products and high pressure-treated fish by electrophoresis: a collaborative study. *Food Chemistry* 72, 1, pp 105-112.
- Etienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kundiger, R., Mendes, R., Costa, H., Perez-Martin, R., Pineiro-Gonzalez, C., Craig, A., Mackie, I., Malmheden Yman, I., Ferm, M., Martinez, I., Jessen, F., Smelt, A. et Luten, J.** (2000) Identification of fish species after cooking by SDS-PAGE and urea IEF: a collaborative study. *J Agric Food Chem* 48, 7, pp 2653-8.
- Eyckmans, M., Benoot, D., Van Raemdonck, G. A., Zegels, G., Van Ostade, X. W., Witters, E., Blust, R. et De Boeck, G.** (2012) Comparative proteomics of copper exposure and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 7, 2, pp 220-232.
- Faeste, C. K. et Plassen, C.** (2008) Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *J Immunol Methods* 329, 1-2, pp 45-55.
- Faullimel, C., Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Guterl, P. et Marchioni, E.** (2005) DNA comet assay for the detection of time-temperature abuse during the storage of poultry. *J Food Prot* 68, 7, pp 1414-20.

- Fernández-Segovia, I., Fuentes, A., Aliño, M., Masot, R., Alcañiz, M. et Barat, J. M.** (2012) Detection of frozen-thawed salmon (*Salmo salar*) by a rapid low-cost method. *Journal of Food Engineering* 113, 2, pp 201-216.
- Fernandez, M., Mano, S., Garcia de Fernando, G. D., Ordonez, J. et Hoz, L.** (1999) Use of b-hydroxyacyl-coA-deshydrogenase (HADH) activity to differentiate frozen from unfrozen fish. *European Food Research*, 209, pp 205-209.
- Francois, J.-M., Altintas, A. et Gerday, C.** (1997) Characterization of the Single Tyrosine Containing Troponin C from Lungfish White Muscle. Comparison with Several Fast Skeletal Muscle Troponin C's from Fish Species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 117, 4, pp 589-598.
- Fuentes, A., Masot, R., Fernández-Segovia, I., Ruiz-Rico, M., Alcañiz, M. et Barat, J. M.** (2013) Differentiation between fresh and frozen-thawed sea bream (*Sparus aurata*) using impedance spectroscopy techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 19, 0, pp 210-217.
- Galland, A. V., Dory, D., Pons, L., Chopin, C., Rabesona, H., Guéant, J. L. et Fleurence, J.** (1998) Purification of a 41 kDa cod-allergenic protein. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 706, 1, pp 63-71.
- Glencross, B., Michael, R., Austen, K. et Hauler, R.** (2008) Productivity, carcass composition, waste output and sensory characteristics of large barramundi *Lates calcarifer* fed high-nutrient density diets. *Aquaculture* 284, 1-4, pp 167-173.
- Goolish, E. M.** (1990) aerobic and anaerobic scaling in fish. *Biol. rev.* 66, p 24.
- Gornati, R., Terova, G., Vigetti, D., Prati, M., Saroglia, M. et Bernardini, G.** (2004) Effects of population density on seabass (*Dicentrarchus labrax*, L.) gene expression. *Aquaculture* 230, 1-4, pp 229-239.
- Grattepanche, J.-D., Breton, E., Brylinski, J.-M., Lecuyer, E. et Christaki, U.** (2011) Succession of primary producers and micrograzers in a coastal ecosystem dominated by *Phaeocystis globosa* blooms. *Journal of Plankton Research* 33, 1, pp 37-50.
- Hattula, T.** (1997) Adenosine triphosphate breakdown products as a freshness indicator of some fish species and fish products. *VTT Publications*.
- Heizmann, C. W.** (1984) Parvalbumin, and intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia* 40, 9, pp 910-921.
- Herrera-Mendez, C. H., Becila, S., Boudjellal, A. et Ouali, A.** (2006) Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology* 17, 8, pp 394-405.
- Hilger, C., Thill, L., Grigioni, F., Lehnert, C., Falagiani, P., Ferrara, A., Romano, C., Stevens, W. et Hentges, F.** (2004) IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin. *Allergy* 59, 6, pp 653-60.
- Holzhauser, T. et Vieths, S.** (1999) Indirect Competitive ELISA for Determination of Traces of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Protein in Complex Food Matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2, pp 603-611.
- Huang, M.-C. et Ochiai, Y.** (2005) Fish fast skeletal muscle tropomyosins show species-specific thermal stability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 141, 4, pp 461-471.
- Hui, Y. H., Legarretta, I. G., Lim, M. H., Murrell, K. D. et Nip, W. K.** (2004) *Handbook of Frozen Foods*, ed., Taylor & Francis.
- Huriaux, F., Mélot, F., Vandewalle, P., Collin, S. et Focant, B.** (1996) Parvalbumin Isotypes in White Muscle from Three Teleost Fish: Characterization and Their Expression During

- Development. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B* 113B, 3, pp 475-484.
- Huss, H. H.** (1988) *Le Poisson frais: qualité et altérations de la qualité, manuel de formation préparé pour le Programme de perfectionnement FAO/DANIDA sur la technologie du poisson et le contrôle de qualité*, ed., Fao Inter-Departmental Working Group.
- Huss, H. H.** (1999) *La qualité et son évolution dans le poisson frais*, ed., Rome.
- Ibanez, F., Fromentin, J.-M. et Castel, J.** (1993) *Application de la méthode des sommes cumulées à l'analyse des séries chronologiques en océanographie*, Vol. 316, ed., Elsevier, Paris, FRANCE.
- Iglesias, J., Medina, I., Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A. et Musci, M.** (2009) Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen-thawed cultured gilthead sea bream fish by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* 115, 4, pp 1473-1478.
- Jackman, D. M., Pham, T., Noel, J. J., Waddleton, D. M., Dhoot, G. K. et Heeley, D. H.** (1998) Heterogeneity of Atlantic salmon troponin-I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1387, 1-2, pp 478-484.
- Jensen, K. N., Jørgensen, B. M. et Nielsen, J.** (2003) Low-temperature transitions in cod and tuna determined by differential scanning calorimetry. *LWT - Food Science and Technology* 36, 3, pp 369-374.
- Karim, A. A. et Bhat, R.** (2009) Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 23, 3, pp 563-576.
- Karoui, R. et Blecker, C.** (2011) Fluorescence Spectroscopy Measurement for Quality Assessment of Food Systems—a Review. *Food and Bioprocess Technology* 4, 3, pp 364-386.
- Karoui, R., Thomas, E. et 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, pp 349-355.
- Kilinc, B. et Cakli, S.** (2004) Chemical, microbiological and sensory changes in thawed frozen fillets of sardine (*Sardina pilchardus*) during marination. *Food Chemistry* 88, 2, pp 275-280.
- Kim, J., Murata, M. et Sagakuchi, M.** (1987) A method for the differentiation of frozen-thawed from unfrozen fish fillets by a combination of torrymeter readings and K. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 1, pp 159-164.
- Kitamikado, N., Yuan, C.-S. et Ueno, R.** (1990) An Enzymatic Method Designed to Differentiate between Fresh and Frozen-thawed Fish. *Journal of Food Science* 55, 1, pp 74-76.
- Knorr, G. et Meyer, V.** (1975) *Atlas zur Anatomie und Morphologie der Nutzfische: für den praktischen Gebrauch in Wissenschaft und Wirtschaft*, ed., P. Parey.
- Koppelman, S. J., Romijn, R. A., De Jongh, H. H. J., Nordlee, J. A., Piersma, S., Hessing, M. et Taylor, S. L.** (2010) Purification of Parvalbumin from Carp: A Protocol that Avoids Heat-Treatment. *Journal of Food Science* 75, 3, pp T49-T56.
- Korhonen, R. W., Lanier, T. C. et Giesbrecht, F.** (1990) An evaluation of simple methods for following rigor development in fish. *J. Food Sci.* 55, 368, pp 346-348.
- Kristina Nedenskov Jensen, B. M. J.** (2003) Effect of storage conditions on differential scanning calorimetry profiles from thawed cod muscle. *LWT - Food Science and Technology* 36, 8, pp 807-812.

- Kuhl, H., Beck, A., Wozniak, G., Canario, A., Volckaert, F. et Reinhardt, R. (2010) The European sea bass *Dicentrarchus labrax* genome puzzle: comparative BAC-mapping and low coverage shotgun sequencing. *BMC Genomics* 11, 1, p 68.
- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noel, J. et Fleurence, J. (2003) In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry* 81, 4, pp 517-525.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 5259, pp 680-685.
- Le Grandois, J., Ruas, M., Kalisa, P., Jolissaint, M., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D., Le Fur, B. et Ennahar, S. (2013) Detection of cold chain abuse in frozen and chilled salmon using the comet assay. *LWT - Food Science and Technology* 54, 1, pp 242-248.
- Leduc, F., Krzewinski, F., Le Fur, B., N'Guessan, A., Malle, P., Kol, O. et Duflos, G. (2012a) Differentiation of fresh and frozen/thawed fish, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*), using volatile compounds by SPME/GC/MS. *J Sci Food Agric* 92, 12, pp 2560-8.
- Leduc, F., Tournayre, P., Kondjoyan, N., Mercier, F., Malle, P., Kol, O., Berdagué, J. L. et Duflos, G. (2012b) Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry* 131, 4, pp 1304-1311.
- Lee, P. W., Nordlee, J. A., Koppelman, S. J., Baumert, J. L. et Taylor, S. L. (2012) Measuring parvalbumin levels in fish muscle tissue: relevance of muscle locations and storage conditions. *Food Chem* 135, 2, pp 502-7.
- Lee, R. et Kim, G. B. (2002) Comet assays to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxicants. *Marine Environmental Research* 54, 3-5, pp 465-469.
- Lee, R. F. et Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 1, pp 43-64.
- Linden, G. et Lorient, D. (1994) *Biochimie agro-industrielle: Valorisation alimentaire de la production agricole*, ed., Masson.
- López, L. M., Durazo, E., Viana, M. T., Drawbridge, M. et Bureau, D. P. (2009) Effect of dietary lipid levels on performance, body composition and fatty acid profile of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture* 289, 1-2, pp 101-105.
- Love, R. M. (1970) *The chemical biology of fishes: with a key to the chemical literature*, ed., Academic Press.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P. et Estevez, M. (2011) Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol Nutr Food Res* 55, 1, pp 83-95.
- Luther, P. K., Munro, P. M. G. et Squire, J. M. (1995) Muscle ultrastructure in the teleost fish. *Micron* 26, 5, pp 431-459.
- Maldini, M., Nonnis Marzano, F., Fortes, G. G., Papa, R. et Gandolfi, G. (2006) Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture* 261, 2, pp 487-494.
- Malle, P., Eb, P. et Tailliez, R. (1986) Determination of the quality of fish by measuring trimethylamine oxide reduction. *International Journal of Food Microbiology* 3, 4, pp 225-235.
- Malle, P. et Tao, S. H. (1987) Rapid Quantitative Determination of triethylamine using stream. *J. Food Protection* 50, 9, p 4.

