



HAL
open science

Qualité, fraîcheur et authenticité des produits aquatiques

Thierry Grard

► **To cite this version:**

Thierry Grard. Qualité, fraîcheur et authenticité des produits aquatiques. Sciences du Vivant [q-bio].
Université du Littoral Côte d'Opale, 2016. tel-04598488

HAL Id: tel-04598488

<https://ulco.hal.science/tel-04598488>

Submitted on 3 Jun 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Habilitation à Diriger des Recherches

Préparée et Présentée à l'Université du Littoral Côte d'Opale
Institut agroalimentaire régional Charles VIOLLETTE (EA 7394)

Unité Biochimie des Produits Aquatiques
Equipe Qualité et Sécurité des Aliments ULCO
Unité sous Contrat Anses – ULCO

Spécialité : Biochimie Alimentaire

Qualité, fraîcheur et authenticité des produits aquatiques

Thierry GRARD

Soutenue le 30 mai 2016 devant le jury :

Rapporteurs :

Fabienne GUERARDProfesseur, Université de Bretagne Occidentale
Santiago AUBOURG Professeur de Recherche, CSIC, IIM, Vigo
Dominique HERVIO-HEATHCadre de Recherches, HDR, Ifremer Brest

Autres membres du jury :

Véronique VERREZ-BAGNIS Cadre de Recherches, HDR, Ifremer Nantes
Djamel DRIDER Professeur, Université de Lille (1 Sciences et Technologies)
Anne BRISABOIS Directrice de Recherches, Anses Boulogne sur mer
Pascal DHULSTER Professeur, Université de Lille (1 Sciences et Technologies)
Rachid AMARA Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale

A mes parents (†),

A mon épouse,

A mes trois filles.

Exergue



Figure 1 : « La vie au soleil »

Cette photographie a été prise à Ploumanach en décembre 2015 sur le chemin du retour de Brest suite à une réunion avec la CITPPM¹ concernant le projet IDThon (voir page 109). L'artiste, [Hervé QUERE](#), qui a conçu cette œuvre de granit rose intitulée « La vie au soleil » précise : « ce que je cherche à faire ici, c'est à montrer ce que peut représenter l'ADN dans l'évolution. J'ai appelé ma sculpture Vie au soleil pour évoquer l'apparition de la vie sur terre. Mes sculptures sont surtout un support à une recherche esthétique ».

Pour ma part, cette sculpture m'a immédiatement fait penser à la roue de Deming et à l'idée d'une démarche d'amélioration continue d'un système. Cette démarche qualité déclinée en quatre points s'applique totalement à la démarche expérimentale qui pourrait se résumer en quatre phases : 1. l'élaboration des hypothèses de travail, 2. leur exécution, 3. la confrontation des hypothèses avec les résultats acquis ou pas, 4. les conclusions tirées portant sur l'abandon de telle démarche ou la confortation de telle autre qui s'accompagnera alors de l'émission de nouvelles hypothèses dans un cycle infini et qui demande beaucoup d'efforts et d'abnégation...

¹ CITPPM : Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes et de l'aquaculture

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer cette Habilitation à Diriger des Recherches.

Je suis honoré de compter Fabienne GUERARD et Dominique HERVIO-HEATH parmi les rapporteurs et je ne doute pas que ce premier contact sera le point de départ de collaborations riches et fructueuses. Je remercie très sincèrement Santiago AUBOURG, qui a déjà participé à trois jurys de thèse à Boulogne sur mer sur la thématique fraîcheur, dont un en avril 2016 qui impliquait une partie des thèmes abordés dans ce mémoire.

Un remerciement particulier également aux autres membres du jury :

- Véronique VERREZ-BAGNIS, que j'avais rencontrée à l'Ifremer de Nantes au début des années 2000 et qui m'avait orienté sur le sujet différenciation filets frais/filets décongelés. Depuis, c'est un véritable partenariat qui s'est instauré (voir le projet IDThon page 83),
- Djamel DRIDER, pour sa volonté de construire une équipe cohérente et soudée,
- Anne BRISABOIS, auprès de qui j'apprends beaucoup,
- Pascal DHULSTER, pour sa pugnacité à faire reconnaître l'Institut Charles VIOLLETTE en tant que laboratoire de renommée internationale, et pour la voie qu'il nous incite à suivre,
- Rachid AMARA, pour parachever notre collaboration *via* le doctorant Mamadou DIOP.

Ce mémoire constitue l'unique acte de recherche que j'ai accompli individuellement. Un chercheur en biologie ne peut absolument pas travailler en autarcie. Le travail décrit dans ce document n'a pu être mené que parce qu'une équipe y a contribué et que la thématique agroalimentaire représente l'une des priorités de l'ULCO au sein d'un laboratoire régional et pour laquelle de nombreux relais interagissent. Je tiens par ces quelques lignes à remercier :

L'unité BPA (QSA ULCO) et le Président de l'ULCO de 2009 à 2016

- Pierrette ETHUIN qui m'a accompagné depuis le début (en 2003) dans l'aventure de la recherche agroalimentaire et halieutique à l'ULCO sans se

douter combien ce chemin serait long et fastidieux avant d'entraîner percevoir un horizon plus propice,

- Irina SADOVSKAYA pour son excellence scientifique, sa modestie légendaire et son côté pratico-pratique loin des turpitudes « politiciennes » qui nous assaillent,
- Philippe LENCEL et Denis WATIER, les deux briscards de l'équipe formant un binôme très complémentaire,
- Maryse BONNIN, qui (se) cherche et qui saura exprimer tout son potentiel l'expérience aidant,
- Périne DOYEN, pour sa fougue et son caractère tempétueux,
- Cédric LE BRIS, pour sa compétence et sa persévérance qui finira par payer,
- Daline BOJOLLY pour son travail dans l'abnégation,
- Marie-France LOUCHET pour son savoir-faire de gestionnaire.
- Enfin, je remercie Roger DURAND, tout d'abord en tant que Vice-Président recherche de l'ULCO. C'est à cette occasion qu'il a donné son feu vert au co-financement de la première bourse de thèse obtenue par l'équipe. Puis en tant que Président de l'ULCO, il nous a donné les moyens de nous développer en autorisant Irina SADOVSKAYA à rejoindre l'équipe en janvier 2010 et en programmant les trois recrutements de maîtres de conférences de l'IUT génie biologique respectivement en 2011, 2012 et 2013, et enfin pour la mise au concours d'un poste de maître de conférences pour l'année 2016. J'associe et remercie aussi Hassane SADOK pour cette dernière décision.

Les collègues de l'USC Anses – ULCO et plus particulièrement :

- Guillaume DUFLOS : compagnon d'armes qui m'a inlassablement motivé et sur qui je puis toujours compter,

Les collègues de l'Institut Charles VIOLLETTE et plus particulièrement :

- Benoît CUDENNEC pour nos échanges fructueux.

Même s'il s'agissait de brèves rencontres, elles ont néanmoins été déterminantes dans la construction de mon parcours de recherche et de mes prérogatives actuelles. En ce sens, je tiens à remercier d'une part Christian MICHELDANSAC et Benoît WARD, du service recherche de la région Nord Pas de Calais,

pour leur contribution à l'obtention de la première bourse de thèse pour l'unité BPA (QSA ULCO), obtenue en 2009 et cofinancée par la région et l'ULCO.

D'autre part, je remercie Alain DUBRULLE, premier Président de l'ULCO et expert scientifique auprès du Pôle Métropolitain Côte d'Opale (PMCO) pour le soutien et la motivation qu'il a su m'apporter à un moment crucial de ma carrière.

Les membres de la plateforme « Nouvelles Vagues » et plus particulièrement :

Philippe DROIN, pour avoir pensé à moi en 2012 pour contribuer au projet IDThon (page 83), et pour avoir recruté Jérôme CLEACH en 2015 dans l'attente de son financement de thèse.

Enfin je ne puis achever ce chapitre sans rendre hommage aux deux personnes qui m'ont permis d'accomplir ce parcours scientifique...

Ainsi, je remercie :

- Pierre MALLE, ancien directeur du laboratoire des produits de la pêche de l'Anses à Boulogne sur mer, car il a été l'instigateur des travaux initiés sur la fraîcheur des produits aquatiques et il a ainsi porté les fonds baptismaux de l'unité BPA (QSA ULCO) en nous associant au programme Arcir en 2009 (voir page 34).
- Philippe BECEL, ingénieur de recherches Ifremer et ancien directeur du centre d'expérimentation et de valorisation des produits de la mer (CEVPM), pour avoir insufflé l'idée de créer l'Unité Mixte Technologique « Fraîcheur et Qualité des Produits Aquatiques » en 2008 (voir page 34), étape indispensable à la création d'un laboratoire agroalimentaire au sein de l'ULCO.

Sommaire

Exergue	5
Remerciements	7
Sommaire	11
Table des illustrations	13
Liste des abréviations ou acronymes	17
Curriculum vitae	21
Activités de recherche	31
I. Introduction	33
A. <i>De l'origine à la création d'un laboratoire en agroalimentaire et produits aquatiques</i>	33
II. Fraîcheur des produits aquatiques.....	45
A. <i>Marqueurs d'altération et de différenciation frais/décongelé</i>	45
III. Qualité des produits aquatiques	62
A. <i>La mélanose et substitution de sulfites dans le process de cuisson des crevettes</i> 62	
IV. Halioauthenticité	83
A. <i>Différenciation d'espèces de thon</i>	83
V. Flore utile	103
A. <i>Travaux de recherche concernant Isochrysis galbana</i>	103
VI. Projets de recherche déposés et/ou financés	109
A. <i>Projet Nécroptose (2012 -2014)</i>	109
B. <i>Projet FUI IDThon (2013-2016)</i>	109
C. <i>Du projet FUI Resasc (2015-2018) non retenu vers deux projets complémentaires PartenAIRR (2016- 2017) et ANR (N3S) (2015- 2018)</i>	109
D. <i>Projets FranceAgrimer Altfish et Survib</i>	110
E. <i>Dépôts de pré-projets ANR pour 2015</i>	111
F. <i>Projet ICV Aqua</i>	112
Perspectives scientifiques et projets	113
I. Principales perspectives de recherches	115

A.	<i>Thématique altération fraîcheur</i>	<i>115</i>
B.	<i>Thématique flore pathogène : problématique Vibrio.....</i>	<i>121</i>
II.	Le projet transversal ICVAQUA (2015-2018)	130
Activités administratives et d'enseignement		133
I.	Responsabilités pédagogiques liées à la direction de l'IUP QPAH puis à la responsabilité du Master QPAH.....	135
II.	Création et mise en place de nouveaux enseignements	136
III.	Cas particulier de l'opération Univ'Innov' pour les étudiants de master 2 QPAH .	137
IV.	Mise en place d'un enseignement Hygiène et sécurité aux primo-entrants des filières scientifiques à l'ULCO	138
V.	Service d'enseignement des deux dernières années universitaires	139
VI.	Activités administratives.....	140
A.	<i>Responsabilités administratives au sein de l'ULCO.....</i>	<i>140</i>
B.	<i>Responsabilités collectives au-delà du périmètre de l'ULCO</i>	<i>140</i>
Bibliographie.....		143
Annexes : publications scientifiques représentatives.....		171

Table des illustrations

Index des tableaux :

Tableau I : indicateurs de l'activité de recherche, d'enseignement et d'administration.....	29
Tableau II : résultats d'identification des spots protéiques du bar par analyse en LC-MS/MS et comparaison à des séquences spécifiques à certaines espèces et présentes dans les bases de données.....	58
Tableau III : import-export des crevettes tropicales (<i>Penaeus</i>) en 2013.....	63
Tableau IV : réglementation en vigueur concernant l'emploi des sulfites pour les crustacés et les céphalopodes	65
Tableau V : exemples de concentrations maximales en sulfites tolérées dans différentes catégories de produits alimentaires en Europe.....	66
Tableau VI : substances allergènes dont la présence doit obligatoirement être mentionnée selon l'annexe II du Règlement UE 1169, (2011) (INCO)	67
Tableau VII : espèces visées à l'article 2 du règlement européen n°1536/92 (Règlement CE 1536, (1992)).....	84
Tableau VIII : séquences des amorces et des sondes utilisées pour les mesures par la PCR quantitative en temps réel.....	98
Tableau IX : valeur moyenne des cycles seuil et des droites standard obtenues pour les produits frais et les conserves pour l'identification de chaque espèce spécifique	101
Tableau X : service statutaire de l'année universitaire 2014/2015	139
Tableau XI : service statutaire prévisionnel de l'année universitaire 2015/2016	139

Index des figures :

Figure 1 : « La vie au soleil ».....	5
Figure 2 : qualité, sécurité et authenticité des produits aquatiques	42
Figure 3 : positionnement de l'unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA : QSA ULCO) au sein de l'Institut régional de recherche agroalimentaire dans le Nord Pas de Calais dénommé Charles VIOLLETTE	43

Figure 4 : organigramme fonctionnel de l'unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA : QSA ULCO)	44
Figure 5 : produits aquatiques achetés par les ménages en France en 2014 en tonnes (source : FranceAgrimer, (2015)).....	46
Figure 6 : cinétique de la lyse des cellules fibroblastiques SAF-1 au regard de la libération de la lactate déshydrogénase cytosolique dans le milieu extracellulaire au cours du temps.	53
Figure 7 : mesure de la lyse cellulaire dans un filet de daurade par la libération de la lactate déshydrogénase	54
Figure 8 : électrophorèse bidimensionnelle comparative de filets de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) frais vs décongelé	57
Figure 9 : relations entre l'activité de la LDH et le poids de filet de daurade royale (<i>Sparus aurata</i>) avant et après congélation	60
Figure 10 : crevettes crues (<i>Penaeus monodon</i>) mélanosées	69
Figure 11 : classification des phénoloxydases (PO).....	70
Figure 12 : exemple de mécanismes conduisant à la formation de mélanine (phéomélanine et eumélanine) à partir d'un monophénol, la L-tyrosine.....	72
Figure 13 : étude de la stabilité thermique des activités phénoloxydases (APO) au cours du temps.	80
Figure 14 : dispositifs de concentration des poissons (DCP)	86
Figure 15 : identification des espèces <i>Katsuwonus pelamis</i> , <i>Thunnus albacares</i> et <i>Thunnus obesus</i> par PCR sur tissus appertisés	98
Figure 16 : quantification des espèces <i>Thunnus albacares</i> et <i>Thunnus obesus</i> en mélange dans des boîtes de conserves.....	99
Figure 17 : structure chimique du β -glucane d' <i>Isochrysis galbana</i>	106
Figure 18 : croissance des cellules U937 à différentes concentrations de β -D-glucane (0, 50 et 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$).....	108

Index des annexes :

Annexe 1 : differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>) fillets using two-dimensional gel electrophoresis.....	173
Annexe 2 : assessment of freshness and freeze-thawing of sea bream fillets (<i>Sparus aurata</i>) by a cytosolic enzyme: lactate dehydrogenase.....	183

Annexe 3 : melanosis in <i>Penaeus monodon</i> : involvement of the laccase-like activity of hemocyanin	211
Annexe 4 : chemical structure and biological activity of a highly branched (1→3,1→6)-β-D-glucan from <i>Isochrysis galbana</i>	221
Annexe 5 : development of a qPCR method for the identification and quantification of <i>Thunnus obesus</i> , <i>Thunnus albacares</i> and <i>Katsuwonus pelamis</i> in canned tuna	233

Liste des abréviations ou acronymes

ABVT	Azote Basique Volatil Total
ACV	Analyse de Cycle de Vie
ADN	Acide désoxyribonucléique
Anses.....	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AERES.....	Agence d'évaluation de la recherche et de l'enseignement supérieur
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AIRR	Actions d'initiative régionale pour la recherche
Altfish	Développement et comparaison de méthodes pour déterminer des marqueurs précoces d'altération des filets de poisson
ANR	Agence nationale de la recherche
APA.....	Agroalimentaire et Produits Aquatiques
APO.....	Activités phénoloxydases
Arcir	Actions de recherche concertées d'initiative régionale
ARN	Acide ribonucléique
ATER	Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche
ATP	Adénosine Tri Phosphate
B3PA....	Bactériologie et parasitologie des produits de la pêche et de l'aquaculture
BPA.....	Biochimie des produits aquatiques
BQR.....	Bonus Qualité Recherche
BVNC.....	Bactéries viables non cultivables
CE	Communautés Européennes
CEE.....	Communauté Economique Européenne
CEVPM.....	Centre d'expérimentation et de valorisation des produits de la mer
CEVU.....	Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire
CFVU.....	Commission de la Formation et de la Vie Universitaire
CHS.....	Comité Hygiène et Sécurité
CHSCT.....	Comité d'hygiène, de sécurité et des conditions de travail
CITPPM.....	Confédération des industries de traitement des produits des pêches maritimes et de l'aquaculture
CNPE.....	Centrale Nucléaire de Production d'Electricité

CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COX	Cytochrome oxydase
CPER	Contrat de projets état-région
CS	Conseil Scientifique
CR	Commission de la Recherche
CUEEP	Centre Université-Economie d'Education Permanente
DCP	Dispositifs de Concentration des Poissons
DEA	Diplôme d'Etudes Approfondies
DESS	Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées
(L-)DOPA	(L-)Dihydroxy-phénylalanine
EA	Equipe d'Accueil (reconnue par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur)
EPS	Exopolysaccharides
ESI	Electrospray Ionisation (ionisation par électro-nébulisation)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FINS	Forensically Informative Nucleotide Sequencing
FranceAgrimer	Etablissement national des produits de l'agriculture et de la mer
FUI	Fonds unique interministériel
GC-MS	Chromatographie Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
GIS	Groupement d'intérêt scientifique
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène
HCERES	Haut conseil de l'évaluation de la recherche et de l'enseignement supérieur
HDR	Habilitation à diriger des recherches
ICV	Inventaire de Cycle de Vie
ICVAqua	Développement d'inventaires du cycle de vie de produits aquatiques
IDThon	Identification et quantification des espèces de thon dans les conserves appertisées
IE	Ingénieur d'études
IF	Indice de fraîcheur
Ifremer	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IUP	Institut Universitaire Professionnalisé
LBCM	Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire

LNR.....	Laboratoire National de Référence
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LSMBO	Laboratoire de spectrométrie de masse bio-organique
LOG.....	Laboratoire d’Océanologie et de Géosciences
LSA	Laboratoire de Sécurité des Aliments
MALDI-TOF	Spectromètre de masse couplant une source d’ionisation laser assistée par une matrice à un analyseur à temps de vol
MARCO.....	Recherches marines et littorales en Côte d’Opale : des milieux aux ressources, aux usages et à la qualité des produits aquatiques
MCF	Maître de conférences
N3S	Search for Natural Substitute to the use of Sulfites to prevent browning of Shrimp
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP.....	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NPdC.....	Nord Pas de Calais
PCPPA	Physico-chimie des produits de la pêche et de l’aquaculture
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
PEF	Product Environmental Footprint de la Commission européenne
PFGE	Pulse-Field Gel Electrophoresis
PFINV.....	Plateforme d’Innovation « Nouvelles Vagues »
PLDE	Plan local de développement économique
PMCO	Pôle Métropolitain Côte d’Opale
PO	Phénolxydases
QIM.....	Quality index method
QPAH.....	Qualité des Procédés Agroalimentaires et Halieutiques
QSA.....	Qualité et Sécurité des Aliments
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
Resasc	Recherche de solutions alternatives à l’utilisation des sulfites pour la prévention de la mélanose de crevettes
RMN.....	Résonance Magnétique Nucléaire
SA.....	Société anonyme
SAIC.....	Service des activités industrielles et commerciales

Survib	Les <i>Vibrio</i> potentiellement pathogènes à l'état viable .. mais non cultivable : étude de leur capacité à survivre dans les environnements hostiles et de leur retour à l'état viable sous des conditions favorables
SYBR®Green.....	marqueur fluorescent de l'ADN de la famille des cyanines asymétriques et de marque déposée
TMA	Triméthylamine
ULCO.....	Université du Littoral Côte d'Opale
UMT.....	Unité mixte technologique
USC.....	Unité sous contrat
USTL.....	Université des Sciences et Technologies de Lille
UV	Ultraviolet
VAE.....	Validation d'acquis de l'expérience

Curriculum vitae

GRARD Thierry

Né le 20 avril 1964

Maître de Conférences Hors Classe

Section : 64 – biochimie, biologie moléculaire

Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO)

Boulevard du Bassin Napoléon BP 120

62327 Boulogne sur mer CEDEX

thierry.grard@univ-littoral.fr***Titres et diplômes***

Octobre 1991	Moniteur d'initiation à l'enseignement supérieur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL)
Octobre 1993	ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche) en biochimie à l'USTL
Juin 1994	Docteur de l'USTL, spécialité Biochimie
Septembre 1994	ATER en Biochimie à l'ULCO
Septembre 1995	Nommé en qualité de Maître de Conférences à l'ULCO
Septembre 2000	Nommé en qualité de Maître de Conférences Première classe , à l'ULCO
Septembre 2010	Nommé en qualité de Maître de Conférences Hors classe , à l'ULCO

Expérience professionnelle

De 1995 à 2001	Responsable d'année de l'IUP « Qualité des Procédés Agroalimentaires et Halieutiques » (QPAH)
De 2001 à 2006	Directeur de l'IUP QPAH
Depuis 2006	Responsable du Master QPAH et Président de jury des 3 années (L3, M1, M2), formation initiale et continue
De 2008 à 2013	Responsable scientifique de l'équipe de recherche Agroalimentaire et Produits Aquatiques (APA ULCO)
De 2010 à 2015	Président de jury de la licence professionnelle « Métier du conseil en élevage, production laitière », formation continue
Depuis 2014	Chef de l'unité « Biochimie des Produits Aquatiques » au sein de l'Unité sous Contrat : USC Anses –ULCO
Depuis 2015	Responsable de l'Unité Qualité et Sécurité des Aliments QSA du site de Boulogne sur mer au sein de l' Institut Agroalimentaire Régional Charles VIOLLETTE (Université de Lille 1 et 2, Artois, ULCO, Faculté Libre des Sciences de Lille)

*Informations complémentaires***Mandats électifs**

- De 1997 à 2001 Membre élu du **Conseil Scientifique** de l'ULCO
- Depuis 2000 Membre élu du **conseil de Département de Sciences de la Vie et de la Nature** de l'ULCO
- De 2000 à 2004 Membre élu du **Comité Hygiène et Sécurité** de l'ULCO
- De 2001 à 2005 Membre élu du **CEVU** de l'ULCO
- Depuis 2006 Membre élu du **Centre de Gestion Universitaire** de Boulogne sur mer au sein de l'ULCO
- De 2008 à 2016 Membre élu du **CEVU** de l'ULCO devenu **CFVU** en 2014
- Depuis 2012 Membre élu au sein du conseil scientifique du **GIS Campus de la mer**
- De 2016 à 2020 Membre élu du **Conseil d'administration** de l'ULCO