- Marrubini, G., Fattorini, P., Previdere, C., Goi, S., Sorcaburu Cigliero, S., Grignani, P., Serra, M., Biesuz, R. et Massolini, G.** (2012) Experimental design applied to the optimization of microwave-assisted DNA hydrolysis. *J Chromatogr A* 1249, pp 8-16.
- Martinez, I. e. a.** (1997) Seafood: fulfilling market demand. *Outlook on Agriculture* 26, 197.
- Marvillet, C.** (2001) Applications industrielles du froid Industries utilisatrices. *Techniques de l'ingénieur Production de froid : machines frigorifiques et réfrigérants base documentaire : TIB211DUO*, ref. article : be9756.
- Mazur, P.** (1963) Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 47, pp 347-69.
- Mazur, P.** (2009) A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. *Cryobiology* 60, 1, pp 4-10.
- Misimi, E., Erikson, U., Digre, H., Skavhaug, A. et Mathiassen, J. R.** (2008) Computer Vision-Based Evaluation of Pre- and Postrigor Changes in Size and Shape of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets during Rigor Mortis and Ice Storage: Effects of Perimortem Handling Stress
doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00626.x. *Journal of Food Science* 73, 2, pp E57-E68.
- Morel, M.** (1979) Une méthode pour déterminer si le poisson est à l'état frais ou décongelé. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.* n°288, pp 13-17.
- Nielsen, J.** (1995) *Sensory changes. Quality and quality changes in fresh fish*, Vol. 348, ed., Huss H.H. (Ed.).
- Nilsson, K. et Ekstrand, B.** (1993) The effect of storage on ice and various freezing treatments on enzyme leakage in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 197, 1, pp 3-7.
- O'Farrell, P. H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, pp 4007-4021.
- Olafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I. M., Henehan, G., Nielsen, J. et Nilsen, H.** (1997) Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology* 8, 8, pp 258-265.
- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S. a. V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A. et Jørgensen, B. M.** (2004) Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science & Technology* 15, 2, pp 86-93.
- Olsson, G. B., Seppola, M. A. et Olsen, R. L.** (2007) Water-holding capacity of wild and farmed cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) muscle during ice storage. *LWT - Food Science and Technology* 40, 5, pp 793-799.
- Østli, J., Esaiassen, M., Garitta, L., Nøstvold, B. et Hough, G.** (2013) How fresh is fresh? Perceptions and experience when buying and consuming fresh cod fillets. *Food Quality and Preference* 27, 1, pp 26-34.
- Osuna-Jiménez, I., Williams, T. D., Prieto-Álamo, M.-J., Abril, N., Chipman, J. K. et Pueyo, C.** (2009) Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 5, pp 699-706.
- Özogul, F., Özogul, Y. et Kuley, E.** (2008) Nucleotide degradation and biogenic amine formation of wild white grouper (*Epinephelus aeneus*) stored in ice and at chill temperature (4 °C). *Food Chemistry* 108, 3, pp 933-941.
- Pan, B. S., Jen, C. et Chow.** (2004) dans *Handbook of Frozen Foods* Ed.) pp, CRC Press.

- Panserat, S., Hortopan, G. A., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skiba-Cassy, S., Esquerré, D., Geurden, I., Médale, F., Kaushik, S. et Corraze, G.** (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294, 1-2, pp 123-131.
- Parisi, G., Franci, O. et Poli, B. M.** (2002) Application of multivariate analysis to sensorial and instrumental parameters of freshness in refrigerated sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during shelf life. *Aquaculture* 214, 1-4, pp 153-167.
- Pavalov, A.** (2007) Changes in the meat from aquaculture species during storage at low temperature and attempts from differentiation between thawed-frozen and fresh chilled meat. A review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 10, 2, pp 67-75.
- Pavlov, A., Garcia de Fernando, G. D., Diaz, O., Fernandez, M., Lopez, D., Ordonez, J. et Hoz, L.** (1994) Effect of freezing on the β -hydroxyacyl-coA-deshydrogenase (HADH) activity of fish meat. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 198, pp 465-468.
- Pineiro, C., Barros-Velazquez, J., Perez-Martin, R. I., Martinez, I., Jacobsen, T., Rehbein, H., Kundiger, R., Mendes, R., Etienne, M., Jerome, M., Craig, A., Mackie, I. M. et Jessen, F.** (1999) Development of a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis reference method for the analysis and identification of fish species in raw and heat-processed samples: a collaborative study. *Electrophoresis* 20, 7, pp 1425-32.
- Pruthi, J. S.** (1999) *Quick Freezing Preservation of Foods: Foods of animal origin*, ed., Allied Publishers.
- Quéro, J. C. et Vayne, J. J.** (1997) *Les poissons de mer des pêches françaises*, ed., Delachaux et Niestlé.
- Rabilloud, T.** (2009) Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies. *Mass Spectrometry Reviews*.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S. et Lelong, C.** (2010) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics* 73, 11, pp 2064-2077.
- Rabilloud, T. et Lelong, C.** (2011) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J Proteomics* 74, 10, pp 1829-41.
- Rabilloud, T. et Santoni, V.** (2000) *Solubilisation des protéines en vue d'une analyse par électrophorèse bidimensionnelle*, Le protéome: nouvelles approches expérimentales et systèmes étudiés, Jouy-en-Josas.
- Rahman, S.** (2007) *Handbook of Food Preservation, Second Edition*, ed., Taylor & Francis.
- Rajkumar, M. et Kumaraguru vasagam, K. P.** (2006) Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 261, 2, pp 649-658.
- Rehbein, H.** (1979) Development of an enzymatic method to differentiate fresh and sea-frozen and thawed fish fillets. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 169, pp 263-265.
- Rehbein, H.** (1992) Physical and biochemical methods for the differentiation between fresh and frozen-thawed fish or fillets. *Italian J. of Food Sci.* 2, pp 75-86.
- Rehbein, H.** (1995) Differentiation of scombroid fish species (tunas, bonitos and mackerels) by isoelectric focusing, titration curve analysis and native polyacrylamide gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. *Electrophoresis* 16, 5, pp 820-2.

- Rehbein, H. et Aust, M.** (1980) Einsatzmöglichkeiten des torrymeters und enzymatischer analysenverfahren zur untersuchung eisgelagerter fische und filets auf auftauware. *Arch. Fisch Wiss* 30, 181, pp 181-188.
- Rehbein, H. et Karl, H.** (1985) Solubilization of fish muscle proteins with buffers containing sodium dodecyl sulfate. *Z Lebensm Unters Forsch* 180, 5, pp 373-8.
- Rehbein, H., Kundiger, R., Pineiro, C. et Perez-Martin, R. I.** (2000) Fish muscle parvalbumins as marker proteins for native and urea isoelectric focusing. *Electrophoresis* 21, 8, pp 1458-63.
- Richard, N., Mourente, G., Kaushik, S. et Corraze, G.** (2006) Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 261, 3, pp 1077-1087.
- Rodrigues, P. M., Silva, T. S., Dias, J. et Jessen, F.** (2012) PROTEOMICS in aquaculture: Applications and trends. *J Proteomics*.
- Rogowska-Wrzesinska, A., Le Bihan, M.-C., Thaysen-Andersen, M. et Roepstorff, P.** (2013) 2D gels still have a niche in proteomics. *Journal of Proteomics* 88, 0, pp 4-13.
- Rouillé, J., Lebail, A., Ramaswamy, H. S. et Leclerc, L.** (2002) High pressure thawing of fish and shellfish. *Journal of Food Engineering* 53, 1, pp 83-88.
- Saito, T., Rai, K. et Matsuyoshi, M.** (1959) A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 24, pp 573-575.
- Sánchez-Alonso, I., Martinez, I., Sánchez-Valencia, J. et Careche, M.** (2012) Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius*, L.) by low field NMR. *Food Chemistry* 135, 3, pp 1626-1634.
- Schubring, R.** (1999) DSC studies on deep frozen fishery products. *Thermochimica Acta* 337, 1-2, pp 89-95.
- Schubring, R., Meyer, C., Schlüter, O., Boguslawski, S. et Knorr, D.** (2003) Impact of high pressure assisted thawing on the quality of fillets from various fish species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4, 3, pp 257-267.
- Sepulveda-Villet, O. J., Ford, A. M., Williams, J. D. et Stepien, C. A.** (2009) Population genetic diversity and phylogeographic divergence patterns of the yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of Great Lakes Research* 35, 1, pp 107-119.
- Simons, F. E. R., Frew, A. J., Ansotegui, I. J., Bochner, B. S., Golden, D. B. K., Finkelman, F. D., Leung, D. Y. M., Lotvall, J., Marone, G., Metcalfe, D. D., Müller, U., Rosenwasser, L. J., Sampson, H. A., Schwartz, L. B., van Hage, M. et Walls, A. F.** (2007) Risk assessment in anaphylaxis: Current and future approaches. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120, 1, Supplement 1, pp S2-S24.
- Smet, S. D.** (2012) Meat, poultry, and fish composition: Strategies for optimizing human intake of essential nutrients. *Animal Frontiers* 2, 4, pp 10-16.
- Spinnler, H.-É.** (2008) Transformation et conservation des produits agroalimentaires. *Techniques de l'ingénieur Procédés biochimiques et chimiques en agroalimentaire base documentaire : TIB431DUO*, ref. article : f3450.
- Swoboda, I., Bugajska-Schretter, A., Verdino, P., Keller, W., Sperr, W. R., Valent, P., Valenta, R. et Spitzauer, S.** (2002) Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J Immunol* 168, 9, pp 4576-84.
- Tejada, M., Solas, M. T., Navas, A. et Mendizabal, A.** (2006) Scanning electron microscopy of *Anisakis* larvae following different treatments. *J Food Prot* 69, 6, pp 1379-87.

- Terova, G., Pisanu, S., Roggio, T., Preziosa, E., Saroglia, M. et Addis, M. F.** (2013) Proteomic profiling of sea bass muscle by two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Fish Physiol Biochem* 21, p 21.
- Tilghman.** (1996) Parvalbumins as a Biomarker for Fish Species Identification: Applications to Snook (*Centropomus undecimalis*) Preservation.
- Tironi, V., De Lamballerie, M. et Le-Bail, A.** (2010) Quality changes during the frozen storage of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle after pressure shift freezing and pressure assisted thawing.
- Tironi, V., LeBail, A. et De Lamballerie, M.** (2007) Effects of Pressure-Shift Freezing and Pressure-Assisted Thawing on Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Quality. *Journal of Food Science* 72, 7, pp C381-C387.
- Uddin, M., Okazaki, E., Turza, S., Yumiko, Y., Tanaka, M. et Fukuda, Y.** (2005) Non-destructive Visible/NIR Spectroscopy for Differentiation of Fresh and Frozen-thawed Fish. *Journal of Food Science* 70, 8, pp c506-c510.
- Uddin, M. e. O., E.** (2004) Différenciation des poissons frais ou congelés / décongelés par spectrométrie proche-infrarouge. *Journal of Food Science* 8, 69, pp 665-668.
- Valente, L. M. P., Bandarra, N. M., Figueiredo-Silva, A. C., Cordeiro, A. R., Simões, R. M. et Nunes, M. L.** (2007) Influence of conjugated linoleic acid on growth, lipid composition and hepatic lipogenesis in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Nutrition and Feeding of Fish - This Special Issue presents a small fraction of the presentations presented at the XII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding held in Biarritz, France, May 28 to June 1, 2006.* 267, 1-4, pp 225-235.
- Van Do, T., Elsayed, S., Florvaag, E., Hordvik, I. et Endresen, C.** (2005a) Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immunol* 116, 6, pp 1314-20.
- Van Do, T., Hordvik, I., Endresen, C. et Elsayed, S.** (2005b) Characterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollack, and comparison with codfish Allergen M. *Molecular Immunology* 42, pp 345-353.
- Venugopal, V.** (2006) *Seafood Processing. Adding Value Through Quick Freezing, Retortable Packaging, and Cook-Chilling*, ed., CRC Press.
- Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., Morzel, M., Noel, J. et Fleurence, J.** (2001) Protein changes in post mortem sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle monitored by one- and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 22, 8, pp 1539-44.
- Vinagre, J., Rodríguez, A., Larraín, M. A. et Aubourg, S. P.** (2011) Chemical composition and quality loss during technological treatment in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Food Research International* 44, 1, pp 1-13.
- Vogt Jr, R. V., Phillips, D. L., Omar Henderson, L., Whitfield, W. et Spierto, F. W.** (1987) Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *Journal of Immunological Methods* 101, 1, pp 43-50.
- Wang, Y., Xu, H., Wei, M., Gu, H., Xu, Q. et Zhu, W.** (2009) Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay. *Materials Science and Engineering: C* 29, 3, pp 714-718.
- Weber Patrick, Hans Steinhart et Passchke, A.** (2009) Competitive indirect ELISA for the determination of parvalbumins from Various Fish Species in Food Grade Fish Gelatins and Isinglass with PARV-19 Anti-Parvalbumin Antibodies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 11328, 57, pp 11328-11334.