Mandats administratifs

- De 2004 à 2016 **Chargé de Mission** à la politique d'**Hygiène et Sécurité** pour l'ULCO
- De 2005 à 2015 **Représentant titulaire de l'ULCO** désigné par le Président d'Université au sein du **Conseil d'Administration** du **Pôle de compétitivité Aquimer**
- Depuis 2015 **Représentant suppléant de l'ULCO** désigné par le Président d'Université au sein du **Conseil d'Administration** du **Pôle de compétitivité Aquimer**
- De 2006 à 2014 **Membre du jury VAE** (Validation d'Acquis de l'Expérience) de l'ULCO
- De 2008 à 2012 **Représentant de l'ULCO** désigné par le Président d'Université au sein du **Conseil Portuaire** de Boulogne sur mer
- De 2009 à 2013 **Président de la commission formation/innovation/recherche** désigné par le Président de l'ULCO au sein de la Mission de prospective sur les métiers aquatiques dans le Boulonnais dénommée « **Capécure 2020** » mise en place par le Président de la Région Nord Pas de Calais
- De 2011 à 2013 **Coordinateur de la commission Budget** mise en place au sein de l'ULCO par le Président de l'Université
- De 2013 à 2016 **Membre de la commission formation** mise en place au sein de l'ULCO par le Président de l'Université
- Depuis 2013 **Membre du conseil de surveillance** de la SA « Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues » (**PFINV**), désigné par le Président de l'Université
- De 2014 à 2016 **Membre de la commission statuts** mise en place au sein de l'ULCO par le Président de l'Université
- Depuis 2014 **Membre du conseil** du Service des Activités Industrielles et Commerciales (**SAIC**) de l'ULCO
- Depuis 2015 **Membre des comités de direction et de gestion** de

Liste des publications et communications

Articles parus dans des revues internationales à comité de lecture

1. Haeuw, J. F., **Grard, T.**, Alonso, C., Strecker, G. et Michalski, J. C. (1994) The core-specific lysosomal alpha(1-6)-mannosidase activity depends on aspartamidohydrolase activity. *Biochem J* 297, Pt 3, pp 463-6.
2. **Grard, T.**, Saint-Pol, A., Haeuw, J. F., Alonso, C., Wieruszeski, J. M., Strecker, G. et Michalski, J. C. (1994) Soluble forms of alpha-D-mannosidases from rat liver. Separation and characterization of two enzymic forms with different substrate specificities. *Eur J Biochem* 223, 1, pp 99-106.
3. Bourgerie, S., Karamanos, Y., **Grard, T.** et Julien, R. (1994) Purification and characterization of an endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from the culture medium of *Stigmatella aurantiaca* DW4. *J Bacteriol* 176, 20, pp 6170-4.
4. **Grard, T.**, Herman, V., Saint-Pol, A., Kmiecik, D., Labiau, O., Mir, A. M., Alonso, C., Verbert, A., Cacan, R. et Michalski, J. C. (1996) Oligomannosides or oligosaccharide-lipids as potential substrates for rat liver cytosolic alpha-D-mannosidase. *Biochem J* 316, Pt 3, pp 787-92.
5. Sharrock, P., Zahraoui, C., Anselme, K., Rouahi, M., Noël, B., **Grard, T.**, Jeanfils, J. et Hardouin, P. (2001) Molecularly engineered hydroxylapatite. *Key Engineering Materials*, 192-195, pp 483-486.
6. Cornet, F., Anselme, K., **Grard, T.**, Rouahi, M., Noel, B., Hardouin, P. et Jeanfils, J. (2002) The influence of culture conditions on extracellular matrix proteins synthesized by osteoblasts derived from rabbit bone marrow. *J Biomed Mater Res* 63, 4, pp 400-7.
7. Vinogradov, E., Valence, F., Maes, E., Jebava, I., Chuat, V., Lortal, S., **Grard, T.**, Guerardel, Y. et Sadovskaya, I. (2013) Structural studies of the cell wall polysaccharides from three strains of *Lactobacillus helveticus* with different autolytic properties: DPC4571, BROI, and LH1. *Carbohydr Res* 379, pp 7-12.
8. Yildiz, F., Fong, J., Sadovskaya, I., **Grard, T.** et Vinogradov, E. (2014) Structural Characterization of the Extracellular Polysaccharide from *Vibrio cholerae* O1 El-Tor. *PLoS ONE* 9, 1, p e86751.
9. Ainsworth, S., Sadovskaya I., Vinogradov E., Courtin P., Guerardel Y., Mahony J., **Grard T.**, Cambillau C., Chapot-Chartier M.P. et Van Sinderen D. (2014) Differences in Lactococcal Cell Wall Polysaccharide Structure Are Major Determining Factors in Bacteriophage Sensitivity, *mBIO*, 5, 3, p e00880-14.
10. Dehaut, A., Himber, C., Mulak, V., **Grard, T.**, Krzewinski, F., Le Fur, B. et Duflos, G. (2014) Evolution of volatile compounds and biogenic amines throughout the shelf-life of marinated and salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 32, pp 8014–8022.

11. Sadvovskaya, I., Souissi, A., Souissi, S., **Grard, T.**, Lencel, P., Greene, C. M., Duin, S., Dmitrenok, P. S., Chizhov, A. O., Shashkov, A. S. et Usov, A. I. (2014) Chemical structure and biological activity of a highly branched ((1→3,1→6)-β-D-glucan from *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers* **111**, pp 139-148.
12. Ethuin, P., Marlard, S., Delosière, M., Carapito, C., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Dehaut, A., Lencel, V., Duflos, G. et **Grard, T.** (2015) Differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis. *Food Chemistry* **176**, pp 294-301.
13. Dehaut, A., Krzewinski, F., **Grard, T.**, Chollet, M., Jacques, P. Brisabois, A et Duflos, G. (2016) Monitoring the freshness of fish: development of a qPCR method applied to MAP chilled whiting *J. Sci. Food Agric.* **96**,6, pp 2080-2089
14. Le Bris, C., Cudennec, B., Dhulster, P., Drider, D., Duflos, G. et **Grard, T.** (2016) Melanosis in *Penaeus monodon*: involvement of the laccase-like activity of hemocyanin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 3, pp 663-670
15. Dehaut, A., Duthen, S., **Grard, T.**, Krzewinski, F., N'Guessan, A., Brisabois, A. et Duflos, G. Development of an SPME-GC-MS method for the specific quantification of dimethylamine and trimethylamine: use of a new ratio for the freshness monitoring of cod fillets, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, accepté et mis en ligne en décembre 2015. [DOI: 10.1002/jsfa.7570](https://doi.org/10.1002/jsfa.7570)

Communications orales

1. Marlard, S., Duflos, G., Le Fur, B., Vincent, D., Ethuin, P. et **Grard, T.** A multi variable and complementary exudate analysis to differentiate fresh to frozen/ thawed skinless European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fillet (2013), 43th WEFTA Meeting, 9-11 October 2013, Tromsø (Norway)
2. Dehaut, A., Chollet, M., Jacques, P., Krzewinski, F., N'Guessan, A., Kol, O., **Grard, T.**, Brisabois, A. et Duflos, G. Use of degenerate primers to detect and quantify torA gene harbored by specific spoilage organisms of fish (2014) 24th International ICFMH (International Committee on Food Microbiology and Hygiene) Conference 1-4 sept 2014, Nantes (France)
3. Dehaut, A., Krzewinski, F., N'Guessan, A., Kol, O., **Grard, T.**, Brisabois, A. et Duflos, G. Quantification of fish partial volatile basic nitrogen by SPME-GC/MS (2014), 44th WEFTA Meeting, 9-11 June 2014, Bilbao (Spain)
4. Bojolly, D., Verrez-Bagnis, V., Lefur, B., Christaki, U., **Grard, T.** et Doyen P. Authentification et quantification d'espèces de thons dans les produits appertisés (2015) 1^{er} colloque QSPA (Qualité et sécurité des produits aquatiques) ; 17-19 juin 2015, Boulogne sur mer (France)
5. Bonnin M., Copin S., Brisabois, A., **Grard, T.** et Midelet-Bourdin, G. Détection de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* dans les produits de la mer : standards FDA et ISO versus méthodes moléculaires récentes (2015) 1^{er} colloque QSPA (Qualité et sécurité des produits aquatiques) ; 17-19 juin 2015, Boulogne sur mer (France)
6. Bojolly D., Verrez-Bagnis, V., Lefur, B., Christaki, U., **Grard, T.** et Doyen P. Development of a qPCR method for the identification and quantification of

Thunnus obesus, *Thunnus albacares* and *Katsuwonus pelamis* in canned tuna (2015) 5th Trans Atlantic Fisheries Technology Conference (TAFT) ; 12-15 October 2015, Nantes (France)

Communications écrites

1. Mamadou, D., Watier, D., Amara, R., **Grard, T.** et Lencel, P. La lactate déshydrogénase (LDH) : marqueur de fraîcheur et de congélation des filets de daurade royale (*Sparus aurata*) ? (2015) 1^{er} colloque QSPA (Qualité et sécurité des produits aquatiques) ; 17-19 juin 2015, Boulogne sur mer (France)
2. Le Bris, C., Cudennec, B., Dhulter, P., Drider, D., Duflos, G. et **Grard T.** Reconsidération de l'activité phénoloxydase post-mortem chez la crevette géante tigrée « *Penaeus monodon* » (2015) 1^{er} colloque QSPA (Qualité et sécurité des produits aquatiques) ; 17-19 juin 2015, Boulogne sur mer (France)

Article soumis dans une revue internationale à comité de lecture

1. Diop, M., Watier, D., Masson, P-Y., Diouf, A., Amara, R., **Grard, T.** et Lencel, P. Assessment of freshness and freeze-thawing of sea bream fillets (*Sparus aurata*) by a cytosolic enzyme: lactate dehydrogenase, *Food Chemistry*, soumis en juillet 2015, en révision majeure en décembre 2015, en navette pour révision mineure depuis février 2016.

Encadrements

Liste des thèses soutenues

Janvier 2010 à décembre 2013 : co-encadrement à 50 % (avec Pierrette ETHUIN) de la thèse de Sylvain MARLARD (2010 - 2013) : différenciation de filets de poisson frais de filets congelés/décongelés sur le modèle du bar (*Dicentrarchus labrax*), soutenue le 20 décembre 2013 à l'ULCO. Celle-ci a fait l'objet d'un cofinancement de l'ULCO à 50 % et de la région Nord Pas de Calais à 50 %. Cette thèse s'inscrivait dans la thématique de l'UMT fraîcheur et qualité des produits aquatiques et dans le cadre d'un financement Arcir obtenu en 2009 en partenariat avec l'AFSSA (Anses) de Boulogne sur mer.

Octobre 2011 à décembre 2014 : participation au comité de pilotage de la thèse d'Alexandre DEHAUT : « Evaluation de la qualité-fraîcheur du poisson par des approches biochimiques (SPME-GC/MS) et moléculaires (qPCR) » soutenue à Lille le 2 décembre 2014, dirigée par Guillaume DUFLOS au sein de l'Anses.

- *Liste des thèses en cours :*

Septembre 2013 à août 2016 : co-encadrement à 25 % de la thèse de Daline BOJOLLY qui a débuté en septembre 2013 : « Développement d'une méthode d'identification et de quantification des espèces de thons dans des produits appertisés par PCR en temps réel ». Celle-ci fait l'objet d'un cofinancement à 50 % de PFINV (Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues) dans le cadre du projet FUI IDthon et de la région Nord Pas de Calais à 50 %.

Octobre 2014 à septembre 2017 : co-encadrement à 25 % de la thèse d'Estelle ZEYER qui a débuté en octobre 2014 : « Stratégies alternatives pour prévenir l'action allergique des sulfites dans les crevettes ». Cette thèse fait l'objet d'un financement à 50 % par le PMCO et à 50 % par l'ULCO.

Octobre 2015 à septembre 2018 : co-encadrement à 25 % de la thèse de Jérôme CLEACH qui débute en novembre 2015 : « Etude et développement de marqueurs moléculaires précoces permettant d'identifier l'état de fraîcheur des filets de poissons ». Cette thèse fait l'objet d'un financement à 50 % par le PMCO et à 50 % par PFINV.

- *Thèse proposée pour 2016 :*

Novembre 2015 : dépôt d'un dossier de demande de thèse auprès de la direction des laboratoires de l'Anses dont le sujet s'intitule : « Impact des pratiques d'élevage du bar (*Dicentrarchus labrax*) sur la flore microbienne et des populations de *Vibrio* spp. d'intérêt en santé animale et publique ».

- **Encadrements d'étudiants de master 2**

GOBERT Mylène : stage recherche du master 2 Bioprocédés et Biotechnologies Végétales (Lille 1) (2006) : sujet du mémoire : Utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle pour l'authentification des produits de la mer : recherche de protéines permettant de différencier des filets de bar frais de filets de bar décongelés. Mention bien, major de promotion.

PAKNAHAD Elmira : stage recherche de master 2 QPAH (2014) : sujet du mémoire : Détermination de marqueurs chimiques et moléculaires pour la caractérisation de la fraîcheur du poisson. Laboratoire : unité BPA USC Anses ULCO. Mention bien. Co-encadrement du stage à hauteur de 25 %.

Tableau I : indicateurs de l'activité de recherche, d'enseignement et d'administration

Indicateurs recherche	Détails
Rédaction /coordination de projets	1 projet Arcir (2009-2012) : co-rédacteur 1 projet émergent région NPdC (2012-2014) : rédacteur et coordinateur 3 projets FUI (2013-2016, 2015-2018, 2016-2019) : co-rédacteur et en partie coordinateur 2 projets FranceAgrimer (2015-2016) : co-rédacteur et coordinateur de l'un d'entre eux 2 pré-projets ANR (2015) : co-rédacteur 1 projet de recherche nouveaux modèles de développement région NPdC (2015-2018) : co-rédacteur et coordinateur Co-rédacteur de l'axe 4 du CPER MARCO (2015-2019)
Participation à la structuration des axes de recherche du laboratoire	Contributeur à la création de l'Unité Mixte Technologique "Qualité et Fraîcheur des Produits Aquatiques" (2008-2011) Contributeur à la création de l'unité sous contrat USC Anses - ULCO (2014) Contributeur pour l'ULCO à la création de l'institut agroalimentaire régional Charles Viollette (2015)
Encadrements de doctorants	2 thèses soutenues (2013 et 2014) et 3 thèses en cours avec un encadrement à 50 % pour 3 d'entre elles
Encadrements de master 2	2 stages recherche de master 2 : 2006, maître de stage et 2014 : encadrement à 25 %
Activité de publication	15 publications dans des revues internationales à comité de lecture dont 2 en premier auteur et 2 en dernier auteur
Organisation de congrès	Membre du comité scientifique de l'organisation du congrès "Qualité et Sécurité des Produits Aquatiques" (juin 2015)
Développement de collaborations	Collaborations nationales Anses Boulogne sur mer et Maison-Alfort Ifremer de Nantes INRA de Clermont Ferrand, Jouy en Josas et Rennes UMR CNRS d'Aix-Marseille, de Lille 1, de Strasbourg et de l'ULCO Universités d'Artois et de Lille 1 Université de Poitiers Collaborations internationales Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Investigaciones Marinas (IIM) de Vigo, Espagne Department of Microbiology and Environmental Toxicology, University of California Santa Cruz, Californie, USA Department of Medicine, Royal College of Surgeons, Dublin, Irlande Department of Microbiology, University College Cork, Irlande Faculty of Food and Biochemical Technology, Prague, République Tchèque National Research Council, Ottawa, Canada Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok, Russie Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscou, Russie
Indicateurs enseignement	Détails
Charges d'enseignement	Depuis 1995, service statutaire auquel s'ajoutent de 20 à 50 heures complémentaires (comprenant 66 h de RNT) par an en licence SV 1,2 et 3, licence pro et master agroalimentaire
Responsabilités / création d'unités d'enseignement	Responsable d'année d'IUP de 1995 à 2001 Directeur d'IUP de 2001 à 2006 (5 ans). Rédaction du dossier d'habilitation en 2001 Contributeur pour l'ULCO à la création du master agroalimentaire régional (2006) Porteur de projet du master QPAH. Rédaction des dossiers d'habilitation pour les campagnes 2005, 2010 et 2014 Responsable de master depuis 2006 (10 ans) : responsable de l'année master 2 et président de jury de la L3 SV parcours agro et des masters 1 et 2 QPAH Créateur de 6 unités d'enseignement (licence SV, licence pro et master) et de l'ensemble des TP de biochimie alimentaire du master agroalimentaire Créateur en 2009 du dispositif "Univ Innov", module de R&D du master QPAH en immersion dans l'entreprise en partenariat avec Oséo et la CCI. Subventions attribuées aux projets de recherche menés de A à Z par les étudiants de master 2 Contributeur de la mise en place du module projet professionnel en 2000 et depuis animateur de ce module transversal à l'ULCO et participant à la réussite des étudiants en licence, devenu PPP en 2014 Créateur et animateur du module transversal d'hygiène et sécurité dispensé aux primo-entrants scientifiques de l'ULCO depuis 2007
Indicateurs administration	Détails
Mandats/représentation dans des instances de l'établissement	Mandats électifs Elu au conseil scientifique de l'ULCO de 1997 à 2001 Elu au conseil de département Sciences de la Vie depuis 2000 Elu au CHS de 2000 à 2004 dont j'ai démissionné pour occuper les fonctions de chargé de mission H&S Elu au CEVU de 2001 à 2005 puis depuis 2008, devenu CFVU en 2014 Elu au conseil de CGU de Boulogne sur mer depuis 2006 Membre élu du jury VAE de l'ULCO de 2006 à 2014 Membre élu et coordinateur de la commission budget de l'ULCO de 2011 à 2013 Membre élu de la commission formation de l'ULCO depuis 2013 Membre élu du conseil scientifique du GIS "Campus de la mer" depuis 2013 Membre élu de la commission des statuts de l'ULCO depuis 2014 Membre élu du conseil du SAIC depuis 2014 Mandats administratifs Chargé de mission Hygiène et Sécurité de l'ULCO de 2004 à 2015 Membre du groupe de travail sur les risques psychosociaux de l'ULCO depuis sa mise en place en 2011 jusque 2015 Membre invité de la commission recherche en tant que responsable scientifique de l'unité BPA depuis 2014
Mandats/représentation hors des instances de l'établissement	Administrateur du pôle de compétitivité Aquimer de 2005 à 2015. Suppléant depuis 2015 Membre du conseil portuaire de Boulogne sur mer de 2008 à 2013 Président de la commission innovation/recherche/formation de la mission "Capécure 2020" de 2009 à 2014 Administrateur du conseil de surveillance de la SA Plateforme d'innovation Nouvelles Vagues depuis 2013 Membre des comités de gestion et de direction de l'institut Charles VIOLLETTE depuis 2015 Expert auprès de l'HCERES au sein du département des formations afin dévaluer des formations universitaires de la vague B en 2016

Activités de recherche

I. Introduction

A. De l'origine à la création d'un laboratoire en agroalimentaire et produits aquatiques

1. Le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire (LBCM)

J'ai débuté mon activité de recherches à l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) en 1995, en tant que maître de conférences, au sein d'une équipe en création constituée de trois personnes avec le Professeur Joseph JEANFILS et Christophe CHAUVEAU (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherches : ATER). De 1996 à 1999, le laboratoire s'est développé à Calais par le biais de différents recrutements de maîtres de conférences, d'ingénieurs de recherche ou d'études et de techniciens.

De 1999 à 2004, transféré à Boulogne sur mer, le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire (LBCM) développait parallèlement deux thématiques de recherche : l'agroalimentaire et les biomatériaux. J'ai travaillé sur cette dernière thématique ([Sharrock et al., \(2001\)](#), [Cornet et al., \(2002\)](#)).

En 2004, la direction de l'ULCO a décidé de scinder ces deux thématiques de recherche et de faire en sorte que le LBCM ne s'inscrive plus que dans la seule thématique santé. Bien qu'il fût précisé que la thématique agroalimentaire devait perdurer au sein de l'ULCO, il m'a aussi été clairement signifié que cette recherche ne pourrait s'effectuer qu'avec les seuls moyens humains disponibles. Par conséquent, à partir de cette date et jusqu'en 2009, j'ai travaillé sans adossement à un laboratoire sur la thématique agroalimentaire. J'ai pu compter sur Pierrette ETHUIN, maître de conférences et sur des stagiaires de l'Institut Universitaire Professionnalisé (IUP) puis du master Qualité des Procédés Agroalimentaires et Halieutiques (QPAH) à raison d'un stagiaire pour une période de trois mois par an. La recherche s'est effectuée dans les locaux de la structure d'enseignement du bâtiment Capécure au sein duquel le master QPAH est hébergé.

Bien que les conditions de recherches fussent très insuffisantes, j'avais tenu à développer une recherche appliquée en agroalimentaire en cohérence avec la formation que je dirige et en adéquation avec le tissu socio-économique local. Cette problématique de recherches s'inscrivait dans les objectifs des projets

développés au sein du pôle de compétitivité « [Aquimer](#) », labellisé en 2005, mais aussi dans le schéma régional de développement économique, ainsi que dans le Plan Local de Développement Economique (PLDE).

2. *L'Unité Mixte Technologique (UMT) Fraîcheur et Qualité des Produits Aquatiques de 2008 à 2011*

L'**Unité Mixte Technologique** labellisée par le ministère de l'agriculture en août 2008, dénommée [UMT](#) « **Fraîcheur et Qualité des Produits Aquatiques** » a constitué l'ébauche d'un rapprochement entre les structures de recherche boulonnaises liées à l'agroalimentaire et aux produits aquatiques. Elle résultait en effet de la volonté des chercheurs locaux de travailler ensemble et en ce qui me concerne de donner un cadre à mon implication dans la recherche en agroalimentaire lié aux produits aquatiques. Ce regroupement impliquait ainsi le laboratoire de Boulogne sur mer de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA devenue [Anses](#) depuis) dirigée à l'époque par Pierre MALLE, le Centre d'Expérimentation et de Valorisation des Produits de la Mer (CEVPM devenu [Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues »](#) depuis) dirigé à ce moment par Philippe BECEL et l'équipe agroalimentaire de l'ULCO dont j'étais le responsable scientifique. L'UMT a perduré jusqu'en 2011. Cette structure nous a permis d'obtenir en février 2009 un financement Arcir intitulé « Etude de méthodes pour déterminer la fraîcheur (notions d'altération et de différenciation frais/décongelé) des filets de poissons » en partenariat avec l'Anses Boulogne.