- Wei, Y., Wang, J., Zhang, X., Xu, M. et Dai, J.** (2007) Identification and characterization of expressed sequence tags from the liver of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 2, 4, pp 356-362.
- Wopfner, N., Dissertori, O., Ferreira, F. et Lackner, P.** (2007) Calcium-Binding Proteins and Their Role in Allergic Diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 27, 1, pp 29-44.
- Xia, X., Kong, B., Xiong, Y. et Ren, Y.** (2010) Decreased gelling and emulsifying properties of myofibrillar protein from repeatedly frozen-thawed porcine longissimus muscle are due to protein denaturation and susceptibility to aggregation. *Meat Science* 85, 3, pp 481-486.
- Yoshioka, K. et Kitamikado, M.** (1983) Differentiation of freeze-thawed fish from fresh fish by the examination of medulla crystalline lens. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish* 49, 1, p 151.
- Zheng, C., Wang, X., Lu, Y. et Liu, Y.** (2012) Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control* 26, 2, pp 446-452.
- Zhu, F., Zhang, D., He, Y., Liu, F. et Sun, D.-W.** (2012) Application of Visible and Near Infrared Hyperspectral Imaging to Differentiate Between Fresh and Frozen–Thawed Fish Fillets. *Food and Bioprocess Technology*, pp 1-7.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C. et Vilella, S.** (2003) Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 47, 3, pp 227-235.

ANNEXES

Annexe 1 : version de travail de l'article sur la parvalbumine

Differentiation of fresh Sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) fillets to frozen/thawed fillets using two-dimensional electrophoresis

Pierrette ETHUIN^a, Sylvain MARLARD^a, Mylène GOBERT^b, Christine CARAPITO^c, Alexandre DEHAUT^d, Guillaume DUFLOS^d and Thierry GRARD^a

a Université du Littoral Côte d'Opale, équipe APA, Bd Bassin Napoléon, BP 120, 62327 Boulogne sur mer (France)

b INRA, UR 1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

c Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), Institut Pluridisciplinaire Hubert CURIEN 23 rue du loess - BP28 67037 Strasbourg cedex 2 (France)

d ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments – Site de Boulogne-sur-Mer, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne sur mer (France)

Key words : fish, 2D electrophoresis, thawed, fresh, TVBN

Corresponding author: Tel: +33 3 21 99 45 20; fax: +33 3 21 99 45 24. E-mail address: pierrette.ethuin@univ-littoral.fr (P. Ethuin).

Summary

The aim of this study was to determine a protein marker to differentiate the fresh skinless fish sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) fillet from a frozen/thawed one. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE) was correlated with fish spoilage by a kinetic approach of Total Volatil Basic Nitrogen and biogenic amines. Two different protein patterns localized on the low molecular weight and low isoelectric point area at the bottom left part of the 2DE profiles permits to distinguish fresh fish fillet from frozen/thawed one. These proteins appear from the first day of thawing meanwhile fresh fillets proteins are not identified until 13 days of storage at 4°C, beyond the limit of their consumption determined by freshness indicators. These proteins were identified by mass spectrometry as parvalbumins (alpha and beta) and can be used as markers of differentiation between fresh vs frozen/thawed fish fillets.

INTRODUCTION

In the seafood market for several years the wild resource goes to rarefaction while the consumers' request increases. The development of freezing storage allows the producers and suppliers to exchange products all around the world to meet the demand. Nevertheless freezing and thawing causes sensorial changes and a loss of quality (Matsumoto, 1979). Thawed and frozen fillets are in concurrence with fresh production. Differentiation tests fresh versus thawed fillets are evaluating and used to bring out the fresh fish production. Freshness is the most important criterion for judging the quality of fish and a lot of methods have been studied to measure this freshness ((Alimelli, Pennazza, Santonico, Paolesse, Filippini, D'Amico, et al., 2007; Gil, Barat, Garcia-Breijo, Ibanez, Martinez-Manez, Soto, et al., 2008)). But currently fraudulent practices consist in the freezing / thawing of fishes and selling with a fresh denomination. Different methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish exist (Karoui, Thomas, & Dufour, 2006). (Duflos, Lefur, Mulak, Becel, & Malle, 2002) recommended the enzymatic method using alpha-glucosidase assay, which should be made in parallel of the freshness measurement to avoid confusing between a frozen/thawed fish to an advanced stage of spoilage fish. Freezing / thawing are known to increase protein denaturation (Benjakul & Bauer, 2001), lipid oxidation (Baron, Kjaersgard, Jessen, & Jacobsen, 2007; Duun & Rustad, 2007) and drip-loss (Zhu, Ramaswamy, & Simpson, 2004). For moderate sub-freezing temperatures, the extracellular water usually freezes and cells may suffer large osmotic contraction. These changes will induce membranes and other ultrastructural elements damages (Mazur, 2010; Pegg, 2010). The leading cause of rupture is an electrical potential difference to the membrane. During thawing, the diluted external medium induces an increase in cell volume. The plasma membrane cannot support such an important hydrostatic pressure (Tchir & Acker, 2010). These constraints lead to plasma and intracellular membrane rupture. The organites contents release induce the future tissue alteration. Indirectly the freezing control plays a primary role of the future control alteration (Tironi, LeBail, & de Lamballerie, 2007; Tironi Valeria, 2010).

Few works have been realized to map muscle changes due to freezing (Fernandez, 1999), (Kjaersgard, Norrelykke, & Jessen, 2006). The use of proteomics to differentiate fresh to frozen/thawed fish is inspired from the use of proteomics in different applications such as the determination of species identification (Etienne, Jérôme, Fleurence, Rehbein, Kündiger, Mendes, et al., 2001) or the characterization of changes induced in alive organisms by environmental pollutants (I. Martinez & Friis, 2004).

Two-dimensional electrophoresis (2-DE) of fresh and frozen muscle have been shown suitable to identify the species, tissues, and development stage (I. Martinez & Friis, 2004). This technique was also used to reveal changes in cod muscle during frozen storage (Kjaersgard, et al., 2006) or to differentiate wild to farmed cod (Iciar Martinez, Slizyte, & Dauksas, 2007). The 2D electrophoresis comparative strategy has already been used to determinate the species of a fish fillet and discern Nile Perch to other same looking species (Berrini, Tepedino, Borromeo, & Secchi, 2006). Other studies have been used the 2D electrophoresis to evaluate sea bass freshness (Verrez-Bagnis, 2001) or to differentiate fresh from thawed cod (Kjaersgard, et al., 2006) or for providing information on the sea bass muscle tissue-specific expression (Terova, Pisanu, Roggio, Preziosa, Saroglia, & Addis, 2013). The farmed Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) was chosen as a model. This presented several advantages: fish date time exactly known, managed process, limited genetic variations, and same conditions of life, feeding, environment, temperature, age and graded weight. The 2D electrophoresis was used to differentiate protein patterns between fresh and frozen/thawed fish fillets. To avoid the detection of the marker in fresh fillet exudates, the kinetic evolution of freshness and spoilage indicator have been checked. The aim of this study was to compare electrophoresis profiles of fresh and thawed fillets to detect spots of interest, then to characterise them by mass spectrometry in order to identify biomarkers to distinguish the stored fillet state: fresh or frozen.

Materials and methods

Fish material

The experiment was carried out at the sea farm Aquanord (Gravelines, France). Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were distributed into tanks containing twenty-five thousands sea bass at a maximum concentration of 40 kg per m³. The tanks were connected to a sea water recirculation system with the following conditions: temperature 18±5°C, pH 8.2, total ammonia < 30 µmol/L, and dissolved oxygen level over 99% of the saturation (7 ppm). At the day zero, eight to ten fishes (average body weight 500 ± 150 g) were removed from water and sacrificed by asphyxia/hypothermia (immersion in ice-cold water at a fish:ice ratio 3.1). Fish are then trucked from Gravelines in ice until Boulogne-sur-mer (France) (1hour travel). The fish are immediately filleted (CFPMT, Boulogne-sur-mer) to obtain skinless fillets. Cling-film protected fillets were stored into polystyrene boxes with flaked ice and maintained at 0-+4°C. All stages of processing, storage and freezing treatments were done in industrial conditions. Fillets are then divided into two groups of four fillets each:

- Fresh fish group, stored at 4°C and conducted according to kinetics of fifteen days with sampling days at 0,3,6,9,13,15.
- Frozen/thawed fish group frozen at -30°C and stored in a at -20°C (Plateforme Nouvelles Vagues, Boulogne-sur-mer, France).

The sampling for the two groups was performed by taking a fragment of white muscle tissue (1x1x1cm) from the lateral-dorsal (epiaxial) muscle quadrant of each fish.

These experiments were repeated three times to a minimum.

The second group: The thawing takes place in same conditions as the fresh fillet storage. During this step, water was drained through the outlets of the boxes and ice recovered every day. Samples were taken at different dates after the filleting: (Day 0, D1, 3, 6, 9, 13, 15) to establish 2DE profiles and freshness evolution kinetics.

Protein extraction: Fish exudates preparation

Exudate correspond to extract from flesh juice (Morel, 1979) using pressure or centrifugation (Tironi Valeria, 2010), (Ayala, López Albors, Blanco, García Alcázar, Abellán, Ramírez Zarzosa, et al., 2005). When meat is frozen and then thawed the cells' organelles and membranes are broken. The cytosolic proteins which are normally inside the cells are found back out of the cells (Tironi Valeria, 2010). In a fresh meat exudates, cytosolic, mitochondrial or lysosome proteins are less present than in a thawed meat exudates.

The preparation of the fish exudates is based on a soft protein solubilisation (Duflos, et al., 2002). Each stage of the protocol was realized at + 4°C.

Only the dorsal white flesh of fillet was used in this study. Soluble proteins were obtained from 20 g of diced white flesh (approx. 1cm edge) of thawed or fresh fillet placed in 1 volume (w/v) of phosphate buffer (10 mM, pH 7,4) containing anti-proteases: 1 % PMSF (10 mg/mL isopropanol), 0.2 % pepstatin (0.35 mg/mL ethanol) and 0.1 % leupeptin-aprotinin (mix of leupeptin 0.5 mg/mL and aprotinin 1 mg/mL). After gentle agitation, the suspensions were centrifuged at 34000 g, 4°C for 30 min simulating the pressure necessary to obtain an exudate. After discarding lipids by pipeting and after twice supernatant filtrating on a 0.45 µm membrane (Millex), the amount of proteins was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) using Bio-Rad reagent (Biorad, France) and BSA (Bovine Serum Albumin) as standards. The proteins were concentrated on a 10 kDa clipping sill filter in the Amicon cell 8003 (Millipore, Molsheim, France). Rehydration buffer containing 8 M Urea, 4 % 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 20 mM dithiothreitol

(DTT), 0.2 % ampholytes (100X Biolyte 3-10 Ampholyte, Biorad) is added to reach 6.66 mg/mL and 0.001 % bromophenol blue used to follow the migration.

Electrophoreses

To avoid keratin contamination, there is a need for self-protection. Each solutions used were filtered on 0.45µm filter and made with double distilled water (18 MΩ). All of the products used were proteomics quality (Proteomics and Genomics).

First dimension Iso-electric Electrophoresis Focusing (IEF)

The iso-electric electrophoresis focusing was performed with the Biorad ReadyStrip IPG Strips, 17 cm of length (pI gradient = 3-10). According to the instructions of the manufacturer, IPG strips were rehydrated during 6 hours (passive rehydration) with a mix of 300 µL protein sample and 200 µL of rehydration solution, 2mg of protein were loaded in 500µL on strip. Then the rehydrated strips were positioned in the Protean IEF Cell (Biorad) on the focusing plate for 15 h at 50 V (active rehydration). Proteins focus during 27 hours for a total of 85000 Vh without exceeded the intensity of 50 µA per strip.

After focusing, the strips were incubated into two equilibration buffers during 10 mn each. The first equilibration buffer contains 6 M urea, 2% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 7.5 and 50mM DTT. The second equilibration buffer has the same composition less the DTT, which is replaced by 150 mM iodoacetamide. Blue Bromophenol were added to mark the migration front.

Second dimension SDS PAGE

The equilibrated strips were loaded on the 12.5 % SDS gels (19.5X19.5X0.05cm) and submitted to SDS-PAGE. Electrophoresis was processed with the limit of 30 mA per gel and a voltage which was gradually increased to 350 V.

2DE staining

After migration, the gels were stained with a silver nitrate staining kit (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) when subsequent mass spectrometry on excised spots was performed. Silver nitrate staining protocol (Shevchenko, 1996) was used for the gels.