Suite à son élection à la présidence de l'ULCO en octobre 2009, le Professeur Roger DURAND a été à l'origine du cofinancement de la thèse du doctorant Sylvain MARLARD. Ce dernier a travaillé sur le sujet Arcir cité ci-dessus de janvier 2010 à décembre 2013, date de sa soutenance de thèse, qui a été cofinancée à 50 % par l'ULCO et 50 % par la Région Nord Pas de Calais. D'autre part, une collègue ingénieur d'études et HDR a également rejoint l'équipe en novembre 2009, signe d'une volonté de la direction de l'ULCO de développer cette équipe émergente. Irina SADOVSKAYA a ainsi commencé à travailler sur la constitution de dépôts alimentaires et bactériens sur les surfaces (force d'adhésion, cohésion, cinétique) et leurs conséquences en termes d'hygiène des surfaces. Elle a de ce fait axé ses recherches principalement sur la détermination de la structure des exopolysaccharides bactériens produits par *Listeria*

monocytogenes issue de la matrice poisson en partenariat avec l'Anses Boulogne sur mer.

3. *L'Unité sous contrat (USC) Anses – ULCO à compter du 1^{er} janvier 2014*

Suite à la non reconduction de l'UMT en 2011, en raison du changement de statut du Centre technique d'Expérimentation et de Valorisation des Produits de la Mer (CEVPM) devenu la société anonyme (SA) « Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues (PFINV) » et dans un souci de pérenniser ce rapprochement des structures de recherche boulonnaises travaillant sur l'agroalimentaire, j'ai travaillé à un rapprochement scientifique avec mes partenaires de l'Anses à Boulogne sur mer sachant que la direction de l'ULCO avait renforcé l'équipe de recherches BPA en créant successivement de 2011 à 2013, trois postes de maître de conférences attribués à Philippe LENCEL, Périne DOYEN et Maryse BONNIN-JUSSERAND. Cet investissement a abouti à la signature d'une convention signée en novembre 2013 entre l'Anses et l'ULCO. Cette convention a établi la mise en place d'une **Unité sous Contrat (USC)** depuis le 1^{er} janvier 2014, entre le département « Produits de la Pêche et de l'Aquaculture » du Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSA) de l'Anses sous la direction d'Anne BRISABOIS et l'unité « Biochimie des Produits Aquatiques » (BPA) que je dirige (voir organigramme fonctionnel de l'unité Biochimie des Produits Aquatiques, **Figure 4** page 44).

4. *L'Institut agroalimentaire régional Charles VIOLLETTE à compter du 1^{er} janvier 2015*

Parallèlement à la constitution de l'USC avec l'Anses, je me suis impliqué à partir de 2012 dans la mise en place de l'[Institut agroalimentaire régional Charles VIOLLETTE](#), suite à une démarche initiée par le Professeur Pascal DHULSTER de l'université de Lille 1. Cet institut a été constitué par le rassemblement, sur la base du volontariat, de l'ensemble des équipes ou laboratoires régionaux travaillant en agroalimentaire. Ainsi, l'unité BPA de l'ULCO s'est vue associer à l'évaluation de l'Institut VIOLLETTE par l'AERES en novembre 2013 sur la base d'un projet de recherches pour le contrat quinquennal 2015-2019. Il est à noter que la partie impliquant la recherche sur les produits aquatiques nous concernant directement a obtenu un avis favorable de la part des experts de l'[Evaluation AERES, \(2013\)](#) ([expertise disponible en ligne](#)). L'unité

BPA fait désormais partie intégrante de l'équipe Qualité et Sécurité des Aliments (QSA) de l'Institut Charles VIOLLETTE, animée par le Professeur Djamel DRIDER, sous la terminologie QSA ULCO (voir **Figure 3** page 43).

5. Positionnement des thématiques de recherches de l'unité BPA (QSA ULCO) dans un contexte local et régional

L'élaboration des thématiques de recherches de l'unité BPA (QSA ULCO) émane d'une réflexion incluant à la fois :

- l'adéquation avec les programmes de recherche émanant de l'équipe Qualité et Sécurité des Aliments de l'Institut Charles VIOLLETTE,
- le souci de développer une recherche universitaire correspondant aux axes stratégiques de l'ULCO par le biais du programme scientifique du campus de la mer et qui s'est concrétisé par le programme de recherches du Contrat Plan Etat Région (CPER) 2015-2019 intitulé MARCO : recherches MARines et littorales en Côte d'Opale : des milieux aux ressources, aux usages et à la qualité des produits aquatiques,
- une complémentarité de recherches avec l'Anses Boulogne dans les sujets portant sur les risques biochimiques et microbiologiques liés aux produits aquatiques,
- de la problématique des industriels de la filière pêche *via* le pôle Aquimer et sa feuille de route stratégique.

a. Positionnement par rapport à la feuille de route stratégique du pôle Aquimer

Etant membre du conseil d'administration du pôle de compétitivité Aquimer depuis sa création en 2005, j'ai pu profiter des réflexions successives menées en groupes de travail, notamment à l'occasion des différents audits ministériels que le pôle a dû préparer, dont le dernier remonte à février 2012. Ces séances de travail, regroupant à la fois des industriels de la filière pêche, des institutionnels régionaux et des scientifiques, ont permis de définir la stratégie de recherche du pôle. Celle-ci se décline en trois thèmes desquels les thématiques de l'unité BPA (QSA ULCO) peuvent s'inspirer :

- ◆ « *Maximiser les ressources disponibles et créer de nouvelles ressources dans une perspective de développement durable* ». Face à une demande croissante de produits aquatiques, l'avenir des entreprises du secteur passe par la

« *valorisation optimale des captures issues de la pêche* » (dans laquelle s'insère la thématique fraîcheur et altération) et le « *développement de l'aquaculture* » (dans lequel s'insère la thématique flore d'altération et flore utile).

- ◆ « *Positionner les produits aquatiques dans l'alimentation du futur : les entreprises doivent impérativement créer de la valeur ajoutée afin de répondre à l'évolution rapide des marchés (produits élaborés...) et aux attentes nouvelles des consommateurs* ». La thématique halioauthenticité s'inscrit dans ce deuxième thème.
- ◆ « *Modifier les fondamentaux de l'industrie aquatique pour faire émerger de nouvelles approches métiers et technologiques* ». L'amélioration de la compétitivité des entreprises passe des gains de productivité. Pour cela, il est impératif d'« *innover et* » d'« *améliorer les process, tout en maîtrisant les enjeux de développement durable* ». La thématique concernant la substitution des sulfites dans la lutte contre la mélanose des crevettes s'inscrit parfaitement dans cette optique concernant à la fois la qualité des produits et une aquaculture durable.

b. Positionnement par rapport aux thématiques du campus de la mer et du CPER Marco

Les travaux de l'unité BPA (QSA ULCO) s'inscrivent dans l'axe 4 du CPER MARCO. Cet axe tient compte des problématiques actuelles et à venir en relation avec l'évolution pressentie de la filière « poisson », liée à la mise sur le marché de produits d'importation et d'espèces jusqu'alors non pêchées sur les côtes françaises, à la mise en place de nouveaux traitements et procédés dans les industries de transformation des produits aquatiques, à l'apparition de nouveaux modes de consommation des produits de la mer, notamment la consommation de produits crus ou peu cuits. Enfin, compte tenu de la diminution des ressources halieutiques, le développement d'une aquaculture durable est l'un des enjeux majeurs du futur, qui devra intégrer l'impact sur l'évolution des écosystèmes marins. Les résultats obtenus suite aux travaux programmés dans cet axe permettront d'actualiser les bases de données et de renforcer les connaissances sur les contaminants chimiques et microbiologiques des produits aquatiques. Ils apporteront des éléments supplémentaires pour l'évaluateur et le gestionnaire du risque vis-à-vis des consommateurs. Les travaux de recherche pressentis visent à

caractériser, pour mieux les maîtriser, les contaminants chimiques et microbiologiques qui pourraient affecter la transformation et la consommation des produits de la mer et de l'aquaculture. Trois actions sont développées au sein de cet axe :

- la caractérisation des biotoxines et contaminants chimiques,
- la caractérisation des contaminants microbiologiques,
- l'halioauthenticité.

c. Positionnement par rapport à la stratégie de recherche de l'Institut Charles VIOLLETTE

Dans le rapport qui a été écrit à plusieurs mains et auquel j'ai contribué pour l'évaluation AERES de novembre 2013, le programme de l'équipe Qualité et Sécurité des Aliments (QSA) de l'Institut Charles VIOLLETTE est résumé ainsi : « l'équipe QSA vise à développer une recherche tournée vers la qualité et la sécurité des aliments, notamment des aliments frais et transformés, en abordant, d'une part, les dangers chimiques et biologiques que peut subir un aliment au cours de sa transformation et/ou conservation, et d'autre part, les relations entre la structure d'un aliment à l'échelle moléculaire et ses qualités organoleptiques et nutritionnelles ». Le projet proposé se déclinait en deux axes majeurs :

- Développement de méthodes et de concepts pour la sécurité des aliments,
- Caractérisation de la qualité des aliments – relation avec la structure et développement de méthodes innovantes et texturales.

d. Conclusion

La recherche menée au sein de l'unité BPA (QSA ULCO) s'inscrit totalement dans les différents axes présentés ci-dessus et peut être développée ci-dessous.

6. Présentation des thématiques de recherches de l'unité BPA (QSA ULCO)

L'unité de recherches boulonnaise, dénommée BPA au sein de l'ULCO, est une composante de l'unité QSA de l'Institut Charles VIOLLETTE (voir **Figure 3** page 43). L'unité BPA (QSA ULCO), que je dirige (voir **Figure 4** page 44), développe ainsi trois thématiques dont deux en lien avec les thématiques des unités respectives de *Physico-Chimie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture* (PCPPA) dirigée par Guillaume DUFLOS (Anses) et de *Bactériologie et*

Parasitologie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture (B3PA) dirigée par Graziella BOURDIN (Anses) au sein de l'USC Anses - ULCO.

i. Première thématique : qualité et fraîcheur des produits aquatiques

L'unité BPA (QSA ULCO) s'intéresse à la recherche de marqueurs précoces d'altération qui pourraient permettre de caractériser la fraîcheur afin de garantir la qualité, élément essentiel de la sécurité sanitaire des produits aquatiques. Cette thématique a fait l'objet de deux programmes financés, dénommés respectivement Nécroptose (voir page 109) et Altfish (voir page 110). Ces travaux ont été soumis pour publication en juillet 2015 (voir **Annexe 2** page 183). Cette thématique est menée parallèlement et en complémentarité au sein de l'équipe PCPPA de l'Anses ([Dehaut et al., \(2014\)](#), [Dehaut et al., \(2016\)](#)). De plus, l'équipe développe des travaux liés à la différenciation des filets de poisson frais de filets de poisson décongelés ([Ethuin et al., \(2015\)](#)), également en lien avec l'équipe PCPPA (voir **Annexe 1** page 173). L'ensemble des travaux en lien avec cette thématique est développé au sein du paragraphe intitulé « Marqueurs d'altération et de différenciation frais/décongelé » page 45. Enfin, le troisième axe développé au sein de cette thématique concerne la recherche de procédés plus propres et plus durables. Ce sujet vient de faire l'objet d'un financement (voir projet RESASC page 109) et concerne la recherche de molécules naturelles qui pourraient se substituer aux sulfites utilisés lors de la cuisson des crevettes pour prévenir du brunissement enzymatique ou mélanose. Un post-doctorant, Cédric LE BRIS, a travaillé sur cette thématique de janvier 2014 à juin 2015 et les résultats qu'il a obtenus ont été publiés en ligne en décembre 2015 ([Le Bris et al., \(2016\)](#)) (voir **Annexe 3** page 211). Ces travaux s'appuient d'une part sur un partenariat au sein de l'Institut Charles VIOLLETTE avec l'équipe ProBioGem *via* Benoît CUDENNEC, Djamel DRIDER et Pascal DHULSTER et d'autre part sur l'Anses avec l'unité de Physico-Chimie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture *via* Guillaume DUFLOS et Estelle ZEYER. L'ensemble des travaux s'y rapportant est décrit au sein du paragraphe intitulé « La mélanose et substitution de sulfites dans le process de cuisson des crevettes » page 62. Cette collaboration témoigne de la synergie induite par la création de l'Institut régional agroalimentaire.

*ii. Deuxième thématique : étude de flores utiles et pathogènes**α. Isochrysis galbana*

Dans le cadre du développement de l'aquaculture, les copépodes, de petits crustacés planctoniques, sont utilisés comme proies vivantes alternatives pour alimenter les larves de poissons. La maîtrise de la culture de chaque espèce de copépode exige une combinaison spécifique de micro-algues. L'étude biochimique de ces micro-algues permet d'une part de travailler sur leurs qualités nutritives dans le cadre de l'aquaculture et d'autre part de déterminer d'éventuelles sources de composés biologiques actifs ou de compléments alimentaires. Les travaux réalisés sur ce thème par l'unité BPA (QSA ULCO) en partenariat avec l'équipe de Sami SOUISSI du laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG), UMR 8187 CNRS Lille ULCO et avec le Professeur USOV, directeur du Laboratoire des Polysaccharides des Algues de l'Institut ZELINSKI de Chimie Organique, Académie des Sciences de MOSCOU ont porté sur l'étude de polysaccharides à activité biologique potentielle, extraits d'*Isochrysis galbana* ([Sadovskaya et al., \(2014\)](#), voir **Annexe 4** page 221). L'ensemble des travaux en lien avec cette thématique est développé au sein du paragraphe intitulé « Flore utile » page 103.

β. Autres flores utiles

Les travaux menés au sein de l'unité ont également porté sur *Lactobacillus helveticus* d'une part et sur *Lactococcus lactis* d'autre part, deux bactéries lactiques traditionnellement utilisées dans la fabrication des laits fermentés ou des fromages. Concernant *Lactobacillus helveticus*, les travaux ont été menés en partenariat avec Sylvie LORTAL et Florence VALENCE du laboratoire Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1253 INRA/Agrocampus Ouest. Concernant *Lactococcus lactis*, les travaux ont été menés en partenariat avec Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER, de l'Institut MICALIS (Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé), UMR associant l'INRA et AgroParisTech, Christian CABBILLAU de l'UMR CNRS 6098 Architectures et Fonction des Macromolécules Biologiques à Marseille et Douwe van SINDEREN, directeur du département de microbiologie de l'université de Cork en Irlande.

Concernant *Lactobacillus helveticus*, le travail a consisté à caractériser les polysaccharides de la paroi de souches qui possédaient des propriétés autolytiques différentes. L'autolyse étant provoquée par l'hydrolyse enzymatique

du peptidoglycane de la paroi, la régulation de cette autolyse dépend probablement de la structure d'exopolysaccharides de la paroi, différents du peptidoglycane. Les travaux menés ont permis d'identifier la structure de trois exopolysaccharides de la paroi provenant de six souches présentant des activités autolytiques différentes ([Vinogradov et al., \(2013\)](#)).

Concernant *Lactococcus lactis*, les travaux ont consisté à purifier un polysaccharide acide de la paroi d'une souche qui présente une structure différente de celles précédemment décrites. Ces travaux ont permis de contribuer à la compréhension des mécanismes de reconnaissance entre les lactophages et les récepteurs polysaccharidiques spécifiques localisés à la surface de la paroi de leurs bactéries hôtes ([Ainsworth et al., \(2014\)](#)).

χ. Flores pathogènes

La recherche concerne les biofilms formés par des *Vibrio* pathogènes dans les produits de la mer et dans les prélèvements environnementaux et le risque sanitaire qui y est lié. Les travaux menés ont porté sur la caractérisation structurale d'un polysaccharide produit dans la matrice extracellulaire par *Vibrio cholerae*. Nous avons isolé et caractérisé une partie de ce polysaccharide dénommé VPS (*Vibrio* polysaccharide) ([Yildiz et al., \(2014\)](#)).

Les travaux menés actuellement portent sur l'utilisation de la PCR en temps réel, pour une détection beaucoup plus rapide des *Vibrio* en tenant compte des bactéries viables non cultivables (BVNC) dans le cadre du projet Survib financé par FranceAgrimer (voir page 110).

Une revue générale sur les *vibrio* en lien avec les produits aquatiques, écrite par Maryse BONNIN *et al.*, est en préparation actuellement avec comme objectif de la soumettre au printemps 2016. Cette thématique fait l'objet du montage d'un projet de thèse pour 2016 ainsi que du montage d'un projet FUI avec des partenaires industriels (voir page 121).

iii. Troisième thématique : authenticité des produits aquatiques

Les travaux portent actuellement sur le développement d'une méthode d'identification et de quantification des espèces de thon par PCR en temps réel dans l'optique de répondre aux questions posées par les industriels de la filière représentés au sein de la CITPPM (Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes et de l'aquaculture), concernant la

problématique liée aux fraudes. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre de l'obtention du projet FUI « IDThon » en 2013. Daline BOJOLLY, doctorante, a pour but de soumettre son premier article au printemps 2016 (voir **Annexe 5** page 233). L'ensemble des travaux en lien avec cette thématique est développé au sein du paragraphe intitulé « Halioauthenticité » page 83.

iv. Conclusion

L'ensemble de ces trois thématiques, décliné lors des pages précédentes, est synthétisé dans la **Figure 2** page 42, montrant l'interrelation qui existe entre ces différentes problématiques.

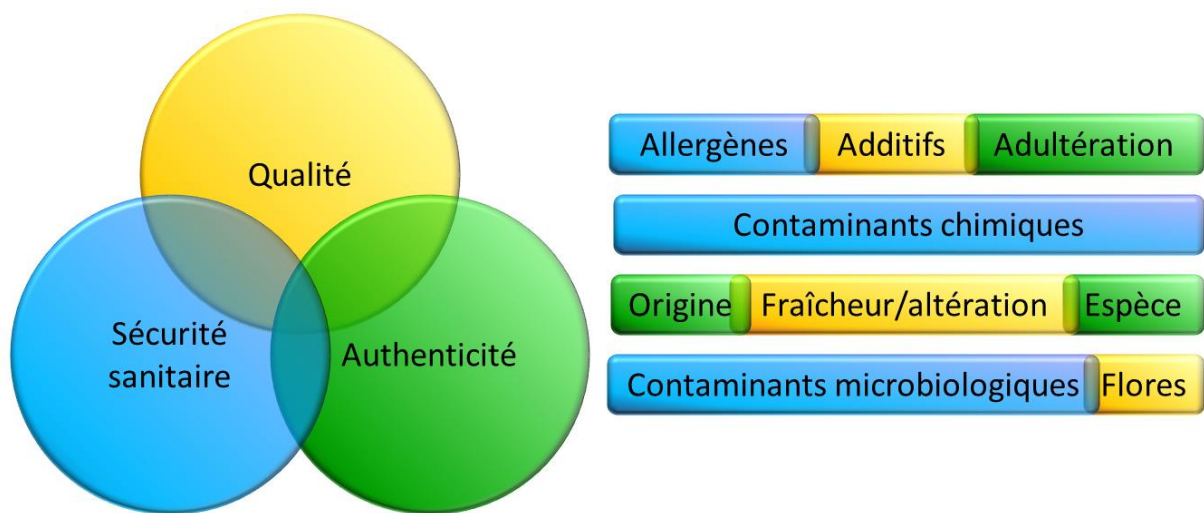


Figure 2 : qualité, sécurité et authenticité des produits aquatiques

Dans le cadre de ce mémoire, je détaillerai successivement les travaux ayant été effectués sur la fraîcheur des produits aquatiques (page 45), leur qualité (page 62), l'halioauthenticité (page 83) et la flore utile (page 103), qui correspondent à autant de thématiques de recherche développées au sein du laboratoire. Puis j'aborderai les projets en évoquant plus particulièrement les perspectives concernant l'altération et la fraîcheur (page 115), la thématique « vibriose » (page 121) et le projet transversal concernant l'analyse de cycle de vie des produits aquatiques (page 130).