The gels are scanned with GS-800™ Calibrated Densitometer and PD Quest software (Biorad, France)

The spots of interest have been excised then the gels were dried into two cellophane membranes to be archived. Excised pieces of gel were unstained with the unstaining solution

of the staining kit (1 % potassium hexacyanoferrate III ($\text{C}_6\text{FeK}_3\text{N}_6, 3 \text{ H}_2\text{O}$), 1.6 % sodium thiosulfate from Sigma).

Mass Spectrometry

Sample preparation and mass spectrometry analysis

In situ digestion of the gel spots was performed with an automated protein digestion system, MassPREP Station (Waters, USA). The gel plugs were washed three times with a mixture of 50%/50% NH_4HCO_3 (25 mM)/ACN. The cysteine residues were reduced with dithiothreitol at 57 °C for 30 min and alkylated with iodoacetamide at room temperature for 20 min. After dehydration with acetonitrile, the proteins were digested in gel with 20 μL of 12.5 ng/ μL of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM NH_4HCO_3 overnight and at room temperature. Then a double extraction was performed, first with 60% acetonitrile in 5% formic acid and a second extraction with 100% acetonitrile. The resulting tryptic peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS. These analyses were performed on an HCT Ultra ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a 1100 HPLC system and a chip cube (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). After loading, the peptide mixture was first concentrated and washed at 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ in a 40nL enrichment column (Agilent Technologies chip), with 0.1% formic acid as the eluent. The chromatographic separation was then conducted on a C18 reverse-phase capillary column (75 μm x 43 mm in the chip cube) at a flow rate of 300nL/min.

Mass data acquisitions were piloted by the ChemStation (Agilent Technologies), EsquireControl (Bruker Daltonics) and DataAnalysis (Bruker Daltonics) software.

NanoLC-MS/MS

To confirm the results obtained from the MALDI-TOF analysis, nanoLC-NanoESI-MS/MS analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (LCQ Deca XP+, Thermo-electron, San Jose, California, USA) equipped with a nano-electrospray ion source coupled with a nano high pressure liquid chromatography system (LC Packings Dionex, Amsterdam, The Netherlands). Peptidic samples resuspended in 10 μL H_2O containing 0.1% HCOOH were injected into the mass spectrometer using the Famos auto-sampler (LC Packings Dionex, Amsterdam, The Netherlands). After desalting, samples were concentrated on a reserved-phase precolumn of 0.3 mm i.d. x 5 mm (Dionex) by solvent A ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ -95/5-0.1% HCOOH) delivered by the Switchos pumping device (LC Packings Dionex) at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 3 min. Peptides were separated on a 75 μm i.d. x 15 cm C18 Pepmap column (Dionex). The flow rate was set at 200 nL/min. Peptides were eluted using a 5% to 100%

linear gradient of solvent B in 45 min (H₂O/ACN-20/80-0.08% HCOOH) and then 100% of solvent B was maintained for 3 min.

Coated electrospray needles were obtained from New Objective (Woburn, Massachusetts, USA). The spray voltage at 1.5 kV and the capillary temperature was at 170°C. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode. Data acquisition was performed in a data-dependent mode consisting of, alternatively, a single run, a full-scan MS over the range *m/z* 500-2000, and a full-scan MS/MS of the ion selected in an exclusion dynamic mode (the most intense ion is selected and excluded for further selection for a duration of 3 min). MS/MS data were acquired using a 2 *m/z* units ion isolation window and a 35% relative collision energy. For the automated database search of fragment ion spectra, the Bioworks 3.1 software (ThermoFinnogon, San Jose, California, USA) was used and final database searching was performed using Mascot software.

Data interpretation and protein identification

In a first step, the complete .mgf files were submitted to protein database searches via a local Mascot™ (MatrixScience, London, UK) server. Searches were done with a mass tolerance of 50ppm in MS mode and 0.25 Da in MS/MS mode. One missed cleavage per peptide was allowed and variable modifications were taken into account such as carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine. Searches were performed without constraining protein molecular mass or isoelectric point and without any taxonomic restriction. In the case of unsuccessful protein identification in the protein databases with Mascot™, the generated MS/MS spectra were individually interpreted in order to deduce a partial or complete amino acid sequence. These interpretations were performed using specialized de novo sequencing software: the RapidDeNovo program (Biotools, 3.0, Bruker Daltonics) and the PEAKS Studio program (Bioinformatics Solutions, Canada).

The deduced amino acid sequence fragments were submitted to the MS-BLAST program (Shevchenko, 1996) provided at the EMBL to perform cross-species protein identifications. In the contrary to common BLAST programs, optimized for long and accurate protein sequences, this program has been manipulated to be adapted to data produced by mass spectrometry analysis. Indeed, the direct submission of the numerous redundant putative sequence candidates deduced from nanoLC-MS/MS analysis is possible with this MS-BLAST program. We used the MSBLAST specifically modified PAM30MS scoring matrix, no filter was set and the nrdb95 database was used for the searches.

The statistical evaluation of the results and the validation of the matches were performed according to (Shevchenko, 1996).

Fillet freshness or spoilage stage evaluation

Three indicators are studied: biogenic amines (Duflos, Dervin, Malle, & Bouquelet, 1999) according to the European regulation (N°1441/2007), TVBN (Total Volatile Basic Nitrogen) (Castro, Penedo Padron, Caballero Cansino, Sanjuan Velazquez, & Millan De Larriva, 2006; Malle & Poumeyrol, 1989) and the total micro flora at 30°C (ISO 4833 PCA method). The samples were in triplicate at different time durations after the death of the fish: Day 0, 1, 3, 6, 9, 13, 15.

The HPLC method was used for biogenic amines determination in fresh fillets.

5g of flesh were weight and were ground with ultraturax in 10ml of 0.2M Perchloric acid and 100µl 1.3 diaminopropane at 0.8mg/ml. The homogenised mix was centrifuged at 7000g 4°C 5 minutes. In a safe locked tube 100µl of the supernatant were added to 300µl of saturated sodium carbonate solution and 400µl of dansyl chloride at 7,5mg/ml. Vortexed then incubated 5 minutes at 60°C in the dark the solution was cooled under fresh water. 100µl of a 100ng/ml proline solution was added, after vortexing the tube was kept 15 minutes in the dark. At the end of the time 500µl of toluene were added, after vortexing the mix was kept at -20°C during 30 minutes. The organic phase was put through and the rest was evaporated with azote gas flux. 200 µl acetonitrile were added to the pellet

The separation was performed using a C18 Kromasil column (5 µm, 100A, 25cmX4.6mm) at 254 nm. The reversed phase column was eluted with a acetonitrile gradient. The absorbance is read at 254 nm, the UV spectra permit to determine area of each picks corresponding to a biogenic amine. The quantity of biogenic amine is calculated by linear regression of the value of the area of the standards range (25, 50, 100, 250 ppm) previously measured.

The 30°C micro flora is enumerated by ISO 4833 PCA method. The result is expressed by the CFU/ g (Colony Forming Unit cell).

Results

Fresh fillet and frozen/thawed fillet 2D electrophoresis comparison

Comparison of 2D electrophoresis gel profiles of fresh fish fillet exudate vs thawed fish fillet exudate permits to distinguish two different protein patterns localized on the low molecular weight and low isoelectric point area at the bottom left part of the 2DE profiles. A 3 days aged fresh fillet frozen during less than 15 days lets appear 2 spots in the marked area while they aren't any spots in this same area in a fresh fillet 2DE profile (Figure 1).

Exudates 2DE profiles Kinetics

Fresh fillets exudates 2DE profiles Kinetics

Kinetics from day 0 (date of death) to day 15 were investigated on European sea bass fresh fillets and the results have been reproduced for three times. The fresh fillet exudate 2D electrophoresis shows that from day 0 to day 9, there is no spot in the proteins profiles located in the interest area. Only a faint spot appears the fifteenth day at the place of the spot 2 (Figure 2A). At this date, it is necessary to check the freshness or the spoilage step of the fillet.

Frozen/thawed fillets exudates 2DE profiles Kinetics

Contrary to the fresh profile, the thawed 2DE profiles show two spots 1 and 2 since the D0 (day 0). The intensity of the two spots increases gradually at day 3 and day 6. (Figure 3B).

Spoilage indicators kinetics fresh vs thawed fish fillets

Fresh fillets exudates 2DE profiles Kinetics showed potential spoilage at day 15, a freshness evaluation is made in parallel using normalized technics to distinguish a spoilt fillet to a thawed one. For this reason, TVBN, microflora and biogenic amines have been studied (Figure 3).

Fresh fillet analyses (figure 3A)

As described on figure A about fresh fillet, from the ninth day after the death of the fish, a significant evolution is observed for the biogenic amines histamine and cadaverine. Between the ninth day the thirteenth day, the histamine, the cadaverine and the putrescine highly increase to reach a very important rate at D13.

The same phenomenon is observed for the TVBN rate (data not shown) but as described by (Castro, et al., 2006), TVBN could not be a reliable method to evaluate freshness and biogenic amines rates along the fresh fillet storage permit to conclude that the spoilage are significant since the ninth day to reach an advanced spoilage stage the thirteen day.

The micro flora is at the origin of biogenic amines production and its enumeration constitutes a key indicator fish freshness. From the ninth day the rates of biogenic amines increase. The started to increase since the third day and turn over the acceptable limit the thirteenth day (data not shown). After the ninth day the spoilage of the fillet due to the micro flora proliferation is too important to considerate that the fillets are healthy.

Thawed fillets short storage analyses (Figure 3B)

The storage of fresh fillets during six days before the freezing doesn't permit to observe significant evolution of biogenic amines rates. Since nine days of fresh storage before the freezing an augmentation of the biogenic amines is observed to reach more important rate than only fresh storage. That confirms that the freezing and thawing facilitate the microflora to develop and spoil more over the fish. The frozen fillets keep a good quality up to the sixth day frozen or not.

Proteins Identification

Proteins in the area corresponding at pH between 3 and 4 and molecular weights comprised between 10 and 12 kDa have been priority characterized. The 2DE gels of thawed fish were reproduced (n=10) to collect a sufficient quantity of spots 1 and spots 2 (figure 2).

The Mass spectrometry (table 1) permits to identify the parvalbumin alpha, in each spot.

Proteins characterized in the spot 1 correspond to parvalbumin alpha and beta (*Cyprinus carpio*). Proteins characterized in the spot 2 correspond to parvalbumin beta (*Salvelinus alpinus*), parvalbumin 2 (*Kryptolebias marmoratus*) and parvalbumin alpha (*Cyprinus carpio*). Proteins molecular weight corresponds to 11,43 kDa (table 1), close to the theoretical value of parvalbumin molecular weight (Arif, 2009, 2010). (Terova, et al., 2013) have established the proteomic profiling of sea bass muscle by 2DE and have identified two parvalbumins in the same area of interest. Parvalbumins are small molecular weight proteins (10 to 12.5 kDa) and have an acidic isoelectric point (4.1 to 5.2) which is correlating with the place where the spots studied were found on the 2DE gels.

Discussion

In an effort to differentiate a sea bass fresh fillet from a frozen/thawed one, we are interested in the study of the exudate which is the supernatant from the centrifugation of the fillets. 2DE patterns from these exudates reveal areas of differentiation between fresh and thawed fish. The aim of our study is not to focus on the total proteome but only the protein composition of the exudates which contains soluble proteins and could be released after frozen/thawed treatment ((I. Martinez & Friis, 2004), (Terova, et al., 2013)). This approach allowed us to focus on a limited number of proteins in order to more easily characterize the possible costs differentiations between fresh and thawed fillets. We are particularly interested in an area of low molecular weight and acid pH because this area is one where differentiation was the most significant (figure 1). Repeated 2DE of thawed fish fillet exudates allowed us to

systematically observe two differentiating spots in comparison with fresh fish fillet 2DE profiles (figures 2A and 2B). These two spots do not appear on fresh fish fillet 2DE profiles before the 13th day after the death. To check the freshness or the spoilage step of the fillet, kinetic of freshness and spoilage markers as TVBN, biogenic amines and micro flora have been studied to be sure that the observed proteins do not correspond to proteins produced during post mortem storage as previously described in 2D studies (Terova, Addis, Preziosa, Pisanu, Pagnozzi, Biossa, et al., 2011; Verrez-Bagnis, 2001) (Terova, et al., 2013).