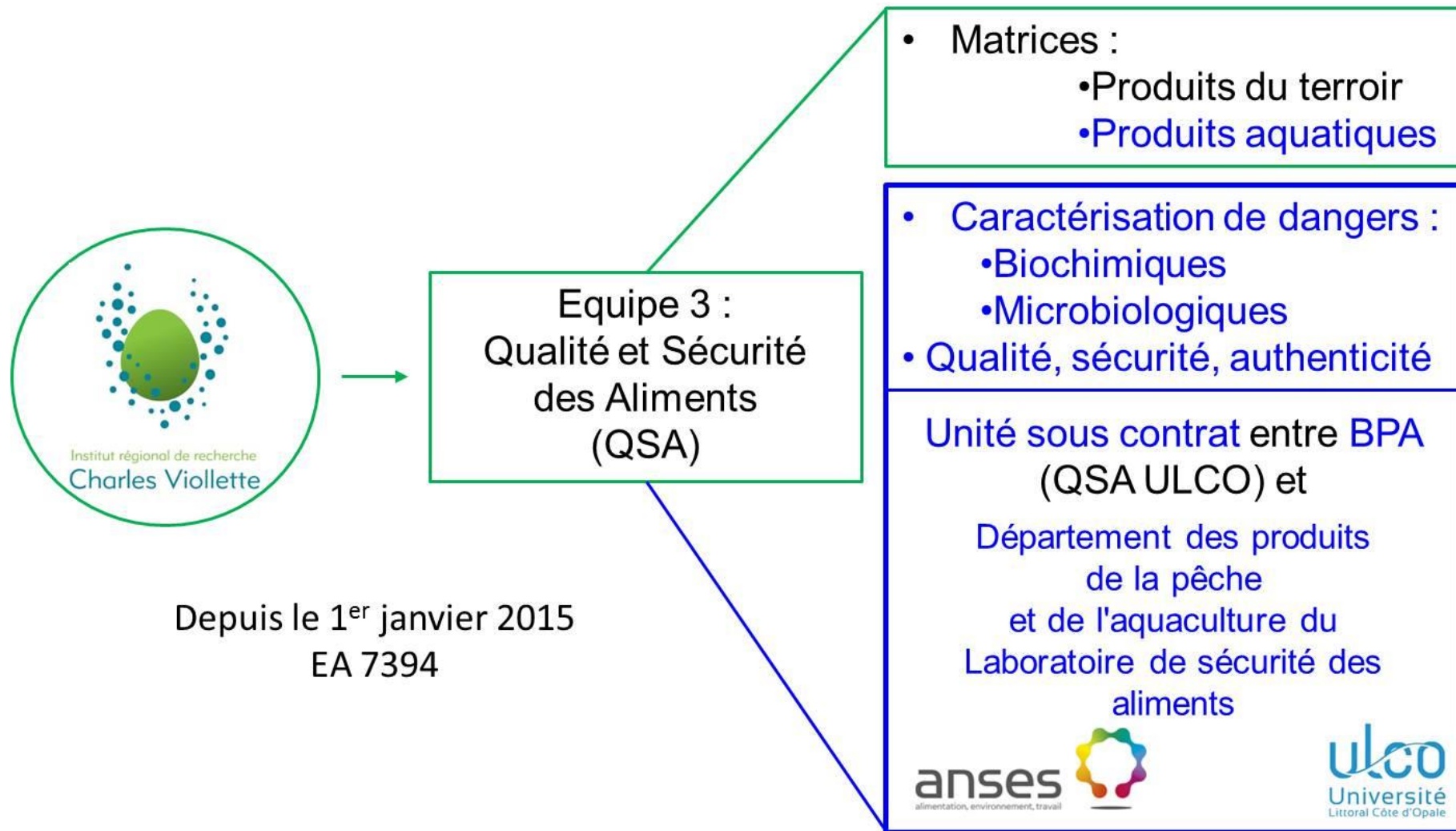


Figure 3 : positionnement de l'unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA : QSA ULCO) au sein de l'Institut régional de recherche agroalimentaire dans le Nord Pas de Calais dénommé Charles VIOLLETTE

Unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA), USC Anses-ULCO
Equipe Qualité et Sécurité des Aliments (QSA ULCO) de l'Institut Charles VIOLLETTE

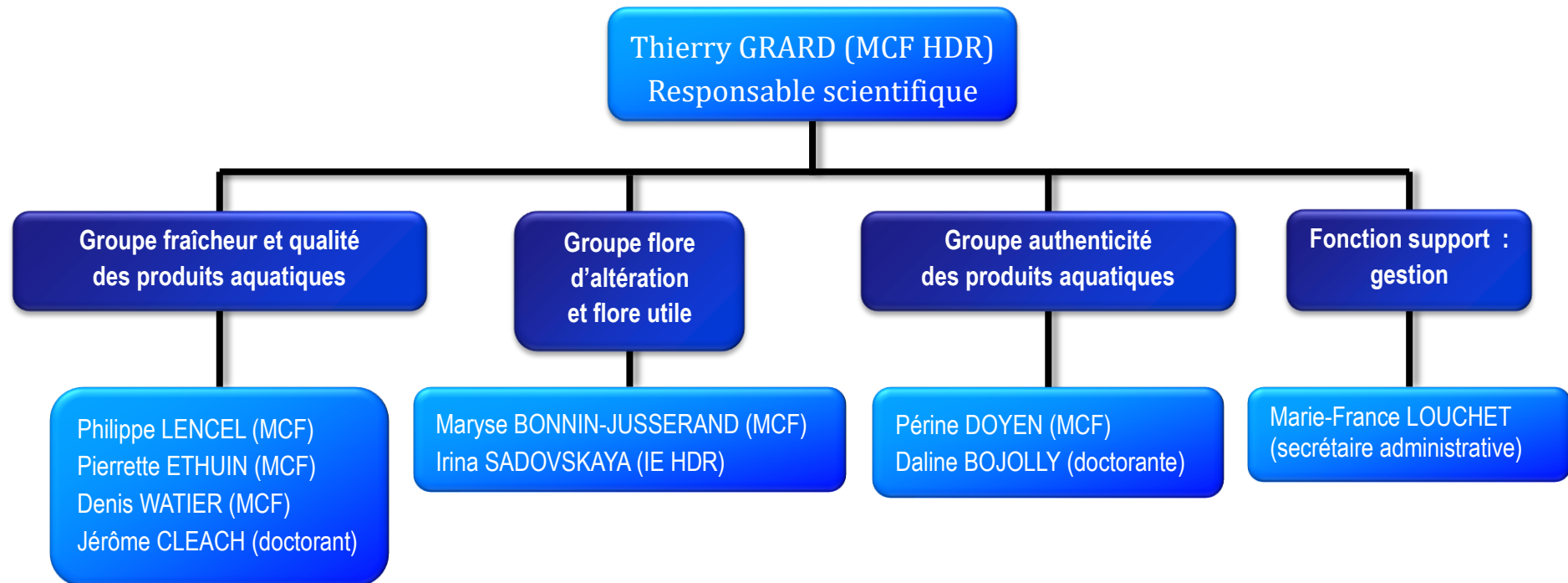


Figure 4 : organigramme fonctionnel de l'unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA : QSA ULCO)

II. Fraîcheur des produits aquatiques

A. Marqueurs d'altération et de différenciation frais/décongelé

1. Contexte et état de l'art

De par sa faible teneur en acides gras saturés, en glucides et en cholestérol et de par sa teneur élevée en vitamines, minéraux, acides gras polyinsaturés et protéines, le poisson constitue une source nutritionnelle à haute valeur ajoutée pour l'ensemble de la population mondiale ([FAO, \(2014\)](#)). La production mondiale des pêcheries et de l'aquaculture représentait 158 millions de tonnes de poissons et autres espèces marines en 2012 dont plus de 136 millions de tonnes ont été consacrées à l'alimentation humaine ([FAO, \(2014\)](#)). La consommation en France de produits aquatiques (poissons d'une part et coquillages, crustacés, et céphalopodes d'autre part) progresse constamment et elle est passée de 28,7 kg/an/habitant (en équivalent poids vif) en 1998 à 33,5 kg/an/habitant en 2014 après avoir atteint un pic de 36,5 kg/an/habitant en 2011 ([FranceAgrimer, \(2015\)](#)).

Cette progression est surtout due à une augmentation de la consommation de produits frais préemballés et de produits traiteurs réfrigérés (produits salés/séchés/fumés, surimi, crevettes cuites du jour, autres produits traiteurs réfrigérés). En 2014, la quantité de poisson frais achetée par les ménages, sous forme entière ou découpée, représentait 246 622 tonnes auxquelles s'ajoutaient 15 582 tonnes de crustacés frais et 81 948 tonnes de coquillages frais. La part de produits traiteurs réfrigérés était estimée quant à elle 176 974 tonnes quand les produits surgelés comptabilisaient 140 200 tonnes et les conserves 119 148 tonnes (voir Figure 5 page 46). Le développement croissant des transactions de produits aquatiques impose de plus en plus d'exigences de loyauté commerciale, de sécurité et de recherche de pérennisation de la ressource. Depuis plusieurs décennies, l'Europe a mis en place une politique de limitation des captures afin d'éviter la surexploitation des ressources marines. Pour répondre à cette demande alors que les captures baissent, plus de 70 % du poisson consommé en France est importé. 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 ni leur qualité. En

effet, du fait de sa composition en protéines et lipides insaturés ainsi que de sa haute teneur en humidité, le poisson est un aliment fragile et hautement périssable. De ce fait, entre le moment de la capture et celui de sa consommation, des changements drastiques se produisent au sein de sa structure tant en termes de qualité sensorielle que nutritionnelle ([Hernández-Martínez et al., \(2013\)](#)).

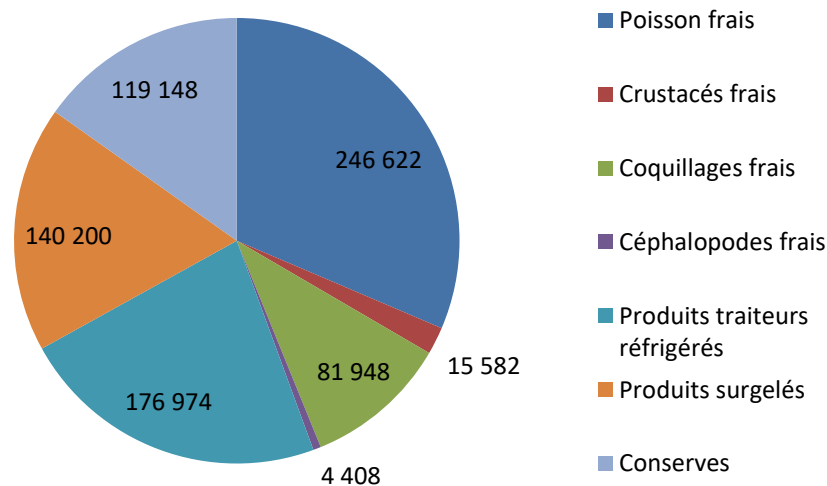


Figure 5 : produits aquatiques achetés par les ménages en France en 2014 en tonnes (source : [FranceAgrimer, \(2015\)](#))

Cette perte de qualité dépend principalement de l'espèce et des conditions de stockage et elle se traduit par un ensemble de mécanismes de détérioration dans lesquels sont impliqués l'altération enzymatique et microbologique, l'oxydation des lipides ou les dommages cellulaires ([Gram et Huss, \(1996\)](#)).

a. Mesure de la fraîcheur ou de l'altération du poisson

Plusieurs approches permettent d'évaluer le niveau de fraîcheur ou d'altération du poisson. Les travaux relatifs à l'appréciation de la fraîcheur et de la qualité du poisson montrent qu'il s'agit de notions complexes à définir et à cerner ([Macagnano et al., \(2005\)](#)). Plusieurs publications ou fascicules résultant de programmes de recherche européens font la synthèse des différentes méthodes analytiques traditionnelles d'évaluation de la fraîcheur du poisson, ([Oehlenschlager et al., \(1997\)](#), [Olafsdóttir et al., \(1997\)](#), [Dalgaard, \(2000\)](#), [Rodríguez-Jérez et al., \(2000\)](#), [Kent et al., \(2004b\)](#), [Olafsdottir et al., \(2004\)](#), [Macagnano et al., \(2005\)](#)).

Elles peuvent être résumées de la façon suivante.

i. Les méthodes sensorielles

Les méthodes sensorielles d'appréciation de l'état de fraîcheur sont des méthodes traditionnelles qui gardent aujourd'hui tout leur intérêt. Toutefois, ces méthodes sont lourdes et coûteuses, en moyens humains notamment. Elles demeurent incontournables puisque toute proposition de critère chimique, microbiologique ou autre, présuppose d'avoir étudié sa corrélation avec des évaluations sensorielles. L'évaluation organoleptique fait l'objet du [Règlement CE 2406, \(1996\)](#). La détermination de l'indice de fraîcheur (*IF*) selon ce règlement s'effectue sur la base d'un examen organoleptique basé sur plusieurs critères (peau, œil, odeur des branchies, mucus, rigidité de la chair). Pour les poissons entiers, ce type d'évaluation de la qualité des produits est bien adapté. C'est également le cas de la méthode QIM (Quality Index Method : évaluation sensorielle du poisson spécifique de l'espèce) développée ces dernières années d'après [Bremner, \(1985\)](#). Bien que cette méthode d'appréciation ait été optimisée pour les poissons entiers ([Hyldig et al., \(2007\)](#)), elle n'est pas adaptée à la mesure de la fraîcheur des filets de poissons ([Sant'Ana et al., \(2011\)](#)).

Concernant les filets, seuls deux critères peuvent être utilisés pour l'examen organoleptique (*odeur du filet, texture de la chair*). Dans ce cas, il est aussi possible d'utiliser un autre indice. Il s'agit de l'indice d'altération (*IA*), barème de cotation français établi par [Soudan et al., \(1957\)](#) dans lequel l'examen des filets est un peu plus complet.

Dans la mesure où, d'une part, l'évaluation organoleptique n'est pas toujours applicable dans son intégralité (*notamment dans le cas des filets*), et d'autre part sa mise en œuvre demande des moyens importants, des compétences spécifiques et une grande rigueur, la nécessité de disposer de méthodes objectives d'analyse s'est imposée progressivement.

ii. Les méthodes microbiologiques

Les critères microbiologiques réglementaires dans les produits aquatiques sont aujourd'hui définis par le [Règlement CE 2073, \(2005\)](#). Deux catégories de critères sont définies : des critères de sécurité (*E. coli*, Salmonelles et *Listeria monocytogenes* pour certaines catégories de produits), et des critères d'hygiène des procédés (*E. coli* et *Staphylococcus aureus* dans les produits décortiqués et décoquillés de crustacés et mollusques cuits).

La diversité des microflores des poissons ne permet pas de disposer de critères microbiologiques d'évaluation de l'altération fiables, mais les déterminations microbiologiques ([Shewan, \(1977\)](#)) ne peuvent être négligées compte tenu des limites actuelles des méthodes sensorielles et des méthodes chimiques. Par ailleurs, il faut aussi souligner que le délai d'obtention des résultats est souvent trop long pour permettre une discrimination rapide des marchandises.

L'analyse de la flore totale comme critère de l'altération des produits est encore couramment employée. De nombreux travaux ont par ailleurs été réalisés pour optimiser les dénombrements de bactéries impliquées dans l'altération. L'une des approches microbiologiques consiste à rechercher les bactéries productrices de sulfure d'hydrogène (H₂S) présentes en quantité importante dans la flore d'altération ([Malle et al., \(1998\)](#)). Les souches bactériennes productrices d'H₂S sont majoritairement constituées de *Shewanella putrefaciens*. Cette bactérie représente 69 % de la flore H₂S au 5^{ème} jour de conservation et 100 % de celle-ci au 15^{ème} jour. Cette approche microbiologique est intéressante puisqu'elle permet de détecter des bactéries réellement impliquées dans le processus d'altération ([Malle et al., \(1998\)](#)). Elle n'a toutefois pas les caractéristiques recherchées dans une méthode de routine.

iii. Les méthodes chimiques et biochimiques

Les méthodes chimiques d'évaluation de la qualité des filets de poissons sont plus objectives que les méthodes sensorielles. La méthode d'analyse chimique qui fait référence et qui est utilisée en routine est constituée du dosage de l'Azote Basique Volatil Total (ABVT) et de la Triméthylamine (TMA) par entraînement à la vapeur ([Billon et al., \(1979\)](#) ; [Malle et Poumeyrol, \(1989\)](#), [Malle et Tao, \(1987\)](#)). Il s'agit d'une méthode de référence ([Règlement CE 2074, \(2005\)](#)). L'intérêt majeur de cette technique est qu'elle est assez rapide et peut être facilement mise en place dans un laboratoire d'analyses. Par contre, ses limites sont importantes dans la mesure où l'ABVT et la TMA évoluent peu pendant les premiers jours de la conservation en réfrigération. Ce sont donc davantage des marqueurs d'altération que des marqueurs de fraîcheur. D'autre part, l'ABVT n'est pas représentatif concernant les poissons gras et les produits transformés.

De ce fait, le dosage de nombreuses autres molécules issues de la dégradation du poisson a été proposé pour fixer des critères permettant de quantifier l'altération

du poisson de manière objective et en particulier le dosage des produits de dégradation de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate), notamment l'inosine et l'hypoxanthine (qui est un produit tardif de dégradation de l'ATP). Le dosage le plus connu est celui de la valeur K ([Saito et al., \(1959\)](#)), qui correspond au ratio de différents produits de dégradation de l'ATP ([Malle et Le Pezenec, \(1992\)](#)). Les tests bandelette basés sur le dosage du facteur K qui avaient été développés il y a plusieurs années, auraient pu se révéler très intéressants (méthodes rapides, non destructives). Ils étaient utilisés sur le saumon car le dosage de l'ABVT ne fonctionne pas sur cette espèce mais en raison de leur grande imprécision, ils ne sont aujourd'hui pratiquement plus utilisés ni commercialisés.

iv. Les autres méthodes

Les travaux plus récents ont porté sur l'utilisation de la spectroscopie visible, proche et moyen infrarouge ([Nilsen et Esaiassen, \(2005\)](#), [Karoui et al., \(2007\)](#)), la mesure des propriétés électriques et diélectriques ([Lougovois et al., \(2003\)](#), [Kent et al., \(2004a\)](#)), l'utilisation de semi-conducteurs d'oxyde de métal ([Hammond et al., \(2002\)](#)), la mesure instrumentale de la couleur ([Schubring, \(1999\)](#)), la détermination des composés volatils ([Bene et al., \(2001\)](#) ; [Prost et al., \(2003\)](#) ; [Duflos et al., \(2006\)](#) ; [Chan et al., \(2006\)](#) ; [Duflos et al., \(2010\)](#)), le dosage des amines biogènes ([Duflos et al., \(1999\)](#) ; [Ruiz-Capillas et Moral, \(2001\)](#) ; [Baixas-Nogueras et al., \(2005\)](#) ; [Rezaei et al., \(2007\)](#)), le développement de capteurs colorimétriques basés sur la mesure de l'ABVT ([Pacquit et al., \(2007\)](#)) ou de capteurs olfactifs à gaz aussi appelés nez électroniques ([Olafsdóttir et al., \(1997\)](#) ; [O'Connell et al., \(2001\)](#) ; [Olafsdottir et Tohill, \(2003\)](#) ; [Kaneki et al., \(2003\)](#) ; [Chantarachoti et al., \(2006\)](#) ; [Tian et al., \(2011\)](#)), le développement de méthodes PCR ([Duflos et al., \(2002a\)](#)), le développement d'outils dans le domaine de la microbiologie prévisionnelle ([Dalgaard et al., \(2002\)](#)), le développement de tableaux de cotation QIM pour de nombreuses espèces de poissons ([Luten et Martinsdottir, \(1997\)](#) ; [Warm et al., \(1998\)](#) ; [Sveinsdottir et al., \(2003\)](#) ; [Bonilla et al., \(2007\)](#)), des approches multivariées ([Kent et al., \(2004b\)](#) ; [Kent et al., \(2004c\)](#) ; [Olafsdottir et al., \(2004\)](#) ; [Raatikainen et al., \(2005\)](#)) ou la spectroscopie de fluorescence frontale ([Dufour et al., \(2003\)](#)). L'ensemble de ces différentes méthodes physicochimiques, sensorielles ou électriques utilisées pour l'évaluation

de la fraîcheur et de l'authenticité des poissons et autres produits de la mer ont fait l'objet d'une revue générale publiée en 2015 ([Hassoun et Karoui, \(2015\)](#)).

b. Etudes sur la différenciation frais/décongelé

Les recherches sur la distinction entre le poisson frais et le poisson ayant subi une congélation/décongélation ont pour but de permettre d'éviter les pratiques frauduleuses consistant à vendre du poisson décongelé (meilleur marché) pour du poisson frais (valorisable à un meilleur prix). Cette problématique touche plus particulièrement les industriels de la pêche française qui se caractérise essentiellement par une pêche dite fraîche ([FranceAgrimer, \(2015\)](#)).

L'une des approches les plus anciennes pour différencier un poisson frais d'un poisson congelé a consisté à mettre en œuvre les propriétés électriques de la chair du poisson. Elles sont en effet supposées être différentes entre les états frais ou décongelé, et ce à l'aide d'un « torrymeter » ([Rehbein et Aust, \(1980\)](#)), [Kim et al., \(1987\)](#)). Mais ces propriétés électriques varient notamment avec la teneur en matière grasse ([Lougovois et al., \(2003\)](#)), celle-ci pouvant varier au sein d'une même espèce selon la saison. Les principales autres méthodes utilisées jusqu'à présent sont basées sur des méthodes enzymatiques ([Garcia de Fernando et al., \(1992\)](#), [Nilsson et Ekstrand, \(1993\)](#)) partant du principe que le phénomène de congélation/décongélation altère de façon irréversible l'intégrité cellulaire permettant ainsi au contenu intracellulaire de se retrouver dans la matrice extracellulaire après décongélation. La mesure d'activités enzymatiques spécifiques de différents compartiments subcellulaires (tels que le lysosome), et décelées dans la matrice extracellulaire, ont été utilisées comme indicateurs d'une lyse cellulaire due à la congélation/décongélation. Sur le même principe, d'autres méthodes physiques ou chimiques ont ensuite été testées basées respectivement sur l'imagerie de résonance magnétique ([Nott et al., \(1999\)](#)), la mesure des propriétés électriques et diélectriques ([Heia et al., \(2003\)](#)), la spectroscopie de fluorescence ([Karoui et al., \(2006\)](#)), la spectroscopie visible et proche ou moyen infrarouge ([Bechmann et Jørgensen, \(1998\)](#), [Bøknæs et al., \(2002\)](#), [Heia et al., \(2003\)](#), [Karoui et al., \(2007\)](#), [Sivertsen et al., \(2011\)](#)), l'étude de composés volatils ([Iglesias et al., \(2009\)](#), [Leduc et al., \(2012\)](#)), l'opportunité de l'application du test de la comète ou micro-électrophorèse de cellules isolées ([Le Grandois et al., \(2013\)](#)) sans compter les auteurs qui ont comparé différentes

méthodes entre elles telles que le torrymeter (méthode physique), l'étude du cristallin de l'œil (examen physiologique) avec des études enzymatiques ([Duflos et al., \(2002b\)](#)).

Même si la plupart de ces technologies donnent lieu à quelques applications intéressantes dans certaines filières agro-alimentaires, elles sont souvent encore loin d'être opérationnelles dans le secteur des produits aquatiques.

c. Conclusion

Les méthodes de mesure objective de la fraîcheur du poisson restent assez limitées. La plupart des méthodes développées à ce jour continuent de se heurter à des contraintes techniques ou économiques, à la spécificité des produits analysés, la complexité de la méthode, le délai d'obtention des résultats ou encore le coût de développement des dispositifs. Le besoin d'une mesure objective et fiable de la chair de poisson reste prédominant pour l'ensemble de la filière. Cette remarque a d'autant plus de poids si l'on considère la tendance actuelle des producteurs à fileter les poissons au plus tôt, ce qui tend à limiter les possibilités d'évaluation sensorielle par l'indice de fraîcheur (IF) sur poisson entier ([Règlement CE 2406, \(1996\)](#)).

Dans ce contexte d'augmentation de la consommation des produits aquatiques en France, et dans un souci de valoriser les produits de la pêche française qui se caractérise avant tout par une pêche dite fraîche, le développement d'outils analytiques permettant d'évaluer l'état de fraîcheur du poisson, et donc en particulier des filets, est nécessaire.