The freshness indicators show a spoilage for fresh fillets (figure 3A) and for thawed fillets (Figure 3B) from the day 9 while the 2DE analyses allow differentiating fresh versus thawed fish fillets until the day 13. The 2DE method shows its interest because it can be applied on the fish fillets until their limit of consumption.

The two spots of interest identified in the thawed fillets 2DE have been characterized by MS/MS (table 1) as parvalbumin α and β . The parvalbumins, sarcoplasmic proteins, have been found in the thawed fillet exudates due to the breakage of the membranes by the ice formation in the cell during freezing (Morel, 1979; Tironi Valeria, 2010). These proteins are well known as the main fish allergens (Swoboda, Bugajska-Schretter, Verdino, Keller, Sperr, Valent, et al., 2002), (Van Do, Hordvik, Endresen, & Elsayed, 2005). A very similar form of parvalbumin in numerous species could indicate that this protein can be ubiquitous (Chen, Hefle, Taylor, Swoboda, & Goodman, 2006).

Fish parvalbumins are already used as markers to detect fish derivate products in final food (Faeste & Plassen, 2008), to differentiate different commercial hakes (Carrera, García-López, Martín del Río, Martínez-Rodríguez, Solé, & Mancera, 2007) and to identify different fish species (Rehbein, Kundiger, Pineiro, & Perez-Martin, 2000).

Conclusion

The present study provides the 2DE comparative analyses of the exudates permits to differentiate frozen/thawed fillets versus fresh fillets of sea bass. The membranes breakage due to freezing permits to release proteins in the exudate. Two proteins have been identified specifically in frozen/thawed fillets versus fresh fillets of sea bass. The two spots have been identified by MS/MS analysis as parvalbumin α and β . The specificity of these two markers has been significantly substantiated by kinetic of freshness and spoilage markers. The parvalbumin could be proposed as a marker to differentiate fresh from frozen/thawed sea bass fillets and could be investigated in different species with important commercial values.

Acknowledgements

This work was granted by the Nord Pas de Calais council. The authors thank X, Valérie Lencel for their effective technical work. Sylvain Marlard is grateful to the Nord Pas de Calais council for the financial support of his PhD.

Bibliography

- Alimelli, A., Pennazza, G., Santonico, M., Paolesse, R., Filippini, D., D'Amico, A., Lundström, I., & Di Natale, C. (2007). Fish freshness detection by a computer screen photoassisted based gas sensor array. *Analytica Chimica Acta*, 582(2), 320-328.
- Arif, S. H. (2009). A Ca(2+)-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology. *Bioessays*, 31(4), 410-421.
- Arif, S. H. (2010). A major cross-reactive fish allergen with exceptional stability: Parvalbumin. 4(3), 109-114.
- Ayala, M. D., López Albors, O., Blanco, A., García Alcázar, A., Abellán, E., Ramírez Zarzosa, G., & Gil, F. (2005). Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture*, 250(1-2), 215-231.
- Baron, C. P., Kjaersgard, I. V., Jessen, F., & Jacobsen, C. (2007). Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Agric Food Chem*, 55(20), 8118-8125.
- Benjakul, S., & Bauer, F. (2001). Biochemical and physiochemical changes in catfish (*Silurus glanis*) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles. *Food Chemistry*, 72(2), 207-217.
- Berrini, A., Tepedino, V., Borromeo, V., & Secchi, C. (2006). Identification of freshwater fish commercially labelled “perch” by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Food Chemistry*, 96(1), 163-168.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Carrera, E. P., García-López, A., Martín del Río, M. d. P., Martínez-Rodríguez, G., Solé, M., & Mancera, J. M. (2007). Effects of 17[beta]-estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(2), 210-217.
- Castro, P., Penedo Padron, J. C., Caballero Cansino, M. J., Sanjuan Velazquez, E., & Millan De Larriva, R. (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control*, 17(4), 245-248.

- Chen, L., Hefle, S. L., Taylor, S. L., Swoboda, I., & Goodman, R. E. (2006). Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG. *J Agric Food Chem*, 54(15), 5577-5582.
- Duflos, G., Dervin, C., Malle, P., & Bouquelet, S. (1999). Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *J AOAC Int*, 82(6), 1357-1363.
- Duflos, G., Lefur, 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, 1341-1345.
- Duun, A. S., & Rustad, T. (2007). Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. *Food Chemistry*, 105(3), 1067-1075.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Costa, H., & Martinez, I. (2001). Species identification of formed fishery products and high pressure-treated fish by electrophoresis: a collaborative study. *Food Chemistry*, 72(1), 105-112.
- Faeste, C. K., & Plassen, C. (2008). Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *J Immunol Methods*, 329(1-2), 45-55.
- Fernandez, M., Mano, S., Garcia de Fernando, G. D., Ordonez, J. et Hoz, L. (1999). Use of b-hydroxyacyl-coA-deshydrogenase (HADH) activity to differentiate frozen from unfrozen fish. *European Food Research*(209), 205-209.
- Gil, L., Barat, J. M., Garcia-Breijo, E., Ibanez, J., Martinez-Manez, R., Soto, J., Llobet, E., Brezmes, J., Aristoy, M.-C., & Toldra, F. (2008). Fish freshness analysis using metallic potentiometric electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 131(2), 362-370.
- 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), 349-355.
- Kjaersgard, I. V. H., Norrelykke, M. R., & Jessen, F. (2006). Changes in cod muscle proteins during frozen storage revealed by proteome analysis and multivariate data analysis. *PROTEOMICS*, 6(5), 1606-1618.
- Malle, P., & Poumeyrol, M. (1989). A new criterion for the quality control of fish, trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *Journal of food protection*, 52(6), 419-423.
- Martinez, I., & Friis, T. J. (2004). Application of proteome analysis to seafood authentication. *Proteomics*, 4, 347-354.

- Martinez, I., Slizyte, R., & Dauksas, E. (2007). High resolution two-dimensional electrophoresis as a tool to differentiate wild from farmed cod (*Gadus morhua*) and to assess the protein composition of klipfish. *Food Chemistry*
- EFFoST 2005 Annual Meeting: Innovations in traditional foods, 102(2), 504-510.
- Matsumoto, J. (1979). Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. In A. i. c. series (Ed.), *Proteins at low temperatures* O. Fennema ed., vol. No. 180). Washington, D.C.
- Mazur, P. (2010). A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. *Cryobiology*, 60(1), 4-10.
- Morel, M. (1979). Une méthode pour déterminer si le poisson est à l'état frais ou décongelé. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, n°288, 13-17.
- Pegg, D. E. (2010). The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*, 60(3 Suppl), S36-44.
- Rehbein, H., Kundiger, R., Pineiro, C., & Perez-Martin, R. I. (2000). Fish muscle parvalbumins as marker proteins for native and urea isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 21(8), 1458-1463.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. et Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*(68).
- Swoboda, I., Bugajska-Schretter, A., Verdino, P., Keller, W., Sperr, W. R., Valent, P., Valenta, R., & Spitzauer, S. (2002). Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J Immunol*, 168(9), 4576-4584.
- Tchir, J., & Acker, J. P. (2010). Mitochondria and membrane cryoinjury in micropatterned cells: effects of cell-cell interactions. *Cryobiology*, 61(1), 100-107.
- Terova, G., Addis, M. F., Preziosa, E., Pisanu, S., Pagnozzi, D., Biossa, G., Gornati, R., Bernardini, G., Roggio, T., & Saroglia, M. (2011). Effects of postmortem storage temperature on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle protein degradation: analysis by 2-D DIGE and MS. *Proteomics*, 11(14), 2901-2910.
- Terova, G., Pisanu, S., Roggio, T., Preziosa, E., Saroglia, M., & Addis, M. F. (2013). Proteomic profiling of sea bass muscle by two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Fish Physiol Biochem*, 21, 21.
- Tironi, V., LeBail, A., & de Lamballerie, M. (2007). Effects of Pressure-Shift Freezing and Pressure-Assisted Thawing on Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Quality. *Journal of Food Science*, 72(7), C381-C387.

Tironi Valeria, d. L. M., Le-Bail Alain. (2010). Quality changes during the frozen storage of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle after pressure shift freezing and pressure assisted thawing.

Van Do, T., Hordvik, I., Endresen, C., & Elsayed, S. (2005). Characterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollack, and comparison with codfish Allergen M. *Molecular Immunology*, 42, 345-353.

Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., M., M., J., N. et J., F. (2001). Protein changes in post mortem sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle monitored by one- and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*(22), 1539-1544.

Zhu, S., Ramaswamy, H. S., & Simpson, B. K. (2004). Effect of high-pressure versus conventional thawing on color, drip loss and texture of Atlantic salmon frozen by different methods. *LWT - Food Science and Technology*, 37(3), 291-299.

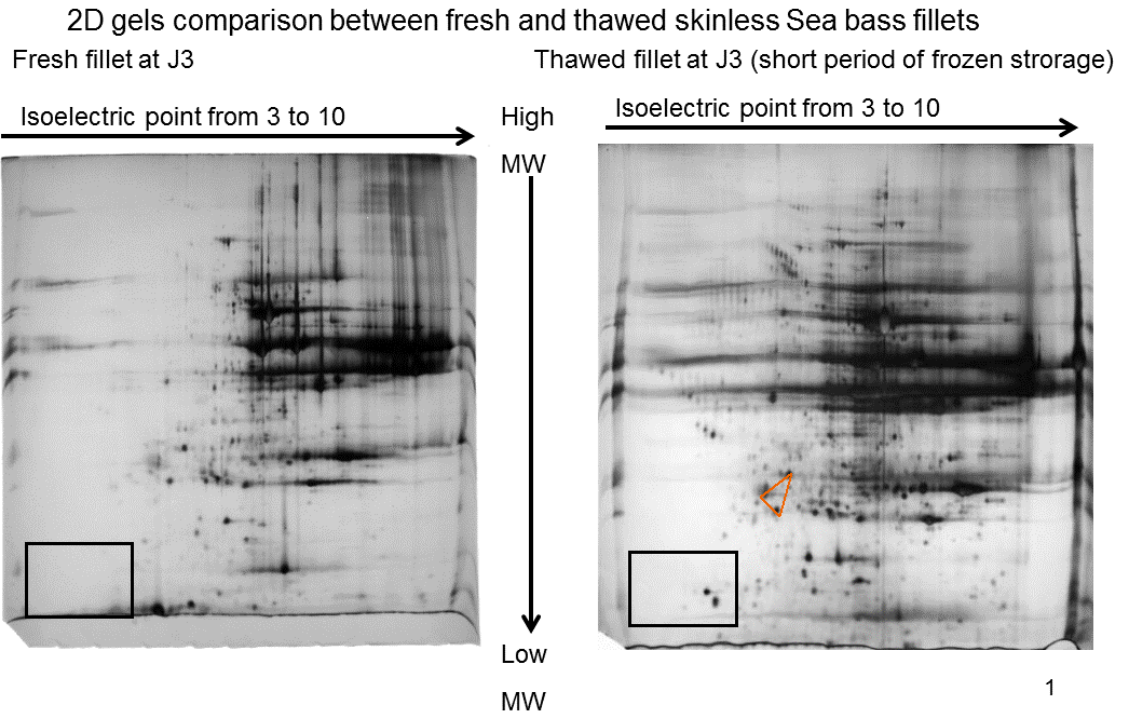


Figure 1: Comparison of 2D electrophoresis gel profiles of fresh fish fillet exudate to thawed fish fillet exudate. 12.5% polyacrylamide gels, sea bass exudates silver staining. The triangle is a mark and the rectangle frame focuses on the zone of interest where are the both spots (1 and 2). MW Molecular Weight

2 DE electrophoresis kinetics on Sea Bass fresh fillets

Lot of sea bass fillets stored on ice (fresh) during 0, 3, 6, 9 13 or 15 days before analysis