Les professionnels de la filière de pêche française sont en effet demandeurs de méthodes simples et rapides permettant de garantir et de prouver la qualité de leurs produits pour leur permettre de se démarquer de certains produits d'import. L'agrégé de filets de poissons frais est aujourd'hui le plus souvent réalisé de manière empirique (sensorielle), et l'évaluation de la fraîcheur de filets de poissons ou la différenciation frais/décongelé représente une difficulté pour de nombreuses personnes, qui ne pratiquent pas ce type d'expertise au quotidien. La possibilité de pouvoir disposer de méthodes objectives et rapides serait très utile pour les opérateurs de la filière.

Par ailleurs, les sociétés spécialisées dans l'importation de produits aquatiques ainsi que de nombreux transformateurs français (fabricants de produits panés

surgelés, importateurs de thons...) sont aussi très demandeurs de méthodes d'évaluation de la fraîcheur ou de la différenciation frais/décongelé, rapides et fiables, pour mieux contrôler la qualité des matières premières qu'ils importent (en particulier les filets ou les longes).

Le programme proposé ici s'inscrit dans cette logique.

2. Contribution au domaine

a. Travaux sur la fraîcheur et l'altération

La lactate déshydrogénase est une enzyme cytosolique dont la dénaturation est extrêmement dépendante du contexte tissulaire ou cellulaire dans lequel elle se situe ([Göller et A. Galinski, \(1999\)](#)). De ce fait, cette enzyme peut également être étudiée en tant qu'indicateur d'altération des filets de poisson.

Pour mener à bien cette étude, d'un point de vue méthodologique, nous avons étudié l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase en travaillant sur deux modèles en parallèle, de la même façon que pour la thématique frais/décongelé développée ultérieurement page 58 : l'un cellulaire basé sur une lignée fibroblastique de daurade royale (*Sparus aurata*) SAF-1, l'autre basé sur les filets de daurade royale provenant de l'entreprise Aquanord à Gravelines.

i. Altération cellulaire

Nous avons étudié la LDH en tant qu'indicateur d'altération des filets de poisson. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur l'altération cellulaire en travaillant sur la lignée cellulaire SAF-1. La perméabilisation des membranes a été mesurée par la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) ([Lobner, \(2000\)](#)).

Nous avons pu appréhender, grâce aux cellules fibroblastiques de daurade royale (SAF-1), la cinétique de perméabilisation des cellules et la libération de leur contenu intra-cytoplasmique dans un contexte d'altération. La lyse cellulaire est régulière sur une période de 8 jours et la libération de l'enzyme cytosolique (LDH) est inversement proportionnelle au nombre de cellules viables (voir Figure 6 page 53). L'accumulation de la LDH dans le milieu extracellulaire semble donc être un indicateur fiable du niveau de lyse et de l'altération des cellules SAF-1.

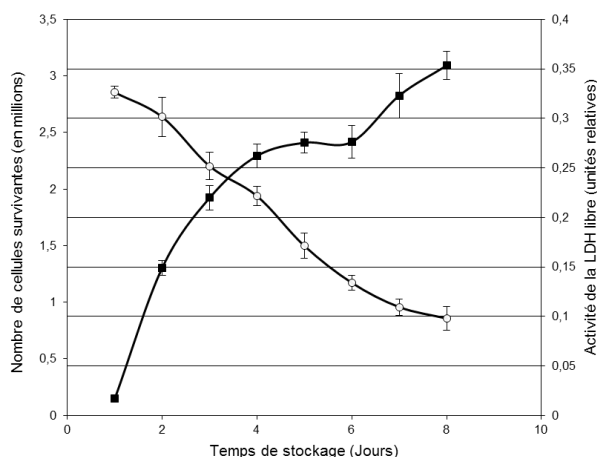


Figure 6 : cinétique de la lyse des cellules fibroblastiques SAF-1 au regard de la libération de la lactate déshydrogénase cytosolique dans le milieu extracellulaire au cours du temps.

L'expérience a été menée dans le tampon PBS à 4 °C. Les barres indiquent les déviations standards effectuées sur 7 essais. Les cercles blancs représentent le nombre de cellules SAF-1 survivantes. Les carrés noirs représentent l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase libérée dans le milieu extracellulaire

ii. Altération sur les filets de daurade

De la même façon que pour la ligne cellulaire SAF-1, nous avons utilisé la lactate déshydrogénase (LDH) comme marqueur enzymatique de l'altération des filets de daurade (*Sparus aurata*).

L'autolyse du filet a été mesurée par la libération de la LDH dans le temps. Pour s'affranchir de la différence de concentration de la LDH dans le tissu, un ratio a été calculé (quantité de LDH libérée/LDH totale du tissu). La quantité de LDH libérée augmente au cours du temps. On peut distinguer trois zones : une première zone (zone 1 correspondant à un filet ultra frais) avec un taux faible de LDH libéré pour un entreposage court (2 jours) ; une deuxième zone (zone 2 correspondant à un filet frais) avec une libération de LDH plus importante pour des temps de conservation à 4°C variant de 3 à 6 jours ; une troisième zone (zone 3 correspondant à un filet dans un état avancé) avec un niveau de libération de la LDH élevé pour un temps de conservation supérieur à 6 jours (voir **Figure 7** page 54).

Les résultats obtenus indiquent que les mécanismes liés à l'autolyse cellulaire peuvent être utilisés afin de mesurer la fraîcheur ou l'altération des filets de daurade. La LDH peut donc être utilisée comme marqueur enzymatique de l'altération d'un filet de poisson.

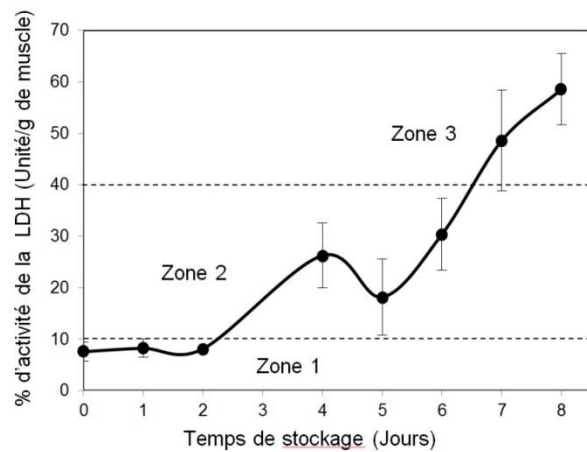


Figure 7 : mesure de la lyse cellulaire dans un filet de daurade par la libération de la lactate déshydrogénase
Trois zones ont été délimitées correspondant à des états de fraîcheur différents.
Zone 1 : ultra frais ; zone 2 : frais ; zone 3 : avancé

a. Travaux sur la différenciation frais/décongelé

i. Préambule

Ces travaux ont bénéficié de deux financements successifs :

- le financement Arcir obtenu en 2009 (voir page 34) qui portait sur « l'étude de méthodes pour déterminer la fraîcheur (notions d'altération et de différenciation frais/décongelé) des filets de poissons ». Pierrette ETHUIN et moi avons encadré Sylvain MARLARD au cours de sa thèse concernant cette thématique.
- le projet « nécroptose » (voir page 109), projet dénommé émergent et financé par la région Nord Pas de Calais en 2012, qui consistait en l'étude de méthodes pour déterminer la fraîcheur, l'altération et la différenciation frais/décongelé des filets de poissons selon une approche biochimique et physiologique de l'altération de la chair de poisson liée au choc congélation/décongélation. Philippe LENCEL, Denis WATIER et moi avons travaillé sur ce sujet.

L'ouverture sur le marché international et l'augmentation des demandes des consommateurs concernant la sûreté sanitaire des aliments imposent aux industriels de garantir la salubrité de leurs produits. Concernant la thématique frais/décongelé, l'[Arrêté du 28 décembre 1992, \(1993\)](#) mentionne qu'un produit à l'état congelé doit être défini comme tel et différencié d'un produit frais. Le [Règlement CE 178, \(2002\)](#) sur la sécurité des aliments institue l'obligation de la traçabilité des denrées alimentaires et de toute autre substance destinée à être

incorporée dans des denrées alimentaires ou des aliments pour animaux. Il est d'autre part nécessaire de garantir l'origine du produit aussi bien sur une matière première que sur un produit transformé. Enfin, le [Règlement UE 1169, \(2011\)](#) dit INCO sur l'information des consommateurs stipule :

- qu'il convient d'informer convenablement le consommateur final de l'état d'un produit qui a été décongelé.
- que la congélation suivie de décongélation de certains produits alimentaires dont les produits de la pêche limite leur possibilité ultérieure d'utilisation et peut avoir un effet sur leur sécurité, leur goût et leur qualité physique.
- que dans le cas des denrées alimentaires qui ont été congelées avant la vente et sont vendues décongelées, la dénomination de la denrée doit être accompagnée de la mention « décongelé »

Les recherches sur la distinction entre des filets de poisson frais et des filets de poisson ayant subi une congélation/décongélation ont pour but de permettre d'éviter les pratiques frauduleuses. Les travaux menés sur ce sujet par l'unité BPA (QSA ULCO) font écho à ce contexte qui a évolué ces dernières années. Les enjeux économiques liés à cette étude sont très importants. Une méthode de différenciation sans équivoque permettrait de distinguer les filets de poissons décongelés vendus sous la dénomination frais, ce qui constitue une fraude (le poisson frais se vendant à un coût beaucoup plus élevé que le même poisson vendu décongelé).

ii. Résultats

α. Approche protéomique

La congélation et la décongélation sont connues pour augmenter la dénaturation et la dégradation des protéines, l'oxydation des lipides et la perte d'exsudat selon [Martinez et Friis, \(2004\)](#). L'approche s'inscrivait d'autre part dans la lignée de travaux précédemment mis en œuvre à l'IFREMER de Nantes ([Verrez - Bagnis et al., \(2001\)](#)) portant sur l'utilisation de l'électrophorèse mono- et bidimensionnelle afin d'identifier des protéines et des peptides spécifiques pouvant être utilisés comme indicateurs de fraîcheur du poisson. C'est pourquoi, nous avons utilisé la protéomique pour cartographier les changements de profils protéiques des muscles de poisson dus à la congélation/décongélation.

Le bar commun, *Dicentrarchus labrax*, a été choisi comme modèle pour cette étude pour plusieurs raisons : il fait partie des espèces débarquées à Boulogne sur Mer et l'existence d'un élevage de bars dans la région (Aquanord, ferme aquacole de Gravelines, France) permet d'obtenir des poissons ultra-frais toute l'année et ainsi de ne pas dépendre des arrivages. La date et l'heure de mort sont précisément connues. Les poissons proviennent des mêmes géniteurs et sont calibrés, minimisant ainsi les fluctuations dues à l'individu.

Partant du principe qu'une congélation suivie d'une décongélation est susceptible de conduire à la lyse de cellules libérant ainsi des protéines issues de cette dégradation cellulaire dans l'exsudat, nous nous sommes focalisés sur ces exsudats extraits de filets frais et de filets décongelés. Cela présentait l'intérêt de faciliter la différenciation entre filets frais et filets décongelés en évitant de s'intéresser à l'ensemble du protéome du muscle de bar.

L'exsudat est constitué du jus de presse extrait de la chair de poisson tel qu'il a été décrit par [Morel, \(1979\)](#). Cet exsudat regroupe les parties solubles du contenu cellulaire récupérées par pression sur le tissu. Concernant cette étude, la préparation de l'exsudat a été optimisée en remplaçant l'effet de la pression par la centrifugation du filet selon [Duflos et al., \(2002b\)](#).

Les études électrophorétiques menées par Mylène GOBERT, étudiante en master 2 recherche en 2007, nous avaient ainsi permis d'identifier deux spots protéiques présents dans les exsudats de filets de bar décongelé et absents dans les exsudats de filets de bar frais (voir **Figure 8** page 57).

Le travail de thèse mené par Sylvain [Marlard, \(2013\)](#) a consisté d'une part à reproduire ces résultats préliminaires et de caractériser la nature des protéines se retrouvant uniquement dans les profils protéiques des exsudats des filets de bar décongelés. Pour ce faire, nous avons procédé à la recherche de ces marqueurs d'altération à différents temps compris entre le jour 0 et le jour 15. Nous avons ainsi pu démontrer que les spots protéiques de la zone d'intérêt n'apparaissaient pas du tout sur les profils électrophorétiques de filets frais conservés entre 0 et 2°C pendant 13 jours. Par contre, ces spots d'intérêt apparaissaient sur les gels provenant de filets décongelés, et ce dès le premier jour de décongélation.

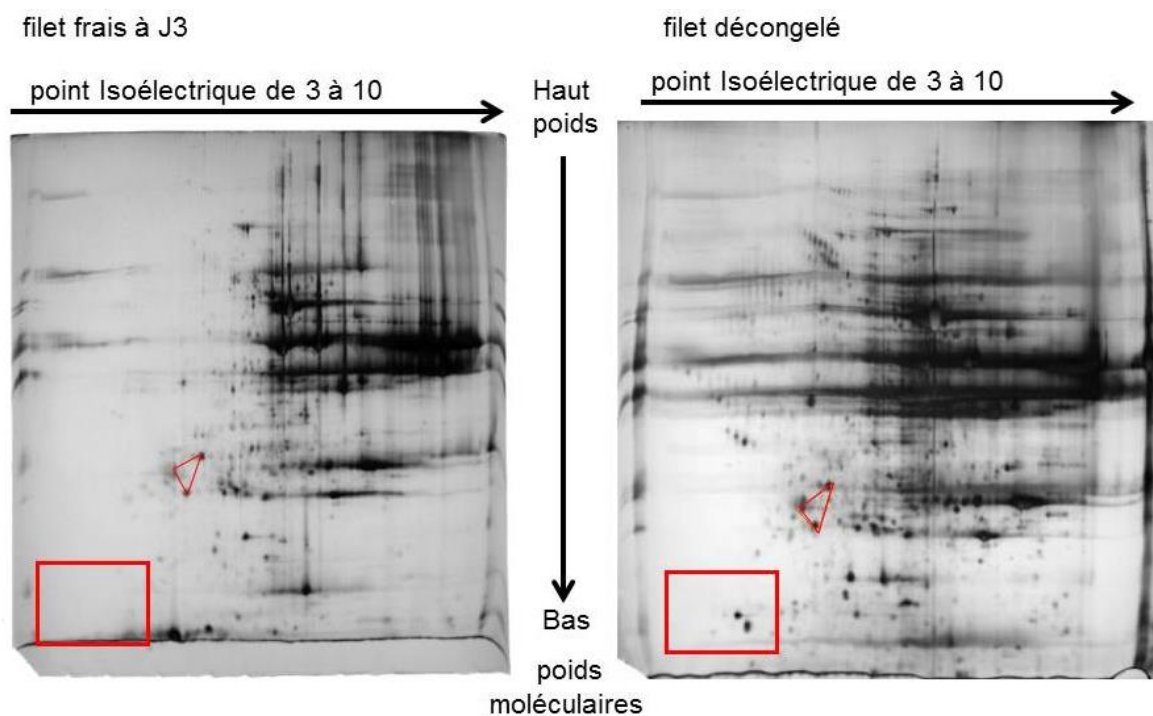


Figure 8 : électrophorèse bidimensionnelle comparative de filets de bar (*Dicentrarchus labrax*) frais vs décongelé

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.

Nous avons parallèlement effectué des dosages des amines biogènes et de l'ABVT utilisés en tant que marqueurs d'altération du poisson. Ces dosages ont révélé un état d'altération des filets frais et décongelés à compter du 9^{ème} jour. A cette date, l'état d'altération avancée des différents filets ne correspondait plus aux critères de fraîcheur attendus. Les gels d'électrophorèse bidimensionnelle ont ainsi permis de différencier des filets frais de filets décongelés, dès lors qu'ils étaient conservés entre 0 et 9 jours.

L'analyse des spots protéiques d'intérêt a été effectuée au sein du laboratoire d'Alain VAN DORSSELAER (Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7178), ce qui a permis d'identifier les deux spots comme étant constitués de la parvalbumine (voir **Tableau II** page 58).

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés sous la forme de l'article publié dans « Food Chemistry » en 2015 dans l'**Annexe 1** page 173. Il en résulte que la parvalbumine, allergène principal du poisson, pourrait être utilisée en tant que marqueur spécifique de différenciation de filets de poisson frais/décongelés.

Tableau II : résultats d'identification des spots protéiques du bar par analyse en LC-MS/MS et comparaison à des séquences spécifiques à certaines espèces et présentes dans les bases de données

Spot	Nom de la protéine	Numéro d'accèsion de la protéine	Poids moléculaire (kDa)	Nombre de peptides	Séquences peptidiques identifiées par MS/MS
Spot 1	Parvalbumine alpha (<i>Cyprinus carpio</i>)*	P09227	11 444	2	LFLQNFSAGAR - SGFIEEDELK
	Parvalbumine beta-2 (<i>Cyprinus carpio</i> **)	P02618	11 429	2	AFAIIDQDK - SGFIEEDELK
Spot 2	Parvalbumine alpha (<i>Cyprinus carpio</i>)*	P09227	11 444	2	LFLQNFSAGAR - SGFIEEDELK
	Parvalbumine beta-2 (<i>Cyprinus carpio</i> **)	P02618	11 429	2	AFAIIDQDK - SGFIEEDELK

* et **: liste des protéines identifiées par leur séquence peptidique :

* Parvalbumine (*Boreogadus saida*) tr|C0LEL4; Parvalbumine beta-1 (*Cyprinus carpio*) tr|E0WD92; Parvalbumine 4 (*Siniperca chuatsi*) tr|D2KQG3; Parvalbumine (Fragment) (*Hypomesus transpacificus*) tr|C3UVG3; Parvalbumine (*Thunnus albacares*) tr|C6GKU3; Parvalbumine 3 (*Danio rerio*) tr|Q7ZT36; Parvalbumine 1 (*Carassius auratus*) tr|G8GWA2; Parvalbumine (*Cyprinus carpio*) tr|Q8UUS3; Parvalbumine-2 (*Danio rerio*) sp|Q9I8V0; Parvalbumine (*Siniperca chuatsi*) tr|B9VJM3; Parvalbumine beta 3 (Fragments) (*Macruronus magellanicus*) sp|P86740; Parvalbumine beta 3 (Fragments) (*Macruronus novaezelandiae*) sp|P86742; Parvalbumine (*Fundulus heteroclitus*) tr|C0LEL6; Parvalbumine (*Fundulus grandis*) tr|C0LEL8; Parvalbumine-2 (*Ictalurus punctatus*) tr|E3TGD0

** Parvalbumine (*Micropterus salmoides*) tr|C0LEL5; Parvalbumine beta-2 (*Cyprinus carpio*) tr|E0WD93; Parvalbumine 1 (Fragment) (*Gillichthys mirabilis*) tr|C1J0K6; Parvalbumine 1 (Fragment) (*Gillichthys seta*) tr|C1J0K7; Parvalbumine 2 (*Siniperca chuatsi*) tr|D2KQG1; Parvalbumine beta (*Ictalurus furcatus*) tr|E3TBW7; Parvalbumine (*Hypophthalmichthys nobilis*) tr|B5TTU7; Parvalbumine (*Hypophthalmichthys molitrix*) tr|B6UV98; Parvalbumine 1 (*Kryptolebias marmoratus*) tr|Q6B4H8; Parvalbumine (*Cyprinus carpio*) tr|Q8UUS2; Beta-Parvalbumine (*Xiphias gladius*) tr|B9W4C2; Parvalbumine 4 (*Hypophthalmichthys molitrix*) tr|R9R015; Parvalbumine (fragment) (*Ictalurus punctatus*) tr|Q804Z0

β. Approche enzymatique

La congélation des filets de poisson agit sur les cellules en provoquant la rupture de leur membrane plasmique et de leurs membranes intracellulaires. Ces différentes altérations cellulaires se caractérisent par le relargage d'enzymes intracellulaires dans la matrice extracellulaire ([Duflos et al., \(2002b\)](#)), ce qui permet de mesurer leur activité enzymatique dans l'exsudat. De ce fait, de nombreux travaux ont porté sur la recherche d'enzymes dans les exsudats tissulaires telles que des enzymes lysosomiques (l' α -D-glucosidase et la β -N-acétylglucosaminidase ([Rehbein et al., \(1978\)](#)), la phosphatase acide, la β -D-galactosidase et la β -D-glucuronidase ([Rehbein, \(1979\)](#))) ou mitochondriales (la β -hydroxyacyl-coA déshydrogénase ou HADH ([Fernandez, \(1999\)](#)), l'enzyme malique ([Gould et Medler, \(1970\)](#)), la glutamate oxalo-acétate transaminase ([Salfi et al., \(1985\)](#))).

La lactate déshydrogénase (LDH) est très sensible à la congélation/décongélation ([Seguro et al., \(1989\)](#) ; [Nambudiri et Gopakumar, \(1992\)](#) ; [Robles et al., \(2004\)](#) ;

[Aramli et al., \(2014\)](#)). Cette caractéristique en fait une candidate idéale pour son étude en tant que marqueur de différenciation frais/décongelé.

Nous avons étudié l'impact du choc congélation/décongélation sur la libération de la LDH dans le milieu extracellulaire afin de comparer les taux de LDH libérés par congélation avec ceux libérés suite à l'autolyse. En effet, la LDH est une enzyme cytosolique libérée par congélation mais qui est sensible à cette congélation. Afin de mieux comprendre l'effet de la congélation et l'influence de l'environnement cellulaire sur la perte d'activité LDH, nous avons travaillé à la fois sur une lignée cellulaire fibroblastique (SAF-1) de daurade (*Sparus aurata*) mais aussi sur des filets de daurade.

Nous avons ainsi montré que la sensibilité de la LDH à la congélation était extrêmement liée à l'environnement de cette enzyme selon qu'il soit cellulaire (SAF-1) ou tissulaire (filets de daurade). L'analyse effectuée sur la LDH libérée dans le milieu extracellulaire et provenant de cellules SAF-1, suite à la congélation/décongélation, montre qu'elle est totalement dénaturée. Par contre, la LDH ne perd que 85 % de son activité quand elle est issue de cellules congelées en suspension. Si les cellules SAF-1 sont culotées avant la congélation, une fraction importante de la LDH reste insensible au phénomène de congélation/décongélation (perte d'environ 50 % de l'activité). Dans les muscles (filets de daurade), la LDH ne perd que 20 % de son activité dans ces mêmes dernières conditions. Le degré de dénaturation de la LDH après congélation est de ce fait fortement dépendant de l'environnement tissulaire ou cellulaire de l'enzyme. [Chen et Cui, \(2006\)](#) et [Göller et A. Galinski, \(1999\)](#) ont démontré que certains sels ou l'utilisation de solutés compatibles pouvaient protéger la LDH de la dénaturation par congélation. De plus, [Nema et Avis, \(1996\)](#) ont montré que la membrane du liposome exerçait un effet protecteur sur l'activité de la LDH.

Il a été clairement démontré que la congélation induisait une lyse de la cellule qui conduisait à une libération des enzymes lysosomiques et cytosoliques dans le milieu extracellulaire ([Benjakul et Bauer, \(2001\)](#)). De ce fait, les résultats que nous avons obtenus montrent que l'activité de la LDH libérée depuis les filets décongelés était plus faible de 20 % que l'activité de la LDH libérée de filets frais (**Figure 9A** page 60). Le choc congélation/décongélation contribue à l'augmentation de la lyse cellulaire et induit une perte de l'activité totale de la

LDH (**Figure 9B** ci-dessous). Cela indique qu'une partie de la LDH libérée est dénaturée. En effet, la LDH la plus exposée à la dénaturation thermique est la LDH libérée.

Afin de confirmer que la perte d'activité de la LDH était due à la congélation et non à la variation de la teneur en LDH en fonction du tissu ou du filet, nous avons étudié en parallèle l'activité d'une autre enzyme intracellulaire : l' α -D-glucosidase lysosomique. Les résultats ont montré que la libération dans le milieu extracellulaire de cette enzyme, qui est insensible à la congélation, était plus importante dans les filets décongelés que dans les filets frais comme cela a été démontré précédemment par [Alberio et al., \(2014\)](#). De ce fait, la mesure de l'activité de la LDH libérée, normalisée en utilisant une autre enzyme intracellulaire telle que l' α -D-glucosidase, pourrait permettre de différencier des filets frais de filets décongelés.

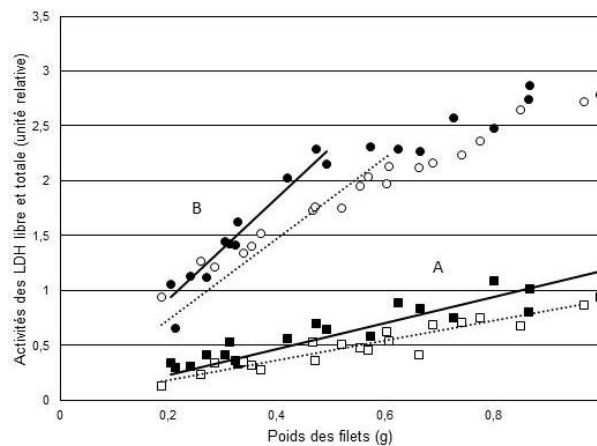


Figure 9 : relations entre l'activité de la LDH et le poids de filet de daurade royale (*Sparus aurata*) avant et après congélation

A : activité de la LDH libre : carrés noirs ($R^2 = 0,78$) : activité de la LDH libre dans les filets frais ; carrés blancs ($R^2 = 0,86$) : activité de la LDH libre dans les filets décongelés. B : activité de la LDH totale : cercles noirs ($R^2 = 0,93$) : activité de la LDH totale dans les filets frais ; cercles blancs ($R^2 = 0,79$) : activité de la LDH totale dans les filets décongelés.

3. Conclusions

Nous avons démontré que la parvalbumine pouvait être un marqueur potentiel de la congélation/décongélation chez le bar. La poursuite des travaux dans ce domaine pourrait s'effectuer par la fabrication d'anticorps spécifiques de parvalbumine de bar préalablement purifiée et le développement de tests ELISA pour obtenir des résultats de différenciation rapides. D'autre part, les récents travaux d'[Abdullah et Rehbein, \(2015\)](#) relatifs à l'authentification de différentes espèces de poisson tels que le tilapia (*Oreochromis niloticus*) et le poisson chat

(*Clarias batrachus*, *Hemibagrus capitulum*, *Pangasius hypopthalmus*), en utilisant la parvalbumine comme protéine discriminante, nous incite à poursuivre dans le domaine. En effet, le travail mené sur cette protéine permettra de mener à bien et en synergie des travaux relatifs aux thématiques fraîcheur/altération et authenticité.

Concernant les études menées sur la LDH, nous avons montré que les mécanismes associés à l'autolyse des cellules peuvent être utilisés pour mesurer la fraîcheur et la qualité des filets de daurade. La rupture de la membrane cytoplasmique au cours de l'altération des filets conduit à la libération du contenu intra-cytoplasmique et en particulier de la LDH. Cette enzyme présente aussi la particularité d'être sensible au phénomène congélation/décongélation. Nos résultats ont montré une perte significative de l'activité de la LDH dans les filets décongelés. L'évaluation de la perte d'activité de la LDH couplée à la mesure de la perte d'activité d'une autre enzyme intracellulaire telle que l' α -D-glucosidase qui est une enzyme insensible au choc congélation/décongélation pourrait constituer un marqueur de différenciation entre filets de poisson frais et filets décongelés.

Ces différents résultats concernant la LDH utilisée en tant que marqueur d'altération ou d'indicateur de poisson frais/décongelé sont présentés dans l'**Annexe 2** page 183 sous la forme de l'article soumis dans « Food Chemistry » en juillet 2015 et en navette pour révision mineure depuis février 2016.

Outre ces travaux, j'ai aussi participé, par mon encadrement, aux résultats obtenus par [Dehaut et al., \(2014\)](#) sur la durée de vie des anchois marinés (*Engraulis encrasicolus*) en étudiant les composés volatils formés au cours du temps et obtenus par [Dehaut et al., \(2016\)](#) sur l'étude de la fraîcheur du poisson suite au développement d'une méthode de PCR quantitative appliquée à du merlan (*Merlangius merlangus*) conservé sous atmosphère modifié.

III. Qualité des produits aquatiques

A. La mélanose et substitution de sulfites dans le process de cuisson des crevettes

1. Contexte

En 2014, la consommation française de crevettes et gambas cuites réfrigérées était estimée à 30 142 tonnes, pour une valeur de 407 068 k€. La consommation des crevettes surgelées, quant à elle, était estimée à 6 351 tonnes (pour une somme dépensée de 101 907 k€). En France, les crevettes cuites représentent en valeur 17,8 % des produits aquatiques commercialisés en traiteur réfrigéré ([FranceAgrimer, \(2015\)](#)).

En 2013, la France a importé 105 553 tonnes de crevettes (pour une valeur de 698 662 k€), dont 87 160 tonnes de crevettes tropicales (*Penaeus*) crues congelées, pour une valeur de 561 847 k€ (voir **Tableau III** page 63). Ces crevettes tropicales proviennent principalement de l'Equateur (30 743 tonnes), d'Inde (12 680 tonnes) et de Madagascar (6 419 tonnes). ([FranceAgrimer, \(2014a\)](#)). Ces crevettes sont systématiquement traitées au métabisulfite de sodium avant d'être congelées et envoyées en France, afin d'éviter le brunissement enzymatique également appelé mélanose.

La mélanose des crevettes est un phénomène qui apparaît *post mortem* après la pêche ou la collecte et se renforce tout au long de la conservation à l'état cru et à l'état cuit. Elle se traduit par un noircissement de la carapace des crustacés (voir **Figure 10** page 69). Bien que cette pigmentation soit sans danger pour le consommateur, elle réduit considérablement la valeur marchande du produit en occasionnant des pertes financières considérables pour les producteurs ([Montero et al., \(2001a\)](#)) ; voir également paragraphe a. La mélanose des crustacés page 68). Les principaux inhibiteurs de mélanose utilisés, afin de limiter cette pigmentation et d'étendre la durée de vie des produits tels que les crevettes et les crustacés surgelés, sont les sulfites. Il s'agit d'additifs (voir **Tableau IV** page 65) qui sont utilisés majoritairement sous la forme du métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Ils empêchent la polymérisation des quinones, intermédiaires réactionnelles du brunissement enzymatique, en se combinant avec elles et permettent ainsi la prévention de l'apparition de la mélanose. De ce fait,

l'utilisation des sulfites, pour la conservation des aliments qui le nécessitent, est très répandue depuis de nombreuses années ([Joslyn et Braverman, \(1954\)](#)). Elle daterait d'ailleurs du traitement du vin par du dioxyde de soufre à l'époque romaine ([Yang et Purchase, \(1985\)](#)). Cependant, l'utilisation des sulfites dans les aliments fait l'objet de nombreuses études vis-à-vis de leur caractère allergène. L'impact des sulfites sur la santé humaine à la fois pour le consommateur et les opérateurs, et plus particulièrement pour la population asthmatique, y est particulièrement souligné ([Dalton-Bunnow, \(1985\)](#), [Bush et al., \(1986\)](#), [Gastaminza et al., \(1995\)](#), [Vally et al., \(2009\)](#), [Pougnnet et al., \(2010\)](#), [Vally et Misso, \(2012\)](#), [Gultekin et Doguc, \(2013\)](#), [Uriarte et al., \(2015\)](#)). Les personnes sensibles aux sulfites présentent des symptômes de type allergique qui se développent rapidement. Ces symptômes peuvent, dans certains cas, atteindre un état sévère allant jusqu'à l'anaphylaxie et conduire à l'inconscience ou à la mort. Par ailleurs, l'utilisation des sulfites est particulièrement dangereuse pour les opérateurs lors du traitement des denrées alimentaires car les vapeurs formées, lorsque les sulfites sont en contact avec l'humidité de l'air, sont toxiques.

Tableau III : import-export des crevettes tropicales (*Penaeus*) en 2013

Produit	Importations			Exportations		
	Origine	Poids (t)	Valeur (k€)	Destination	Poids (t)	Valeur (k€)
Crevette tropicale (<i>Penaeus</i>) congelé	Equateur	30743	169 569	Espagne	2084	14 432
	Inde	12680	78 093	Allemagne	1203	10 654
	Madagascar	6419	65 484	Portugal	1292	10 497
	Bangladesh	5525	35 383	Royaume-Uni	813	9 341
	Venezuela	5852	29 616	Pays-Bas	856	6 164
	Viêt-Nam	3791	28 260	Belgique	589	5 213
	Pays-Bas	2363	18 622	Italie	639	4 792
	Autres	19787	136 820	Autres	926	8 753
	Total	87160	561 847	Total	8402	69 846
Crevette tropicale (<i>Penaeus</i>) non congelé	Pays-Bas	324	3 289	Belgique	255	2 279
	France	134	1 106	Allemagne	91	798
	Espagne	114	831	Royaume-Uni	66	653
	Royaume-Uni	79	452	Luxembourg	63	474
	Danemark	22	251	Pologne	69	463
	Autres	68	1 338	Autres	138	1 221
	Total	741	7 267	Total	682	5 888

Source : [FranceAgrimer, \(2014a\)](#)

En conséquence, la première démarche en matière de sécurité alimentaire a été réalisée par l'Union Européenne à travers la législation qui régle l'utilisation

des sulfites en tant que conservateurs. Ainsi, la [Directive 2000 13 CE, \(2000\)](#), la [Directive 2003 89 CE, \(2003\)](#) et la [Directive 2007 68 CE, \(2007\)](#) imposent l'étiquetage systématique des allergènes incorporés dans les produits alimentaires. La législation européenne limite également la quantité de sulfites en tant qu'additifs dans un panel très varié d'aliments (voir Tableau IV page 65 et Tableau V page 66 selon les textes suivants : [Directive 95 2 CE, \(1995\)](#), [Directive 2006 52 CE, \(2006\)](#), [Règlement CE 606, \(2009\)](#)).

De plus, le [Règlement UE 1169, \(2011\)](#) concernant l'information du consommateur (INCO), applicable depuis le 13 décembre 2014, précise que « tout ingrédient ou auxiliaire technologique énuméré à l'annexe II de ce règlement ou dérivé d'une substance ou d'un produit énuméré à l'annexe II provoquant des allergies ou des intolérances, utilisé dans la fabrication ou la préparation d'une denrée alimentaire et encore présent dans le produit fini, même sous forme modifiée » doit être obligatoirement mentionné sur la composition ou la présentation. En effet, qu'il s'agisse d'allergènes présents dans les denrées préemballées ou non, l'indication doit être faite par écrit, depuis cette date. Le règlement INCO concerne tous les produits destinés au consommateur final y compris ceux servis par les collectivités. L'identification de la présence d'allergènes dans la liste des ingrédients d'un produit transformé reste inchangée, mais des mentions spécifiques aux denrées alimentaires non préemballées, telle que les crevettes à l'étal y sont citées. Les allergènes devront être précisés, sans que les modalités de transmission de l'information aux consommateurs soient définies à ce jour par les états membres. Hors, les substances actuellement utilisées pour empêcher la mélanose de la crevette figurent parmi la liste des allergènes (voir **Tableau VI** page 67). Leur indication à l'étal pourrait avoir une incidence sur les ventes de crevettes. La substitution de ces substances par un produit ne figurant pas dans cette liste pourrait être une voie de différenciation positive vis-à-vis de la concurrence.

Ces différents règlements et directives améliorent la sécurité du consommateur mais ne résolvent pas entièrement les problèmes induits par la présence des sulfites dans les produits alimentaires. Les consommateurs sensibles aux sulfites doivent continuer à prêter attention à la composition de leur alimentation. Par ailleurs, les directives sont fréquemment modifiées en réponse aux avancées

scientifiques, ce qui a pour effet d'abaisser la confiance dans la législation, sous-entendant que la sécurité du consommateur ne peut être totalement assurée. En outre, les nouvelles règles européennes concernant l'étiquetage des denrées alimentaires, ([Règlement UE 1169, \(2011\)](#) dit INCO), sont coûteuses pour l'industrie. Les petites et moyennes entreprises, de par leur infrastructure, rencontrent des difficultés à adapter à plusieurs reprises leurs procédures. Pour l'ensemble de ces raisons, la recherche de produits alternatifs, sains et efficaces, à l'utilisation des sulfites est devenue une réelle nécessité ces dernières années.

Tableau IV : réglementation en vigueur concernant l'emploi des sulfites pour les crustacés et les céphalopodes

[Arrêté du 2 octobre 1997, \(1997\)](#) modifié, [Directive 95 2 CE, \(1995\)](#) modifiée par la [Directive 2006 52 CE, \(2006\)](#)

Nom	Denrées alimentaires	Quantité maximale
Sulfites (exprimé en SO ₂)	Crustacés et céphalopodes : frais, congelés et surgelés	150 mg.kg ⁻¹
E220 : dioxyde de soufre E221 : sulfite de sodium E222 : sulfite acide de sodium	Crustacés des familles <i>Penaeidae</i> <i>Solenceridae</i> et <i>Aristeidae</i> : frais, congelés et surgelés	
E223 : disulfite de sodium	Moins de 80 unités	150 mg.kg ⁻¹
E224 : disulfite de potassium	Entre 80 et 120 unités	200 mg.kg ⁻¹
E226 : sulfite de calcium	Plus de 120 unités	300 mg.kg ⁻¹
E227 : sulfite acide de calcium E228 : sulfite acide de potassium	Crustacés et céphalopodes : cuits	50 mg.kg ⁻¹
	Crustacés des familles <i>Penaeidae</i> <i>Solenceridae</i> et <i>Aristeidae</i> : cuits	
	Moins de 80 unités	135 mg.kg ⁻¹
	Entre 80 et 120 unités	180 mg.kg ⁻¹
	Plus de 120 unités	270 mg.kg ⁻¹

NB : Le SO₂ dont la teneur n'excède pas 10 mg.kg⁻¹ n'est pas considéré comme présent.

C'est dans ce contexte que s'est construit le partenariat entre les équipes de recherche de l'Institut Charles VIOLLETTE, de l'Anses et l'entreprise boulonnaise Nossi-Bé localisée à Landacres. Cette entreprise du groupe UNIMA est la seule à produire des crevettes « Label rouge » en France. Monsieur LE TETOUR, directeur du site, soutient ce projet dans la mesure où la substitution des sulfites par des molécules naturelles serait dans la logique de la conception de produits liés à la naturalité qu'il préconise. De plus, la recherche d'ingrédients naturels, peu transformés, constitue une tendance grandissante. L'étude sur les tendances de l'innovation dans le secteur alimentaire, réalisée par XTC et [TNS](#)

[Sofres, \(2012\)](#) dans sept pays (France, Allemagne, Grande-Bretagne, Espagne, Russie, États-Unis et Chine) a montré que les tendances en lien avec la naturalité, le médical et le végétal constituent le second pôle de l'offre d'innovations alimentaires (22,1 %). Auprès des consommateurs, ces thèmes suscitent des niveaux d'intérêt élevés. 80 % des français sont intéressés par une allégation ayant trait à la naturalité, les consommateurs ayant tendance à penser qu'un produit naturel est plus sain.

Tableau V : exemples de concentrations maximales en sulfites tolérées dans différentes catégories de produits alimentaires en Europe
Selon la [Directive 95 2 CE, \(1995\)](#)

Denrées alimentaires	Quantité maximale (mg.kg ⁻¹ ou mg.L ⁻¹ selon le cas) Exprimée en SO ₂
Vin blanc	200*
Vin rouge	150*
Cidre, poiré, vin de fruits, vin de fruits pétillant (y compris les produits sans alcool)	200
Bière, y compris la bière à faible teneur en alcool et la bière sans alcool	20
Bière subissant une seconde fermentation dans le fût	50
Biscuits secs	50
Moutarde, à l'exception de la moutarde de Dijon	250
Moutarde de Dijon	500
Jus d'orange, de pamplemousse, de pomme et d'ananas destinés à la vente en vrac dans les établissements de restauration	50
Crustacés et céphalopodes Frais, congelés et surgelés	150
Cuits	50
Pommes de terre déshydratées	400

* selon le [Règlement CE 606, \(2009\)](#)

Ce partenariat s'est concrétisé sous la forme du projet « RESASC » (voir page 109) signifiant « Recherche de solutions alternatives à l'utilisation des Sulfites pour la prévention de la mélanose de Crevettes ».

Tableau VI : substances allergènes dont la présence doit obligatoirement être mentionnée selon l'annexe II du [Règlement UE 1169, \(2011\)](#) (INCO)

Substances ou produits provoquant des allergies ou intolérances	Exceptions
Céréales contenant du gluten (blé, seigle, orge, avoine, épeautre, kamut ou leurs souches hybridées) et produits à base de ces céréales	Sirops de glucose à base de blé, y compris le dextrose ; maltodextrines à base de blé ; sirops de glucose à base d'orge ; céréales utilisées pour la fabrication de distillats alcooliques, y compris d'alcool éthylique d'origine agricole
Crustacés et produits à base de crustacés	
Œufs et produits à base d'œuf	
Poissons et produits à base de poissons	Gélatine de poisson utilisée comme support pour les préparations de vitamines ou de caroténoïdes ; gélatine de poisson ou de l'ichtyocolle utilisée comme agent de clarification dans la bière et le vin
Arachides et produits à base d'arachides	
Soja et produits à base de soja	Huile et graisse de soja entièrement raffinées ; tocophérols mixtes naturels (E306) ; D-alpha-tocophérol naturel ; acétate de D-alpha-tocophéryl naturel ; succinate de D-alpha-tocophéryl naturel dérivés du soja ; phytostérols et esters de phytostérol dérivé ; huiles végétales de soja ; ester de stanol végétal produit à partir de stérols dérivés d'huiles végétales de soja
Lait et produits à base de lait (y compris le lactose)	Lactosérum utilisé pour la fabrication de distillats alcooliques, y compris d'alcool éthylique d'origine agricole ; lactitol
Fruits à coque (amandes, noisettes, noix, noix de cajou, noix de pécan, noix du Brésil, pistaches, noix de Macadamia ou du Queensland) et produits à base de ces fruits	Fruits à coque utilisés pour la fabrication de distillats alcooliques, y compris d'alcool éthylique d'origine agricole
Céleri et produits à base de céleri.	
Moutarde et produits à base de moutarde.	
Graines de sésame et produits à base de graines de sésame	
Anhydride sulfureux et sulfites (concentrations >10 mg/kg ou 10 mg/litre en termes de SO ₂ total pour les produits prêts à consommer ou reconstitués)	
Lupin et produits à base de lupin	
Mollusques et produits à base de mollusques	

L'aboutissement de ce projet constituera ainsi une alternative à l'utilisation du métabisulfite de sodium pour la prévention du brunissement des crevettes. Il devra répondre à deux exigences majeures. Premièrement, il devra faire appel à des composés naturels, non allergènes, ne modifiant pas les qualités organoleptiques du produit, et sans danger pour le consommateur et les opérateurs. Il devra également être économiquement viable pour les industriels concernés. *In fine*, le projet RESASC permettra la production naturelle et la commercialisation de crevettes sans additifs chimiques, dans des conditions d'économie durable, contribuant ainsi à la mise en place d'une filière internationale agroalimentaire tracée naturelle.

2. *Etat de l'art*

a. *La mélanose des crustacés*

Le goût, l'apparence et le prix représentent les trois principaux critères de qualité pris en compte par le consommateur lors du choix d'un produit alimentaire ([Tavoularis et al., \(2007\)](#)). L'apparence exerce son impact principalement au travers de la couleur qui va guider le consommateur au moment de son choix. De nombreux composés peuvent être à l'origine de la couleur d'un produit, comme les pigments naturels (chlorophylles, anthocyanines, caroténoïdes...) ou les pigments formés à travers des réactions enzymatiques ou non lors de la conservation ou du traitement des denrées alimentaires. L'une des réactions parmi les plus problématiques, la mélanose, conduit au brunissement *via* la synthèse de mélanine. Ce phénomène affecte de nombreux produits alimentaires comme les fruits, les légumes et les crustacés ([Kim et al., \(2000\)](#)).

La mélanose des crustacés, également appelée brunissement ou « black spot », touche aussi bien des espèces de langoustines, de crevettes ou de crabes. Ce phénomène *post mortem* se caractérise par l'apparition de taches noires. Pour les crevettes, ces taches affectent particulièrement le céphalothorax, la queue, la carapace et les articulations des appendices locomoteurs (voir **Figure 10** page 69). Cela ne modifie pas la saveur du produit mais diminue drastiquement son acceptabilité par le consommateur et par conséquent sa valeur commerciale ([Benjakul et al., \(2006\)](#)).

La mélanose est un phénomène qui apparaît suite à une cascade de réactions enzymatiques et non enzymatiques. Elle se déclenche suite à une réaction

biochimique, catalysée par une enzyme au cours de sa première étape, d'où le nom de brunissement enzymatique.