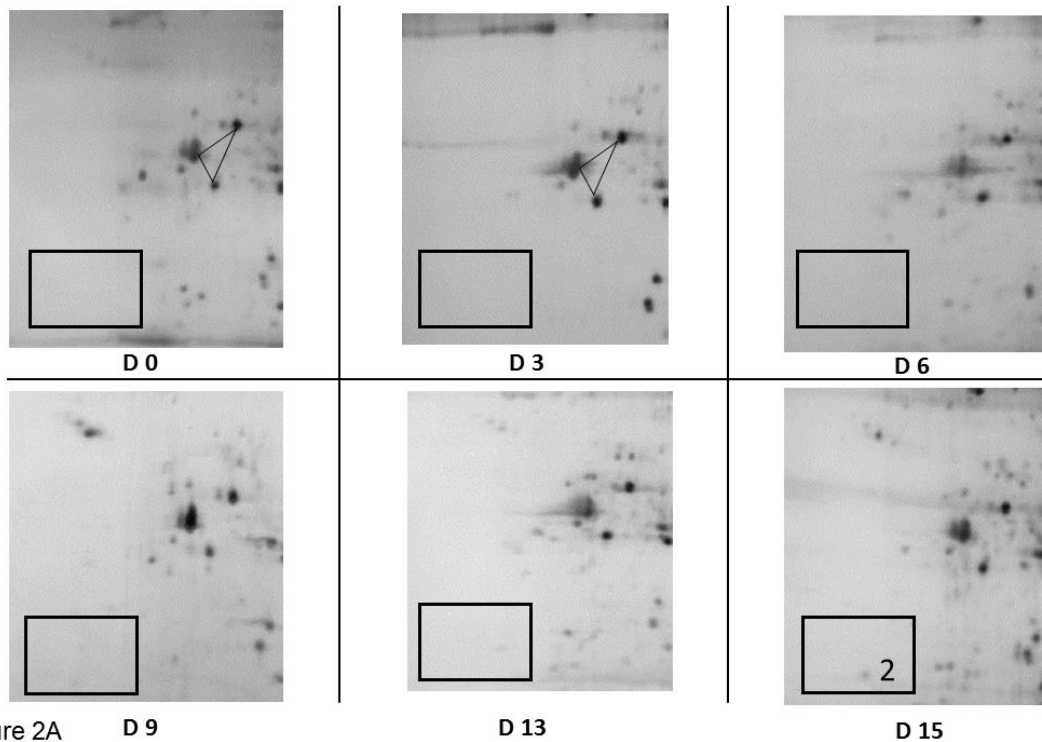


Figure 2A D 9

D 13

D 15

2 DE electrophoresis Kinetics on Sea Bass frozen/thawed fillets

Lot of sea bass fillets stored on ice (fresh) during 0, 3 or 6 days, frozen during less than 15 days and stored on ice 72 h before analysis

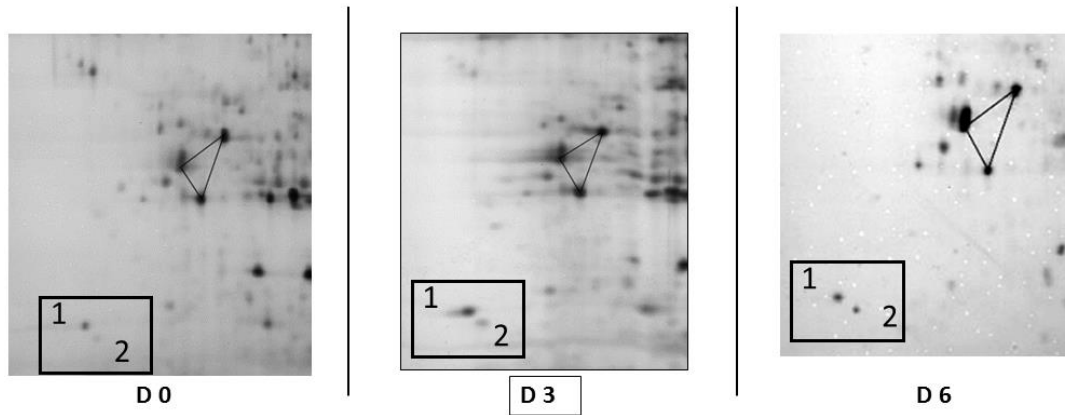


Figure 2 B

Figure 2 : 2 DE electrophoresis Kinetics on Sea Bass frozen/thawed fillets

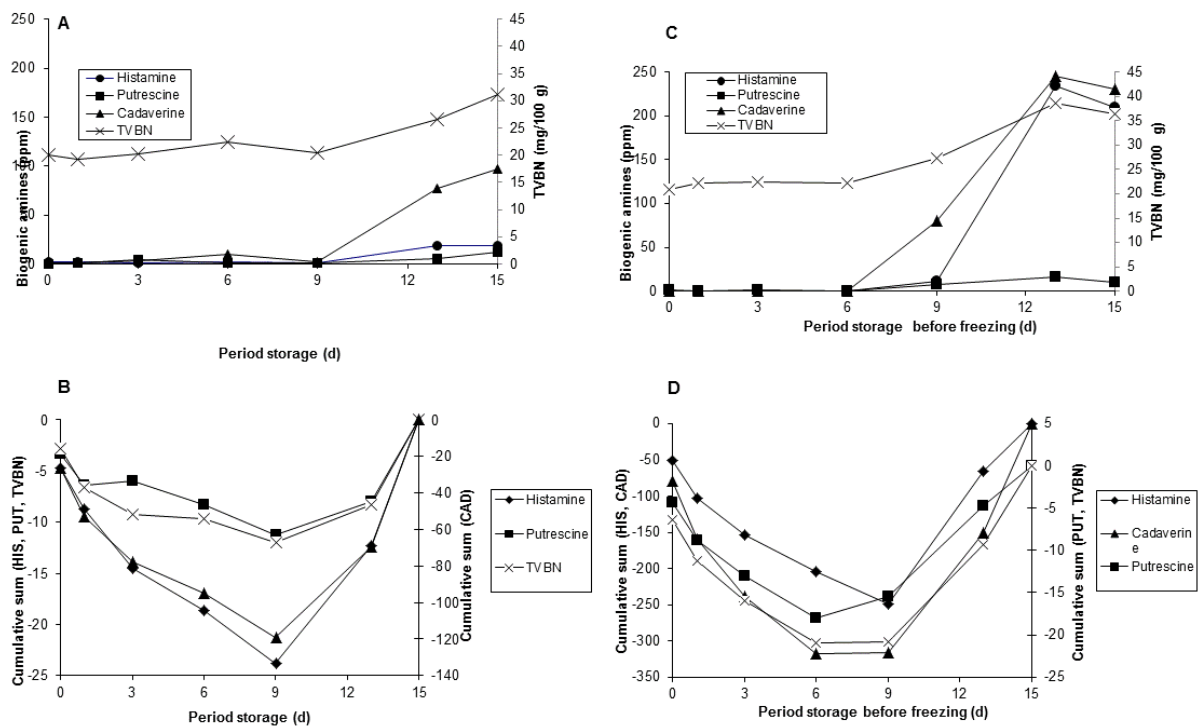


Figure 3 : Biogenic amines kinetic evolution fresh vs thawed fillets

Annexes

Table 1 : identification of sea bass protein spots by means of MS/MS and cross species matching with sequences in the data bases

Spot	MS/MS sample name	Mascot/ de novo	Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage sequence coverage	Peptide sequence
Spot 1	E045011 (F086901)	Mascot	Parvalbumin alpha OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227.sp Q9I8V0	11,433.4	2	19.3%	LFLQNFSAGAR-SGFIEEDELK
Spot 1	E045012 (F086903)	Mascot	Parvalbumin alpha OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227.sp Q9I8V0	11,433.4	2	19.3%	SGFIEEDELK - LFLQNFSAGAR
Spot 1	E045013 (F086905)	Mascot	Parvalbumin alpha OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227.sp Q9I8V0	11,433.4	2	19.3%	LFLQNFSAGAR - SGFIEEDELK
Spot 1	E045016 (F086899)	Mascot	Parvalbumin beta OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=1	p P02618	11,429	2	17%	AFAIDQDK - SGFIEEDELK
Spot 2	E045014 (F086907)	de novo	Parvalbumin beta 542 (Salvelinus alpinus)	Q8AYB4		2		GDGFLGADEFAALVK-LEEDELK
Spot 2	E045015 (F086909)	de novo	Parvalbumin 2 (Kryptolebias marmoratus)	Q6B4H7		1		SEANNTAALAACKAADSFK
Spot 2	E045014 (F086907)	Mascot	Parvalbumin alpha OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227.sp Q9I8V0	11,433.4	2	19.3%	SGFIEEDELK - LFLQNFSAGAR
Spot 2	E045015 (F086909)	Mascot	Parvalbumin alpha OS=Cyprinus carpio PE=1 SV=2	sp P09227.sp Q9I8V0	11,433.4	2	19.3%	SGFIEEDELK - LFLQNFSAGAR

Protein Thresholds: 1 peptide : Mascot Ion Score - Mascot Identity > +10, at least 2 peptides : Mascot Ion Score - Mascot Identity > -10

Samples: All Samples

Fragment Tolerance: 0.50 Da (Monoisotopic)

Parent Tolerance: 250 PPM

(Monoisotopic)

Fixed Modifications:

Variable Modifications: +16 on M (Oxidation), +57 on C (Carbamidomethyl)

Database: the SwissProt_Decoy_CC_28012010 database (unknown version, 1028424 entries)

Digestion Enzyme: Trypsin

Max Missed Cleavages: 1

Scaffold Version:

Scaffold_2_02_00_pre36

COMMUNICATIONS

ECRITES ET ORALES

1. Poster des doctoriales franco-belges de mai 2011

Différenciation des filets de poisson frais / décongelé



Sylvain MARLARD Unité Mixte Technologique
Fraîcheur et qualité des produits aquatiques.
Thèse cofinancée par l'ULCO et la région Nord Pas de Calais



Contexte économique et intérêts:

La pêche européenne est en diminution. Les causes sont la politique européenne et la diminution des ressources. La consommation et l'importation augmentent. Les produits frais sont mieux valorisés que les produits congelés. Leur valeur marchande est plus importante. Le marché des produits aquatiques s'internationalise. Les acteurs régionaux de la filière s'inquiètent de certaines pratiques et soupçonnent des importateurs de vendre des filets de poisson décongelés pour des produits frais.

Consommation française des produits de la mer

Source : FranceAgriMer, 2009



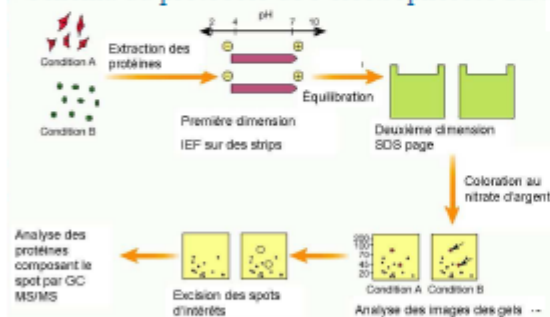
Objectif : Créer un test fiable et rapide (6-8h) pour différencier un filet de poisson frais d'un filet décongelé. Ce test sera un outil de lutte contre la fraude pour la filière.

Méthode : Les partenaires dans l'UMT travaillent sur l'exsudat de chair de poisson. Chaque entité utilise une méthode d'analyse différente. Nos résultats seront comparés et discutés. Le centre technique HALIOMER sert de relais entre les professionnels et les scientifiques. L'ANSES travaille sur les composés volatils et Haliomer dose l'activité enzymatique.

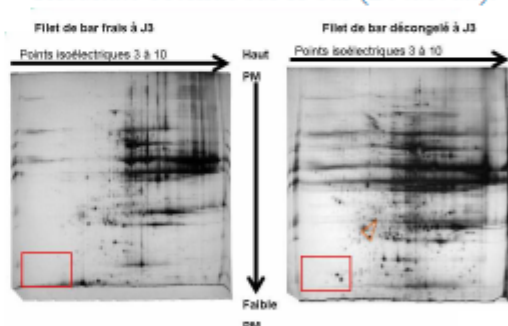


A l'ULCO, nous analysons la composition des protéines par électrophorèse bidimensionnelle comparative pour identifier différentes protéines dans l'exsudat des filets. Le bar (*Dicentrarchus labrax*) d'élevage a été choisi comme modèle.