Le mécanisme d'action de cette réaction *post mortem* se caractérise par l'oxydation de dérivés phénoliques en quinones par différentes enzymes dénommées polyphénoloxydases ou PPO ([Nirmal et Benjakul, \(2009\)](#), [Qian et al., \(2014\)](#)). Les polyphénoloxydases (PPO), également dénommées phénoloxydases (PO) ou phénolases, regroupent les tyrosinases ([EC 1.14.18.1](#)), les catécholoxydases ([EC 1.10.3.1](#)) et les laccases ([EC 1.10.3.2](#)) (voir **Figure 11** page 70). Ces enzymes catalysent les premières étapes conduisant à la synthèse de la mélanine, chromogène responsable de la mélanose ([Cerenius et Söderhäll, \(2004\)](#)) et sont différenciables les unes des autres par leurs capacités d'oxydation.



Figure 10 : crevettes crues (*Penaeus monodon*) mélanosées

Crédit photographique : Cédric LE BRIS, post-doctorant ULCO, de 2014 à 2015

En effet, les phénoloxydases sont des oxydoréductases capables, en présence d'oxygène moléculaire :

- d'oxyder les monophénols et les ortho-diphénols pour les tyrosinases,
- les ortho-diphénols pour les catécholoxydases,
- les ortho et para-diphénols pour les laccases.

Cette première étape enzymatique est suivie par une polymérisation non enzymatique et une auto-oxydation des quinones donnant lieu à des pigments variant du jaune/orange au noir et de haut poids moléculaire : la mélanine et ses différents dérivés ([Garcia-Molina et al., \(2005\)](#) [Benjakul et al., \(2005\)](#), [Nirmal et al., \(2015\)](#)).

D'un point de vue physiologique (*in vivo*), les phénoloxydases (PO) jouent un rôle essentiel dans l'immunité des invertébrés à travers différents mécanismes. Les phénoloxydases (PO) sont des enzymes cuivre-dépendantes et de ce fait elles possèdent des atomes de cuivre au niveau de leur site actif (au nombre de deux pour les tyrosinases et les catécholoxydases et quatre pour les laccases ([Matoba et al., \(2006\)](#), [Skálová et al., \(2009\)](#)). L'hémocyanine, transporteur d'oxygène chez les crustacés et certains mollusques, est également une protéine à cuivre de type 3 qui possède un site actif très proche de celui des tyrosinases et des catécholoxydases ([Decker et Terwilliger, \(2000\)](#)). Elle peut être activée de la même façon que les prophénoloxydases et présenter une activité phénoloxydase ([Decker et Jaenicke, \(2004\)](#) ; [Decker et al., \(2007\)](#) ; [Ballarin et al., \(2012\)](#) ; [Idakieva et al., \(2013\)](#)).

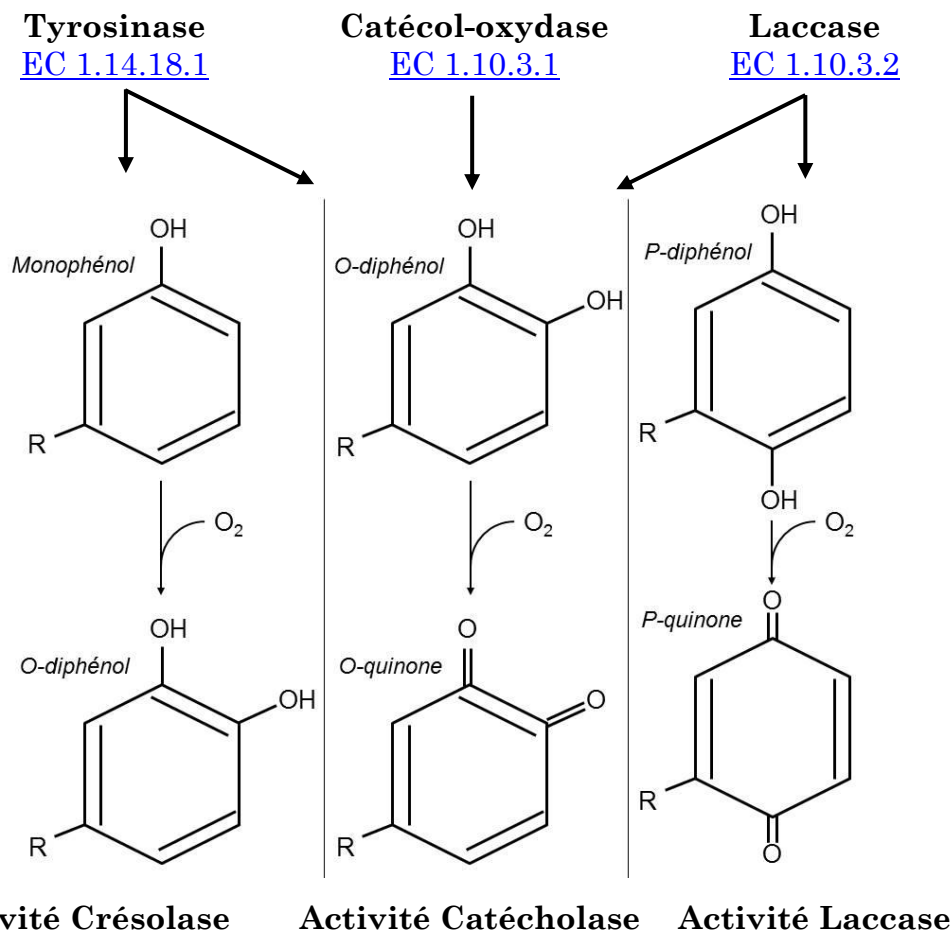


Figure 11 : classification des phénoloxydases (PO)

Les tyrosinases possèdent l'activité crésolase, les catécol-oxydases possèdent l'activité catécholase et les laccases possèdent l'activité laccase. Tyrosinases, catécol-oxydases et laccases partagent toutes trois l'activité catécholase.

Source : d'après la figure 2 de la thèse de Cédric [Le Bris, \(2013\)](#), inspirée de [Walker et Ferrar, \(1998\)](#).

Cette similitude entre les phénoloxydases (PO) et l'hémocyanine souligne l'importance de différencier les activités phénoloxydases (APO) des enzymes dénommées phénoloxydases (PO). Chez les crustacés, l'hémocyanine est présente dans l'hémolymphe en grande quantité et représente entre 90 et 95 % des protéines plasmatiques alors que les phénoloxydases (PO) sont présentes en quantité négligeable dans les hémocytes sous la forme inactive de pro-phénoloxydases ([Adachi et al., \(2001\)](#)). Ce déséquilibre en proportions a logiquement conduit à l'étude du rôle de l'hémocyanine dans le phénomène de la mélanose. La capacité de l'hémocyanine à produire une activité phénoloxydase (APO), et donc son rôle dans le brunissement enzymatique, a ainsi été démontré chez quelques espèces de crustacés (*Penaeus japonicus* : [Adachi et al., \(2001\)](#), *Penaeus vannamei* : [Garcia-Carreno et al., \(2008\)](#), *Parapenaeus longirostris* : [Martínez-Alvarez et al., \(2008\)](#), *Nephrops norvegicus* : [Coates et Nairn, \(2013\)](#)) alors qu'il a longtemps été imputé aux seules phénoloxydases (PO). Toutefois, un nombre croissant d'études mentionnent à la fois l'implication des phénoloxydases (PO) et de l'hémocyanine dans le développement *post mortem* de la mélanose chez les gastéropodes ([Siddiqui et al., \(2006\)](#)) ou la crevette ([Yan et al., \(2008\)](#) ; [Xu et al., \(2008\)](#)).

Un exemple de formation de mélanine, à partir d'un simple mono-phénol, montrant l'implication de la tyrosinase est représenté dans la **Figure 12** page 72. L'intensité du phénomène *post mortem* de la mélanose chez les crustacés varie en fonction des espèces considérées et ces variations sont principalement dues aux différences de concentration et de distribution en substrats et en enzymes ([Benjakul et al., \(2005\)](#), [Montero et al., \(2001a\)](#)). Pour une espèce donnée, l'intensité de la mélanose est également variable selon la saisonnalité, l'environnement géographique et les différents états physiologiques des individus (mue, reproduction, âge, sexe...). Il est important de mentionner que les phénoloxydases (PO) et les hémocyanines peuvent présenter des stabilités thermiques différentes au cours du temps et de fait réagir de façon contrastée au cours de la réfrigération, de la congélation et de la cuisson.

De plus, les paramètres physico-chimiques de l'environnement (pH, température, pression en O₂,...) au cours de chacune de ces étapes peuvent varier considérablement et influencer l'efficacité des phénoloxydases (PO) et des

hémocyanines et par conséquent l'intensité du brunissement enzymatique ([Zamorano et al., \(2009\)](#), [Bono et al., \(2010\)](#)).

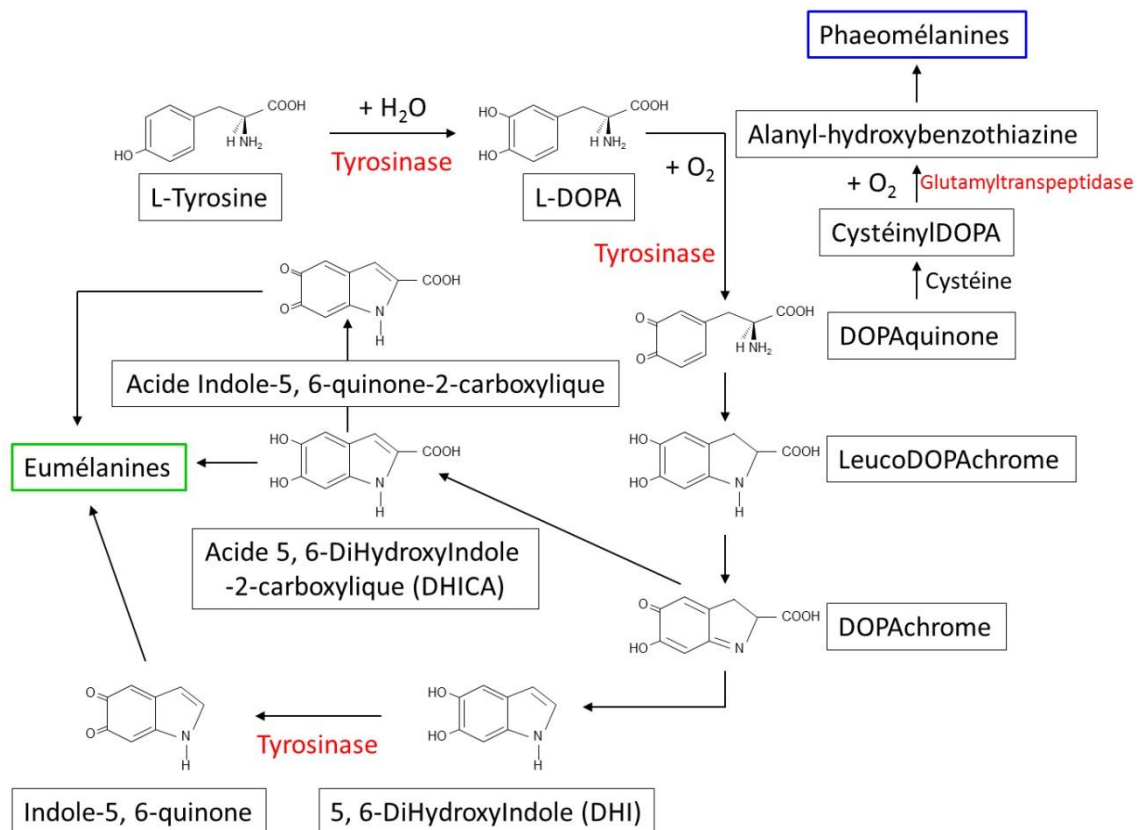


Figure 12 : exemple de mécanismes conduisant à la formation de mélanine (phéomélanine et eumélanine) à partir d'un monophénol, la L-tyrosine
Source : schéma 2 de la thèse de Sabrina [Okombi, \(2005\)](#), d'après [Aroca et al., \(1993\)](#)

b. Prévention de la mélanose des crevettes

La réglementation qui encadre la commercialisation des crevettes est très stricte en ce qui concerne la mélanose des crevettes et langoustines. Ainsi, il ne peut y avoir plus de 1 % des individus qui présentent des signes de mélanose, et un seul « point noir » de plus de 2 mm de diamètre détecté sur l'individu suffit pour considérer que celui-ci est « mélanosé ».

i. Les sulfites et autres composés chimiques

A ce jour, les sulfites constituent la solution la plus efficace, la moins onéreuse et la plus largement utilisée pour lutter contre ces signes de mélanose. Ces agents chimiques inhibent le brunissement des crevettes à travers deux mécanismes d'action. Ils réagissent d'une part avec les quinones intermédiaires, impliqués dans la synthèse de mélanine, en formant des sulfo-quinones. D'autre part, ils interagissent directement avec les phénoloxydases (PO) en les dénaturant de manière irréversible ([Gómez-Guillén et al., \(2005\)](#)). Les sulfites

présentent également des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes importantes pour la conservation des matrices alimentaires. L'ensemble de ces propriétés rend les sulfites difficilement remplaçables. Néanmoins, les acides benzoïques et leurs dérivés comme le 4-Hexylrésorcinol (4-HR) sont connus pour être des inhibiteurs chimiques des phénoloxydases (PO) ([Jimenez et Garcia-Carmona, \(1997\)](#) ; [Montero et al., \(2001a\)](#)). Ainsi, le 4-HR est utilisé dans certains cas comme alternative aux sulfites dans la conservation des produits de la mer incluant les crevettes ([Montero et al., \(2006\)](#)). En Europe, les traitements à base 4-HR sont autorisés pour les crustacés depuis janvier 2007. Mais, pour que l'efficacité du 4-HR atteigne celle des sulfites, les doses doivent être comparativement très importantes ([Montero et al., \(2006\)](#)). De ce fait, le Comité économique et social européen avait limité, en 2005, à 2 mg.kg⁻¹ la concentration résiduelle maximale autorisée dans le muscle de crustacés ([Avis du Comité économique et social européen, \(2005\)](#)). Ainsi, l'utilisation du 4-HR est aujourd'hui marginale. De nombreuses autres molécules chimiques ont également été testées telles que l'acide ascorbique ou ses dérivés, l'acide citrique ou les phosphates mais les résultats n'ont pas été probants quant à leur efficacité ([Iyengar et McEvily, \(1992\)](#)). Quelques-unes de ces molécules sont tout de même associées aux sulfites dans certaines solutions commerciales dans le but de réduire la concentration de ces derniers ([López-Caballero et al., \(2006\)](#)). Il s'agit par exemple de l'acide ascorbique associé à des dérivés d'arginine et d'acide laurique.

Les avancées législatives passées et attendues ainsi que l'inquiétude croissante des consommateurs vis-à-vis des risques associés à l'addition de composés chimiques dans les produits alimentaires créent la nécessité de trouver des alternatives ([McEvily et al., \(1991\)](#)). Ainsi, ce projet s'inscrit dans la nécessité de trouver des molécules d'«origine naturelle», alternatives aux sulfites ainsi qu'aux composés chimiques tels que le 4-Hexylrésorcinol ([Jimenez et Garcia-Carmona, \(1997\)](#)), sans danger pour le consommateur et les opérateurs agissant tout au long du conditionnement des crevettes. De plus, ce type d'alternative devrait permettre aux producteurs de pouvoir valoriser leurs crevettes grâce à l'obtention de labels de type « Bio » et sans sulfites.

Par ailleurs, il existe des alternatives physiques à l'apparition de la mélanose des crevettes, que ce soit par traitement thermique ([Martínez-Alvarez et al., \(2009\)](#)), atmosphère modifiée/contrôlée ([Bono et al., \(2012\)](#)) ou encore par traitement haute pression ([Montero et al., \(2001b\)](#)).

ii. *Les molécules alternatives « naturelles »*

De nos jours, les antioxydants naturels et les composés antimicrobiens, notamment d'origine végétale, ont connu une attention croissante dans l'objectif d'être utilisés comme additifs alimentaires. En ce sens, les efficacités de certains extraits de végétaux et de champignons ont été testées pour prévenir le brunissement des crevettes. Ainsi, des extraits de poudre de pépins de raisin ont montré un effet significatif dans le retardement de l'apparition de la mélanose chez la crevette *Parapenaeus longirostris* ([Gokoglu et Yerlikaya, \(2008\)](#)). Des travaux ont également montré que l'immersion des crevettes (*Litopenaeus vannamei*) dans des solutions à base d'extraits de thé vert avait des effets significatifs sur le retardement du brunissement pendant 12 jours ([Nirmal et Benjakul, \(2011c\)](#)). [Nirmal et Benjakul, \(2011b\)](#) ont également utilisé du thé vert afin d'inhiber la mélanose chez *Litopenaeus vannamei*. Dans une autre étude, les mêmes auteurs ont mis en évidence *in vitro*, l'effet inhibiteur dose-dépendant d'un extrait de graines de faux mimosa (*Leucaena leucocephala*) (contenant des composés phénoliques et de la mimosine) sur l'activité de la phénoloxydase (PO) de céphalothorax de *Litopenaeus vannamei* ([Nirmal et Benjakul, \(2011a\)](#)). [Nirmal et Benjakul, \(2012\)](#) ont aussi montré la capacité de l'acide férulique (molécule synthétisée par des plantes de la famille des Apiacées) et de la catéchine (composé de la famille des flavonoïdes initialement obtenu à partir des fruits de l'acacia à cachou (*Acacia catechu*)) à inhiber *in vitro* l'activité phénoloxydase extraite du céphalothorax de la crevette *Litopenaeus vannamei*. Ces deux molécules affectent également les composés intermédiaires de la réaction de brunissement enzymatique en réduisant les quinones en diphénols ([Nirmal et Benjakul, \(2012\)](#)).

Des extraits d'origine fongique, la collybie à pied velouté (*Flammulina velutipes*), ont également été testés dans le but de retarder l'apparition de la mélanose chez le crabe *Chionoecetes japonicus* ([Encarnacion et al., \(2011\)](#)) ainsi que chez les crevettes *Penaeus monodon* et *Litopenaeus vannamei* ([Encarnacion et al., \(2012\)](#)).

Des extraits acétoniques de ce champignon ont également montré un effet inhibiteur sur l'apparition du brunissement enzymatique pour d'autres crevettes telles que *Trachypenaeus curvirostris* ([Jang et al., \(2003\)](#)) ou *Marsupenaeus japonicus* ([Encarnacion et al., \(2010\)](#)).

Les molécules responsables du retardement de l'apparition de la mélanose, contenues dans ces extraits naturels, qu'ils soient d'origine végétale ou fongique, sont pour la majorité des composés phénoliques de types catéchine et acides phénoliques. A ce jour, aucune étude ne fait état de l'utilisation de ces composés à l'échelle industrielle pour le traitement de la mélanose des crevettes, notamment du fait du coût élevé de ces composés comparativement à celui du métabisulfite de sodium.

iii. Les produits de la réaction de Maillard (MRPs)

La réaction de Maillard, que l'on peut également qualifier de brunissement non enzymatique, est une réaction complexe qui débute par l'interaction entre des groupes aminés portés par les résidus lysyl des protéines et des fonctions carbonyles principalement portées par des sucres réducteurs. Cette réaction, qui nécessite une énergie d'activation élevée, conduit à la formation de nombreux composés, dénommés produits de la réaction de Maillard (MRPs : Maillard Reaction Products). Certains de ces composés sont volatils, d'autres au contraire présentent un poids moléculaire élevé et sont de couleur brune : les mélanoïdines ([Manzocco et al., \(2000\)](#)). Ces composés présentent de nombreuses caractéristiques très intéressantes en termes d'activités biologiques mais malheureusement, ils sont encore mal caractérisés. Ainsi, outre les nombreuses études qui font état des propriétés antioxydantes et antibactériennes des MRPs, il a été montré que ces composés peuvent inhiber le brunissement enzymatique. Des travaux ont montré que des MRPs, produits à partir de glucose ou de fructose et de cystéine ou d'acide glutamique, étaient de puissants inhibiteurs du brunissement de pommes, de champignons et d'aubergines ([Billaud et al., \(2004b\)](#)). Certains de ces composés se sont même révélés aussi efficaces que le métabisulfite de sodium dans la conservation de compote de pomme ([Billaud et al., \(2004a\)](#), [Chériot et al., \(2007\)](#)). D'autres études ont également mis en évidence les propriétés chélatrices du cuivre de MRPs obtenus à partir de xylose et de chitosane ainsi que leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'activité

phénoloxydase (APO) ([Huang et al., \(2007\)](#), [Zhu et al., \(2013\)](#)). Enfin, de manière prometteuse, une étude fait état des effets inhibiteurs de MRPs générés à partir de fructose et de glycine sur des phénoloxydases (PO) isolées de céphalothorax de *Penaeus monodon*. Les résultats de cette étude montrent que ces effets sont majoritairement dus aux propriétés chélatrices du cuivre des MRPs produits. Les auteurs suggèrent donc que ces composés pourraient être utilisés pour prévenir la mélanose des crustacés ([Matmaroh et al., \(2006\)](#)).

3. *Contribution au domaine*

a. *Introduction*

L'ensemble des résultats décrits dans ce paragraphe est issu du travail de Cédric LE BRIS, assisté de Benoît CUDENNEC et moi. Les travaux menés sur cette thématique ont porté sur l'étude de la mélanose chez la crevette *Penaeus monodon* et plus particulièrement sur l'implication de l'hémocyanine (qui possède une activité de type laccase : voir **Figure 11** page 70) dans ce phénomène. En effet, chez les crustacés, les phénoloxydases (PO) ne sont pas les seules protéines capables de catalyser l'oxydation de dérivés phénoliques (voir page 70).

La finalité de notre étude repose sur la substitution des sulfites, connus pour être à l'origine de réactions allergiques en particulier chez les asthmatiques et ce depuis longtemps (voir page 63), par d'autres molécules naturelles pouvant inhiber la mélanose. Un certain nombre de travaux récents portent sur l'utilisation et la caractérisation de composés naturels dans le but de remplacer le métabisulfite de sodium (voir paragraphe sur Les molécules alternatives « naturelles » page 74).

Bien qu'un nombre croissant d'études considère à la fois les phénoloxydases (PO) et l'hémocyanine comme source des activités phénoloxydases (APO), il y a très peu d'études sur la caractérisation de ces différentes activités portées par les tyrosinases, les catéchol-oxydases ou les laccases (voir **Figure 11** page 70). Le substrat le plus couramment utilisé pour étudier les activités phénoloxydases (APO) est la 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine (L-DOPA) qui est un substrat commun à ces trois activités enzymatiques, donc lié à l'activité cathécolase. L'emploi de ce substrat de façon très usuelle explique en partie le manque d'alternative efficace dans la recherche de nouveaux inhibiteurs pour lutter contre la mélanose de la crevette.