Schéma du protocole de l'électrophorèse 2D:



Résultats obtenus sur le bar (*D. labrax*):



Résultats : Plusieurs protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse en collaboration avec le laboratoire LSMBO de Strasbourg. La technique de l'électrophorèse 2D prend beaucoup de temps (4-5 jours). Les professionnels ont besoin d'une réponse en moins de 8 h., il faut travailler sur des techniques plus rapides.

Compétences : Autonomie, Persévérance, Techniques d'électrophorèse et d'immuno-détection, gestion de projet et de budget, Découverte de la recherche publique et de son organisation.

Perspectives : Le développement de méthodes d'analyses immunologiques : ELISA indirect ou en compétition et le Western Blotting sur des gels 1D ou 2D permet de réduire le temps d'analyse. Il faut également tester cette technique sur d'autres espèces à haut intérêt commercial.



Union européenne - Fonds Européen de Développement Régional
Europese Unie - Europees Fonds voor Regionale Ontwikkeling



Interreg offre les financements
Interreg des programmes européens



2. Séminaire « Poisson frais poisson décongelé » du 27 novembre 2012



JOURNÉE
D'INFORMATION



**POISSON FRAIS
POISSON DÉCONGELÉ**

OUTILS ET MÉTHODES POUR ÉVALUER ET PRÉSERVER SA QUALITÉ

A la communauté d'Agglomération du Boulonnais - 1 bd Bassin Napoléon 62200 Boulogne-sur-mer

27 NOVEMBRE 2012

de 10h
à 17h

- Quelles nouveautés et perspectives dans les méthodes d'évaluation de la fraîcheur ?
- Quels traitements permettent de mieux préserver la fraîcheur du poisson ?
- Peut-on vérifier qu'un poisson n'a pas été congelé ?
- Peut-on détecter une double congélation ?

organisé en collaboration avec   

Au cours de cette journée seront présentés les résultats de plusieurs projets de recherche labellisés par le Pôle AQUIMER et financés par :



PROGRAMME

10h00	Accueil	AQUIMER
10h15	Introduction	- Contexte économique, aspects réglementaires, et quelques attentes de la profession : Bruno Le Fur, Plate-forme d'Innovation Nouvelles Vagues - Témoignage sur les attentes des entreprises du secteur : Aymeric Chrzan, Syndicat général des Mareyeurs / Syndicat National des Saeurs-Saurisseurs de Poissons
11h00	Évaluation de la fraîcheur	- Mécanismes d'altération et critères d'évaluation : Guillaume Duflos, Anses - Dosage des composés volatils : Guillaume Duflos, Anses - Mesure de la valeur K : Larissa Balakireva, NovoCIB - Nez électronique : Alain Gaudon, Alpha MOS
12h30	Cocktail déjeunatoire	
13h45	Préservation de la fraîcheur	- Atmosphère modifiée : Marc Van Niekerk, Air Liquide - Glace liquide : Linda Delplace, Plate-forme d'Innovation Nouvelles Vagues - Moïse Durandau, Geneglace - Superchilling : Ludovic Daniel et Bergur Gudmunsson, Marel - Biopréservation : Françoise Leroi, Ifremer
15h10	Poisson décongelé ou double congelé	- Comparaison des technologies de décongélation : Jean-Charles Briand, Plate-forme d'Innovation Nouvelles Vagues - Détection par électrophorèse : Sylvain Marlard, Université du Littoral Côte d'Opale - Détection par fluorescence : Romdhane Karoui, Université d'Artois - Application du test de la comète : Dalal Werner, Aérial - Applications des méthodes de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : Magali Martin-Biran, Cereva
17h00	Clôture	



Diapositives de la présentation orale effectuée au cours du séminaire « Poisson frais poisson décongelé » organisé par le pôle Aquimer le 27 novembre 2012

ulco UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

« Différenciation filet sans peau de poisson frais / décongelé »
Utilisation de l'électrophorèse 2D

Journée d'information poisson frais poisson décongelé



Hydrobio.marchand@univ-littoral.fr
 Le 27 novembre 2012 www.univ-littoral.fr

ulco UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Équipe Agroalimentaire et Produits Aquatiques

5 MCF : Pierrette ETHUIN, Denis WATER, Philippe LENCEL, Pétine DOYEN et Thierry GRARD
 1 Ingénieur d'Études : Irina SADOVSKAYA
 1 ATER : Sylvain MARLARD

ulco UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

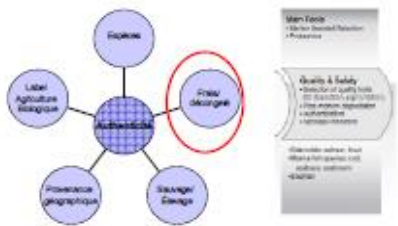
Quai Marcel, Route de Boulogne BP 120
 63007 Boulogne-sur-Mer
 Téléphone: 03 21 58 43 20 Fax: 03 21 58 43 34



2

ulco UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Doutes sur l'authenticité des filets de poisson



(Boulogne 2012)

3

ulco UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Matériel

Conditions industrielles
 PRNV
 nouvelles vagues



Bar d'élevage
 Dicentrarchus labrax d'AQUANORD, Gravelines
 Préparation des filets de bar sans peau au CFPMT, Boulogne sur mer

3 lots de filets pour chaque date de la cinétique : frais, congelé court et congelé long
 Le premier lot de filets frais: étude cinétique J0, J3, J6, J9, J13 et J15

CFPMT

4

ulco UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Matériels et méthodes

Filets de poisson frais d'âge variable mis sous glace (0 à +4°C)
 0, 1, 3, 6, 9, 13 et 15 jours

CONGÉLATION à -80°C
 pour chaque âge

Contrôle de conservation court
 < 48 jours (20°C)

Contrôle de conservation long
 > 48 jours (20°C)

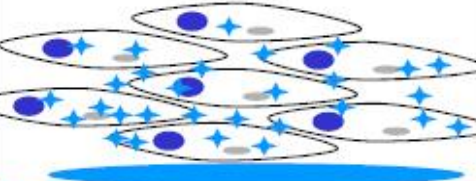
Analyse électrophorèse 2D
 Gel en double pour chaque condition testée

5

ulco UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

La congélation/décongelation entraîne une lyse

Congélation : formation de cristaux de glace intra et extra cellulaire
 Décongelation : fonte de la glace lyse, rupture des membranes cellulaires



6

ulco UNIVERSITÉ CÔTIERE D'OPALE
La congélation/décongélation entraîne une lyse

Congélation : formation de cristaux de glace intra et extra cellulaire
Décongélation : fonte de la glace lyse, rupture des membranes cellulaires
Libération du contenu cellulaire et sub-cellulaire (Avel 1979, Dufre 2002)

7

ulco UNIVERSITÉ CÔTIERE D'OPALE
Préparation de l'exsudat

Découpe de la partie dorso-médiane du filet

Ultra centrifugation
34 000 g, 30 minutes à 4 °C

Protocoles de préparation de jus de presse de chair (Avel 1979, Dufre 2002)

Prélèvement de 20g de chair blanche de poisson

8

ulco UNIVERSITÉ CÔTIERE D'OPALE
L'électrophorèse 2D comparative

Extraction des protéines

Equilibration

Première dimension IEF sur des strips

Deuxième dimension SDS page

Couleur au nitrate d'argent

Analyse des protéines comparant le spot par GC-MS/MS

Exclusion des spots d'intérêt

Analyse des images des gels

9

ulco UNIVERSITÉ CÔTIERE D'OPALE
Résultats sur le bar (*Dicentrarchus labrax*)

Comparaison de gels de filets de bar frais avec des filets congelés/décongelés :

- absence de spots à l'état frais (J1)

- présence de spots après décongélation (J) congelé 10 jours analyse après 72h

10

ulco UNIVERSITÉ CÔTIERE D'OPALE
Résultats sur le bar (*Dicentrarchus labrax*)

Cinétique réalisée sur des filets de bar congelés/décongelés

Lot de filets de bar conservés sous glace (frais) pendant :

0 jour 3 jours 6 jours

Durée de congélation < à 15 j

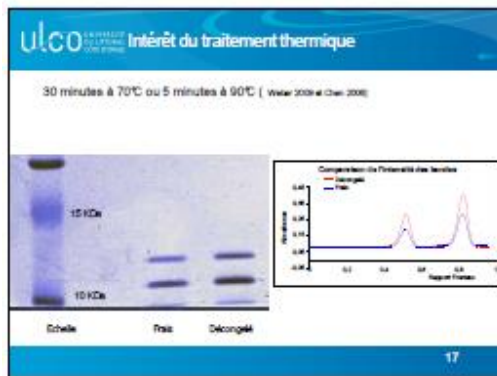
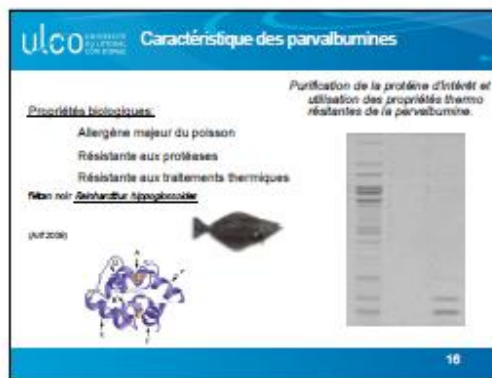
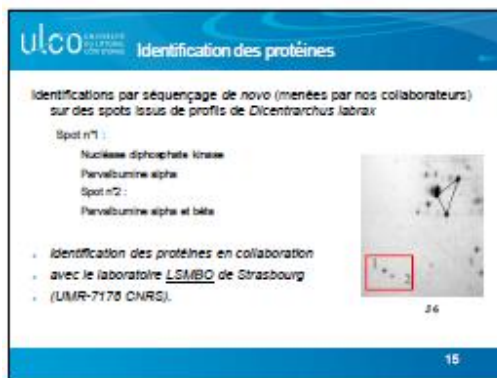
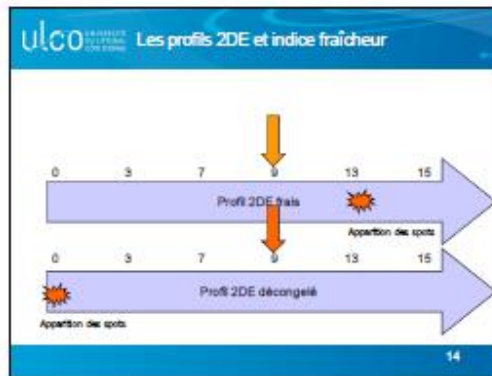
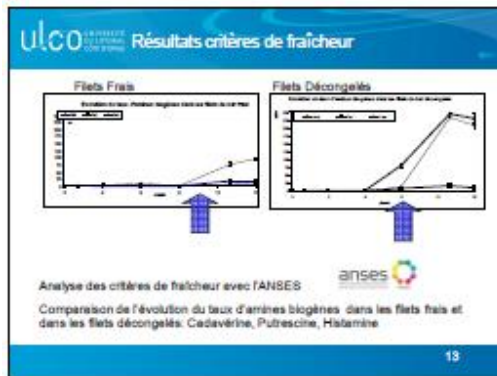
Conservation sous glace 72h avant analyse

11

ulco UNIVERSITÉ CÔTIERE D'OPALE
Évolution des profils des gels pour des filets frais

F R A I S

12



ulco UNIVERSITÉ CÔTIERE Océanographique

Projet émergeant : Nécroploose = mesure de la fraîcheur par des indicateurs de mort cellulaire

Dégénérescences aléatoires

Dégénérescences programmées

→ Les marqueurs apoptotiques peuvent-ils être des marqueurs de fraîcheur?

19

ulco UNIVERSITÉ CÔTIERE Océanographique

Transposer un certain nombre d'outils aux produits aquatiques

→ Nombreuses techniques qui correspondent chacune à différentes étapes de la mort cellulaire

Indicateur de mort cellulaire

Temps

Objectifs : Étudier la signalisation apoptotique afin de mettre au point des marqueurs biochimiques de détection des BSA faibles et développer des techniques de détection des BSA d'importance.

20

ulco UNIVERSITÉ CÔTIERE Océanographique

Merci de votre attention

aquimer

21

3. Participation au WEFTA 2013, du 9 au 11 octobre



WEFTA 2013

Seafood innovations throughout the value chain



Book of Abstracts



WEFTA 2013

43rd WEFTA Meeting, 9-11 October 2013, Tromsø, Norway



A Multi Variable and Complementary Exudate Analysis to Differentiate Fresh to Frozen/Thawed Skinless European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets

Presenting author: Sylvain Marlard (1)

Co-authors: Guillaume Duflos (2), Bruno Le Fur (3), Dorothée Vincent (4), Pierrette Ethin(5) and Thierry Grard (5)

1 Equipe APA ULCO Boulogne sur mer, France

2 ANSES Boulogne sur mer, France

3 PFINV Boulogne sur mer, France

4 MREN ULCO Boulogne sur mer, France

5 Equipe APA ULCO Boulogne sur mer, France

Corresponding author's e-mail: sylvain.marlard@univ-littoral.fr

Abstract

Frozen storage is an important preservation method for fish that allows producers to sell it all around the world but freezing/thawing causes a loss of quality and value. Lots of French seafood importers suspect fraudulent practices consisting in selling thawed fish fillets instead of fresh ones. Currently, the methods to differentiate fresh to frozen/thawed skinless fillet are insufficient. One of these is the lysosomal alpha-glucosidase activity measurement on non fat fish fillets exudate.

Further analysis of exudates composition could be a good way to find new indicators. Composition changes due to cell and molecular damages occur during freezing and thawing process. In our study, we evaluated changes in exudate composition in order to target molecular marker of this process impact. This study focus on the seabass (*Dicentrarchus labrax*) under two conditions: the fresh fillet 3 days aged and the thawed fillet from 40 days frozen stored fillet. First, a comparative two dimensional electrophoresis was used to find a protein marker. Then the protein found was assayed simultaneous to others chemical variables (free calcium, nucleotides and derivatives) and compared to alpha-glucosidase activity measures.

The comparison of electrophoresis profiles permits to identify the parvalbumins as markers of thawed fillets. These sarcoplasmic proteins were assayed simultaneously with the others variables on exudates. All the variables were statistically significant and permitted to differentiate fresh to thawed fillets. An ascending hierarchical clustering was done to make 3 groups of indicators: the molecular damages indicators, the cellular damages indicators and the DNA-damage indicators.

A reliable identification of thawed fillet could be carried out by a simultaneous analysis of three indicators coming respectively from each group. The exudate composition analyses are quick; do not require specific material and any particular skills. This multi variable and complementary analysis corresponds to the needs of seafood importers.



WEDNESDAY 9.	THURSDAY 10.	FRIDAY 11.
Time	Time	Time
09.00-09.15 Opening	09.00-10.40 Session 3	09.00-10.40 Session 4
09.15-09.45 J. Borderias Lecture	Keynote R. Olsen	Keynote SALMA
09.45-10.55 Session 1	Javier Borderias	Morten Heide
Keynote K. Midling	Tolga Dincer	Raquel Llorente
Ulf Erikson	Santiago P. Aubourg	T. Altintzoglou
Lillian D. Kaale	Ann Helen Hellevik	Björg Nøstvold
10.55-11.25 Coffee break	10.40-11.00 Poster presentation	10.40-11.10 Coffee break
11.25-12.10 Session 1 cont.	11.00-11.45 Coffee and posters	11.10-12.10 Session 5
Bianca M. Poli	11.45-12.45 Session 3 cont.	Raquel Llorente
Susanna Araksinen	Maria L. Nunes	K. Sveinsdóttir
Marit Bjørnevik	Nida Demirtas	R. Mozuraityte
12.10-13.10 Lunch	Rasa Slizyte	Ali Osman
13.10-14.25 Session 1 cont.	Mona E. Pedersen	12.10-13.10 Lunch
Bent Dreyer	12.45-13.45 Lunch	13.10-14.25 Session 5 cont
Hanne Digre	13.45-15.15 Session 2 cont.	Rasa Slizyte
Bendik Toldnes	Ingrid Underland	Ingrid Kvalvik
Stein Harris Olsen	Vera Kristinova	Anaïs Penven
Ida G. Aursand	Kirsti Greiff	Torbjørn Trondsen
14.25-14.45 Poster presentation	Ledicia Taboada	G. Vaelmynck
14.45-15.30 Coffee and posters	Sylvain Marlard	14.25-15.00 Closing ceremony
15.30-16.30 Session 2	Ines Lehmann	
Jasper van Houcke	15.15-15.45 Coffee	
Amparo Gonçalves	15.45-17.00 Session 2 cont.	
Grete Lorentzen	Karsten Heia	
Anlaug Å. Hansen	Svein K. Stormo	
16.30-16.45 Short break	Torstein Skåra	
16.45-17.45 Session 2 cont.	Mercedes Careche	
Kunihiko Konno	I. Sánchez-Alonso	
Ute Schroeder	17.00 End of day 2	
Maria L. Nunes	19.00 Conf dinner	
Horst Karl		
17.45 End day 1		
		Modern fish&aqua
		Quality measures
		Improved utilizat.
		Success stories
		Value adding

Diapositives de la communication orale au cours du WEFTA, le 10 octobre 2013 à Tromsø (Norvège)

A multi variable and complementary exudate analysis to differentiate Fresh to Frozen/ Thawed skinless European seabass *Dicentrarchus labrax*

Sylvain MARLARD, APA team, ULCO
sylvain.marlard@univ-littoral.fr

ULCO UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

WEFTA

WEFTA meeting 2013
The 20th of October 2013
Tromsø Norway

Our laboratory: APA team

ULCO UNIVERSITÉ DU LITTORAL CÔTE D'OPALE

Introduction

- CONTEXT:** A lot of seafood is imported at Boulogne sur Mer. Authentication problem.
- OBJECTIVE:** Find a new method to differentiate fresh versus frozen/thawed fish fillet: rapid, costless and efficient.
- STRATEGY:** (2steps)
 - Identification of a potential protein marker of a freezing/thawing process: by 2D electrophoresis and mass spectrometry
 - Evaluation of this marker and comparison with other indicators

First step

Exudate preparation

- Farmed sea bass
- Fresh or frozen fillets preparation in industrial conditions
- Exudate= Pressured flesh juice from the white flesh in dorso-medial part of the fish obtained by centrifugation

Comparative 2D electrophoresis

Fresh fillet at 03 | Thawed fillet (short period of frozen storage)

09 | 13 | 15

Low MW

Protein identification: parvalbumins

Spot n°1: Parvalbumin alpha
Spot n°2: Parvalbumin alpha and beta

Sarcoplasmic protein
Molecular weight 10- 12,5 KDa
Isoelectric point acid
Calcium binding proteins
Major fish allergen (Jensen, 2000)
Resist to heating (Jensen, 2000)
Resist to proteolytic enzyme (Jensen, 2000)

Representation of a isolated Cap (parvalbumin, (Jensen, 2000))

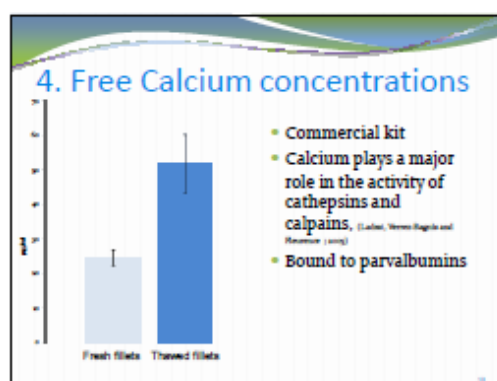
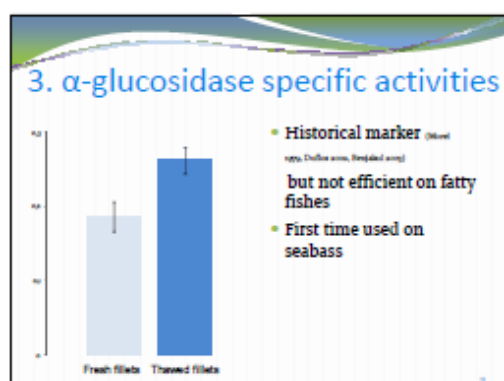
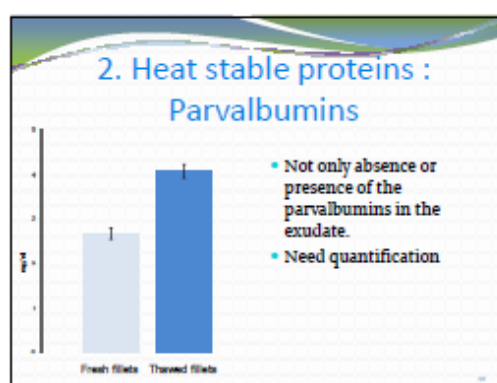
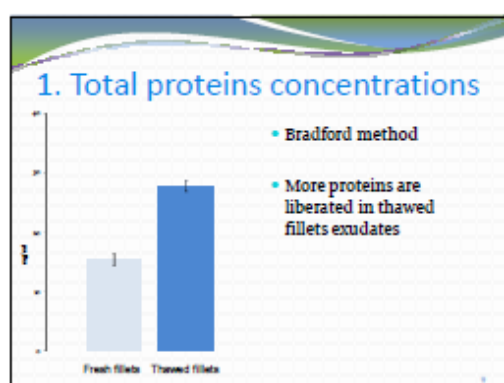
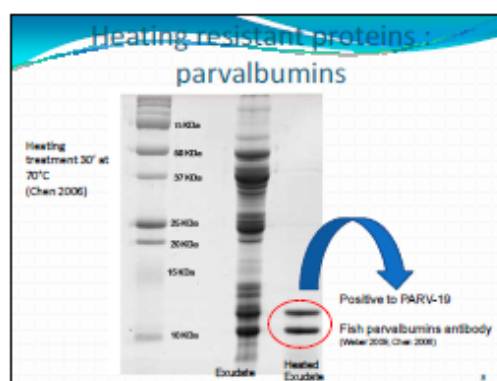
Second step

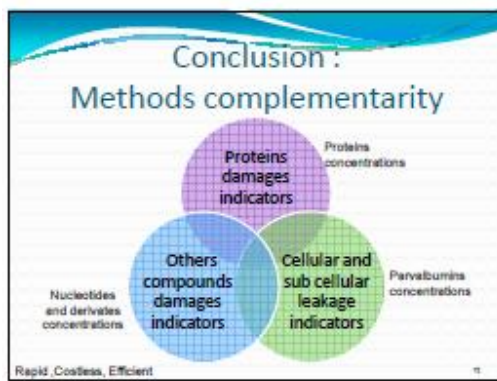
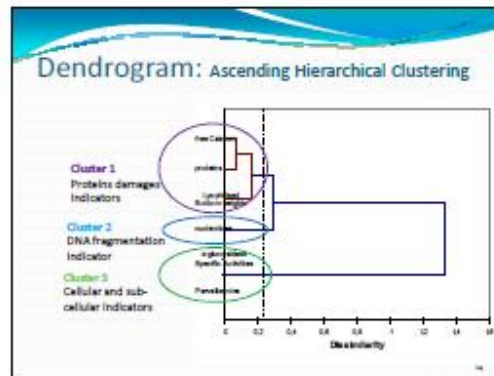
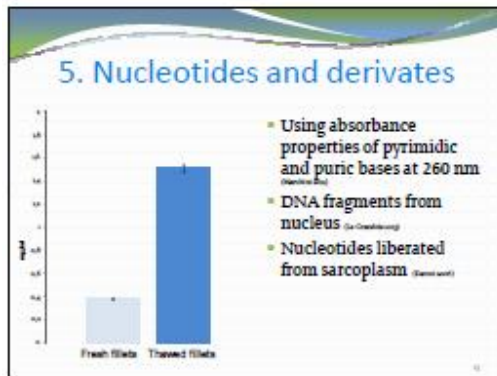
2 conditions tested:

- Fresh fillets 3 days after the slaughtering (n=12)
- Thawed after 40 days of frozen storage (n=12)

5 indicators:

1. Total proteins concentrations
2. Heat stable proteins (parvalbumins) concentrations
3. α -glucosidase activities
4. Free calcium concentrations
5. Nucleotides and derivatives concentrations





- ### Perspectives
- Others species could be tested:
 - Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*)
 - Scallop (*Pecten maximus*)
 - ...
 - From 2DE protocol to 2DIGE (Tiron2012)
 - Other freezing thawing process