Nos travaux ont donc consisté à étudier les différentes activités phénoloxydases (APO) afin de mieux cerner le phénomène *post mortem* de la mélanose chez la crevette. La totalité des activités phénoloxydases (APO) des compartiments constitués du céphalothorax, de l'abdomen, des pattes et de la queue ont été étudiées avec différents substrats plus ou moins spécifiques de l'une ou plusieurs sous-classes de phénoloxydases (PO).

Afin de comprendre de quelle façon les différentes protéines possédant des activités phénoloxydases (APO) sont impliquées dans la mélanose, la stabilité thermique de ces activités enzymatiques a été suivie à la fois dans les pattes et la queue de la crevette *Penaeus monodon* sur une période de stockage étalée de 0 à 125 jours.

b. Etude des activités phénoloxydases

Les phénoloxydases ont déjà été étudiées pour différentes espèces de crevettes de genre *Penaeus* et *Parapenaeus* dont *Penaeus monodon* ([Encarnacion et al., \(2012\)](#) ; [Radha et al., \(2013\)](#)), *Penaeus japonicus* ([Adachi et al., \(2001\)](#) ; [Adachi et al., \(2003\)](#) ; [Benjakul et al., \(2005\)](#)), *Penaeus vannamei* ([Garcia-Carreno et al., \(2008\)](#) ; [Encarnacion et al., \(2012\)](#) ; [Luna-González et al., \(2012\)](#) ; [Nirmal et Benjakul, \(2009\)](#)) ou *Parapenaeus longirostris* ([Martinez-Alvarez et al., \(2008\)](#) ; [Martínez-Alvarez et al., \(2008\)](#)). Les résultats que nous avons obtenus en travaillant sur *Penaeus monodon* sont en conformité avec ces différentes études et mettent en avant la grande complexité de la répartition des activités phénoloxydases (APO) entre différentes enzymes ou protéines.

Concernant les phénoloxydases (PO), les expériences ont été réalisées sur les pattes et la queue de la crevette *Penaeus monodon* parce qu'il était beaucoup plus facile d'obtenir des protéines en quantité suffisante dans ces compartiments comparativement à la carapace, et que les cuiseurs de crevettes détectent dans ces compartiments les premiers signes de la mélanose.

c. Les différents types d'activité phénoloxydase

Parmi les protéines présentant un potentiel d'activité phénoloxydase (APO), il y a bien sûr les phénoloxydases (PO) elles-mêmes telles que les tyrosinases, les laccases et les catéchol-oxydases, mais il y a aussi l'hémocyanine ([Adachi et al., \(2001\)](#) ; [Coates et Nairn, \(2013\)](#) ; [Idakieva et al., \(2013\)](#)).

Les tyrosinases, les catéchol-oxydases et l'hémocyanine présentent un site actif de type 3 très similaire ([Decker et al., \(2006\)](#)), mais leur activation peut être différente selon la présence ou l'absence d'un domaine N-terminal au sein du site actif de l'enzyme ([Nagai et Kawabata, \(2000\)](#) ; [Decker et al., \(2007\)](#)). Les laccases, quant à elles, possèdent un site actif contenant à la fois des ions cuivre de type 2 et de type 3 ([Skálová et al., \(2009\)](#)).

Différents types d'activité phénoloxydase (APO) ont été mis en évidence concernant les genres *Penaeus* et *Parapenaeus*. Ainsi, l'activité tyrosinase a été identifiée dans l'hémolymphe de *Penaeus vannamei* en utilisant la tyramine et la tyrosine comme substrats ([Garcia-Carreno et al., \(2008\)](#)). Ces auteurs avaient mis en évidence une période de latence de 30 minutes pour l'oxydation de la tyrosine, contrairement à l'oxydation importante de la tyramine qui était instantanée. Ce temps de latence est caractéristique des tyrosinases et reflète l'activation lente de cette enzyme qui passe d'un état réduit inactif à un état oxydé et actif ([Naish-Byfield et Riley, \(1998\)](#)).

Les résultats que nous avons obtenus pour *Penaeus monodon* sont différents de ceux précédemment cités et obtenus pour *Penaeus vannamei*. En effet, nous n'avons pas observé d'oxydation quand nous avons utilisé la tyrosine comme substrat et seule une très légère oxydation a été mesurée lorsque le substrat utilisé était la tyramine. Etant donné que cette période de latence avait été précédemment déterminée pour des temps compris entre 1 et 10 minutes ([Jaenicke et Decker, \(2003\)](#) ; [Adachi et al., \(2005\)](#)), il est très peu probable que les mesures témoignant de l'absence ou du peu d'activité mono-phénolase chez *Penaeus monodon* soient dues à des périodes de latence beaucoup plus importantes que celles décrites dans la littérature. Ces résultats témoignent plutôt du fait qu'il n'y a pas d'activité tyrosinase dans les pattes et la queue chez *Penaeus monodon*. Ces résultats vont donc à l'encontre de l'idée reçue qui consiste à penser que la tyrosine est le substrat principal des phénoloxydases chez les crustacés ([Rolle et al., \(1991\)](#)). Il n'y aucune étude mettant en évidence la présence de catéchol-oxydase dans les crevettes alors que le numéro de la nomenclature internationale de cette enzyme ([EC 1.10.3.1](#)) est malgré tout abusivement utilisé pour décrire les phénoloxydases en général. La présence de catéchol-oxydase est en effet difficile à démontrer car il n'existe pas de substrat

spécifique pour cette activité ([Walker et Ferrar, \(1998\)](#)). Inversement, les para-diphénols, telle que l'hydroquinone, sont des substrats spécifiques des laccases. Malgré cela, l'activité laccase est rarement étudiée, alors que nos résultats montrent que le substrat hydroquinone est celui qui est le plus oxydé dans les pattes et la queue de *Penaeus monodon*. Les enzymes de type laccase ont été mises en évidence dans le céphalothorax de *Parapenaeus longirostris* ([Martinez-Alvarez et al., \(2008\)](#)) et les auteurs précisent qu'un inhibiteur non spécifique tel que le 4-HexylRésorcinol (4-HR) ne parvient pas à inhiber l'activité de cette enzyme. Par conséquent, l'inefficacité de certains inhibiteurs de la mélanose pourrait s'expliquer par leur impact inexistant sur ces activités de type laccase, trop peu étudiées et pourtant bien présentes, notamment chez *Penaeus monodon*.

d. Stabilité thermique comparée de l'hémocyanine et des phénoloxydases

Dans l'hémolymphe des crustacés, la concentration en hémocyanine est environ 1000 fois supérieure à celle des phénoloxydases ([Adachi et al., \(2005\)](#)). L'hémocyanine, dont le rôle chez le crustacé vivant, consiste à transporter l'oxygène, présente également une activité phénoloxydase ([Decker et Jaenicke, \(2004\)](#)) qui pourrait jouer un rôle crucial dans le phénomène *post mortem* de la mélanose. Cette activité PO de l'hémocyanine pourrait aussi jouer un rôle immunitaire. Il est donc important de discerner les activités phénoloxydases (APO) des enzymes dénommées phénoloxydases (PO).

L'un des moyens d'évaluer les protéines responsables des activités phénoloxydases (APO) et donc de la mélanose, consiste à étudier leur stabilité thermique. Les phénoloxydases (PO) sont des enzymes instables thermiquement dans le sens où elles ont tendance à s'agréger et à être facilement dénaturées à des températures inférieures à 0°C alors que l'hémocyanine demeure stable et peut être de nouveau activée même après un stockage à -20°C pendant plusieurs mois ([Adachi et al., \(1999\)](#) ; [Garcia-Carreno et al., \(2008\)](#)).

Les résultats que nous avons obtenus chez *Penaeus monodon* témoignent d'une différence dans la stabilité thermique entre les activités phénoloxydases (APO). Les phénoloxydases (PO), sensibles au phénomène de congélation/décongélation catalysent les réactions qui utilisent la L-DOPA comme substrat. Elles présentent des différences d'activité significatives selon qu'elles ont été

conservées à -20 ou à -80°C (voir **Figure 13** A et C page 80). Inversement, en utilisant l'hydroquinone comme substrat, l'activité phénoloxydase étudiée est apparue thermiquement stable et dans ce cas, la différence entre les activités phénoloxydases des échantillons stockés à -20°C ou à -80°C n'était pas significative (voir **Figure 13** B et D page 80). Cette stabilité mesurée avec l'hydroquinone, observé à la fois pour les pattes et la queue, montre que cette activité provient de l'hémocyanine. De plus, les niveaux d'activité phénoloxydase (APO) étudiés en utilisant l'hydroquinone comme substrat sont beaucoup plus importants que ceux mesurés avec la L-DOPA (voir **Figure 13** ci-dessous). Ces résultats confirment ceux obtenus pour *Penaeus japonicus* qui montraient que l'hémocyanine joue un rôle plus important dans la mélanose *post mortem* que les enzymes phénoloxydases elles-mêmes ([Adachi et al., \(2001\)](#)).

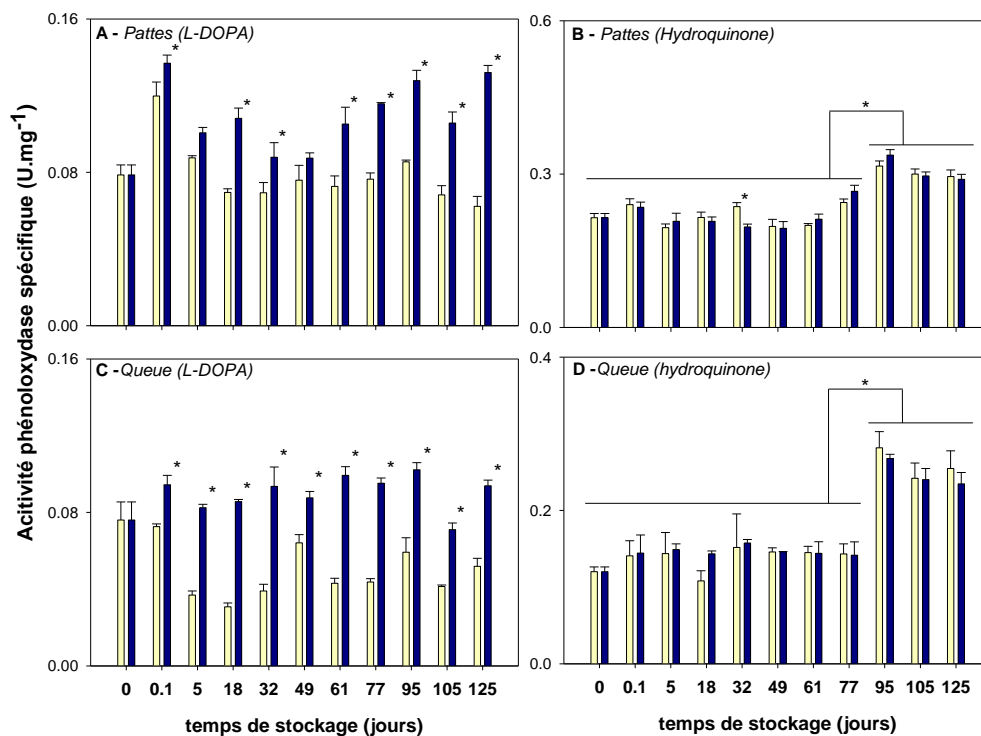


Figure 13 : étude de la stabilité thermique des activités phénoloxydases (APO) au cours du temps.

Etude menée sur les pattes (A et B) et sur la queue (C et D) de la crevette *Penaeus monodon* en utilisant la L-DOPA (A et C) ou l'hydroquinone (B et D) comme substrat. Les échantillons ont été stockés à -20°C (couleur jaune) ou à -80°C (couleur bleue). Les activités phénoloxydases (APO) sont exprimées en U.mg^{-1} de protéines totales et les valeurs résultent d'études menées en triple. L'étoile (*) signifie une différence significative ($p < 0,05$) entre deux conditions de stockage

A la fois pour les pattes et la queue, les niveaux d'activité phénoloxydase (APO) mesurés avec la L-DOPA sont significativement plus élevés pour les échantillons stockés à -80°C que pour ceux stockés à -20°C (voir **Figure 13** A et C ci-dessus).

Cette différence pourrait s'expliquer par le fait qu'à -80°C, les protéines responsables de l'activité phénoloxydase (APO) sont protégées de la dénaturation alors qu'à -20°C, ces mêmes protéines sont en partie dénaturées. Chez *Nephrops norvegicus*, l'activité phénoloxydase cellulaire dans l'hémolymphe a été réduite de 98 % après congélation/décongélation à -25°C, alors que l'hémocyanine conservait son intégrité ([Huang et al., \(2010\)](#)) confirmant ainsi la différence de stabilité au choc thermique pour ces différentes protéines. De telles différences de niveaux d'activité après congélation/décongélation témoignent d'une instabilité thermique et permettent de conclure que les échantillons ont besoin d'être analysés immédiatement après collecte ou préservés à -80°C en évitant plusieurs cycles de décongélation. Afin de confirmer ces résultats, la prochaine étape consiste à purifier et caractériser les protéines responsables des activités phénoloxydases (APO) chez *Penaeus monodon*.

Une augmentation de l'activité enzymatique, lorsque l'hydroquinone est utilisé comme substrat, a été constatée entre le 77^{ème} et le 95^{ème} jour de stockage à -20 ou -80°C que ce soit concernant les pattes ou la queue (voir **Figure 13 B et D** page 80). Ces augmentations, indépendantes de la température de stockage, résultent très certainement de l'auto-activation de l'hémocyanine. Une augmentation de la sorte n'a jamais été mentionnée auparavant. Cependant, [Sikorski et Kotakowski, \(2000\)](#) ont montré que la congélation ne stoppant pas intégralement les activités enzymatiques endogènes, celles-ci pouvaient conduire à l'activation de l'hémocyanine.

4. Conclusion et perspectives

Les activités phénoloxydases (APO) incluent les activités enzymatiques de type tyrosinase, les catéchol-oxydases et les laccases mais ces dernières sont souvent sous-estimées. En effet, les activités enzymatiques de type laccase sont très peu étudiées alors que leur taux d'activité peut être beaucoup plus important que ceux des autres phénoloxydases (PO) telles que la tyrosinase ou les catéchol-oxydases.

La stabilité des activités phénoloxydases (APO) à la congélation/décongélation a été étudiée en utilisant différents substrats spécifiques. Lorsque la L-DOPA, substrat commun aux activités phénoloxydases (APO), est utilisée après congélation/décongélation des enzymes, les activités enzymatiques, témoignant

de l'action des phénoloxydases (PO) instables au choc thermique, sont inexistantes. L'utilisation de l'hydroquinone, spécifique de l'activité laccase portée par l'hémocyanine, permet de mesurer cette activité après ce même traitement thermique. L'hémocyanine serait donc le principal vecteur de développement de la mélanose chez *Penaeus monodon*. De ce fait, dans le cadre du projet RESASC débutant en janvier 2016, nous allons nous focaliser sur l'activité de type laccase afin de découvrir des inhibiteurs naturels de la mélanose qui pourraient, à terme, se substituer aux sulfites.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication auprès du « Journal of Agricultural and Food Chemistry » qui a été acceptée en décembre 2015 (voir **Annexe 3** page 211).

IV. Halioauthenticité

A. *Différenciation d'espèces de thon*

1. *Contexte et état de l'art*

a. Contexte de l'étude

La thématique halioauthenticité a été développée au sein du laboratoire à compter de mars 2012. Le secrétaire de la Confédération des Industries du Traitement des Produits des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture (CITPPM), Philippe DROIN, m'avait contacté cette année-là car il était à la recherche d'une équipe universitaire pouvant travailler sur la thématique de différenciation des espèces de thon dans le cadre du montage d'un projet FUI impliquant différents partenaires, dont l'entreprise Phylogène, basée à Nîmes, spécialisée dans l'identification d'espèces. J'ai accepté la proposition de Philippe DROIN de participer à ce projet, sachant que notre approche serait basée sur l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire afin d'identifier et de quantifier les espèces de thon présentes dans des produits transformés. Au sein de l'équipe, nous étions en phase de recrutement d'un(e) maître de conférences ayant des compétences en biologie moléculaire et j'ai donc ciblé le recrutement sur ce programme. De plus, afin de renforcer le partenariat FUI, j'ai contacté Véronique VERREZ-BAGNIS de l'Ifremer de Nantes, eu égard aux travaux antérieurs qu'elle avait menés sur l'authenticité des produits de la mer. Enfin, je me suis également rapproché de Romdhane KAROUI, Professeur à l'université d'Artois, afin d'aborder la discrimination des différentes espèces de thon en utilisant la spectroscopie de fluorescence. Cette technique couplée aux outils chimiométriques (analyses statistiques multidimensionnelles) peut permettre d'authentifier et de quantifier les origines géographiques et de détecter la présence d'espèces de substitution dans des produits à base de thon.

Le règlement (CEE) n°1536/92 du conseil européen du 9 juin 1992 fixe les normes communes de commercialisation pour les conserves de thon et de bonite ([Règlement CE 1536, \(1992\)](#)). L'article 2 de ce règlement définit la liste des espèces pouvant être commercialisées sous forme de bonite ou de thon au sein de la communauté européenne (voir **Tableau VII** page 84). De plus, cet article précise que le mélange d'espèces différentes de poissons dans une même boîte

n'est pas autorisé. Par ailleurs, les règlements européens : [Règlement CE 104, \(2000\)](#) et [Règlement CE 2065, \(2001\)](#), ainsi que l'article R112-9 du code de la consommation ([Article R112- 9, \(2005\)](#)) imposent de mentionner sur l'étiquetage de certains produits de la mer, la dénomination commerciale des espèces halieutiques mises en œuvre, et éventuellement leur dénomination scientifique.

Tableau VII : espèces visées à l'article 2 du règlement européen n°1536/92 ([Règlement CE 1536, \(1992\)](#))

Thon			
Espèces du genre <i>Thunnus</i>			
Thon blanc ou germon (FAO)	Albacore tuna	<i>Thunnus alalunga</i>	Bonnaterre, 1788
Thon à nageoires jaunes ou albacore (FAO)	Yellowfin tuna	<i>Thunnus (Neothunnus) albacares</i>	Bonnaterre, 1788
Thon rouge ou rouge de l'atlantique (FAO)	Atlantic bluefin tuna	<i>Thunnus thynnus</i>	Linnaeus, 1758
Thon Patudo ou obèse (FAO)	Bigeye tuna	<i>Thunnus (Parathunnus) obesus</i>	Lowe, 1839
Autres espèces du genre <i>Thunnus</i>		<i>Thunnus spp</i>	
Listao ou bonite à ventre rayé	Skipjack tuna	<i>Euthynnus (Katsuwonus) pelamis</i>	Linnaeus, 1758
Bonite			
Espèces du genre <i>Sarda</i>			
Bonite à dos rayé	Atlantic bonito	<i>Sarda sarda</i>	<i>Bloch, 1793</i>
Bonite du Pacifique oriental	Eastern Pacific bonito	<i>Sarda chiliensis</i>	<i>Cuvier, 1832</i>
Bonite de l'océan Indien	Oriental tuna ou Bonito	<i>Sarda orientalis</i>	<i>Temminck & Schlegel, 1844</i>
Autres espèces du genre <i>Sarda</i>		<i>Sarda spp</i>	
Espèces du genre <i>Euthynnus</i>, à l'exception de l'espèce <i>Euthynnus (Katsuwonus) pelamis</i>			
Thonine commune	Little tunny	<i>Euthynnus alleteratus</i>	Rafinesque, 1810
Thonine orientale	Kawakawa	<i>Euthynnus affinis</i>	Cantor, 1849
Thonine noire	Black skipjack	<i>Euthynnus lineatus</i>	Kishinouye, 1920
Autres espèces du genre <i>Euthynnus</i>		<i>Euthynnus spp</i>	
Espèces du genre <i>Auxis</i>			
Melva ou Auxide (FAO)	Frigate tuna	<i>Auxis thazard</i>	Lacepède, 1800
Bonitou	Bullet tuna	<i>Auxis rochei</i>	Risso, 1810
Nom vernaculaire français	Nom vernaculaire anglais	Nom latin	Source

[Source : fishbase](#)

En complément de ce tableau, les thons pêchés industriellement sont représentés par sept espèces appartenant au genre *Thunnus* (thon germon (*Thunnus alalunga*), thon obèse (*Thunnus obesus*), thon albacore (*Thunnus albacares*), thon rouge de l'Atlantique (*Thunnus thynnus*), thon bleu du Pacifique (*Thunnus orientalis*), thon rouge du Sud (*Thunnus maccoyi*), thon mignon (*Thunnus tonggol*)) et une espèce appartenant au genre *Katsuwonus* (thon Listao (*K.*

pelamis). Les principales espèces utilisées en conserverie sont le thon germon, le thon albacore, le thon obèse et le thon Listao.

La maîtrise des approvisionnements est une problématique à laquelle sont confrontés les conserveurs de thon. Connaître les espèces constitutives des lots de matières premières utilisées est l'un des éléments majeurs de cette maîtrise.

Du fait des variations importantes en termes de prix et d'un marché très concurrentiel, les conserveurs français de thon redoutent également d'être confrontés à la double problématique suivante :

- la substitution délibérée d'une espèce par une autre, dans un but frauduleux.
- le mélange involontaire des espèces au moment du tri des poissons, conduisant à une contamination « partielle » de certains lots.

Ce projet FUI a, de ce fait, été élaboré à la demande de la CITPPM.

Le marché du thon représente en effet un enjeu économique majeur. Dans son rapport annuel de 2014, la FAO présente l'état des pêches maritimes au niveau mondial ([FAO, \(2014\)](#)). Les thons et les espèces apparentées représentent la plus grosse part des poissons pêchés en haute mer avec un total de captures de thon et d'espèces apparentées ayant atteint un nouveau record de plus de 7 millions de tonnes en 2012 pour un total de production de 158 millions de tonnes dont 91,3 millions pour l'halieutique et 66,6 millions pour l'aquaculture. Le thon Listao (*Katsuwonus pelamis*) représente la 3^{ème} espèce de poissons la plus pêchée en 2012 avec 2,79 millions de tonnes, après l'anchois du Pérou (*Engraulis ringens*) (4,7 millions de tonnes) et le lieu de l'Alaska (*Theragra chalcogramma*) (3,27 millions de tonnes) ([FAO, \(2014\)](#) : tableau 4 page 16). Le thon albacore (*Thunnus albacares*), quant à lui, constitue la 8^{ème} espèce la plus pêchée au monde en 2012 avec 1,35 million de tonnes.

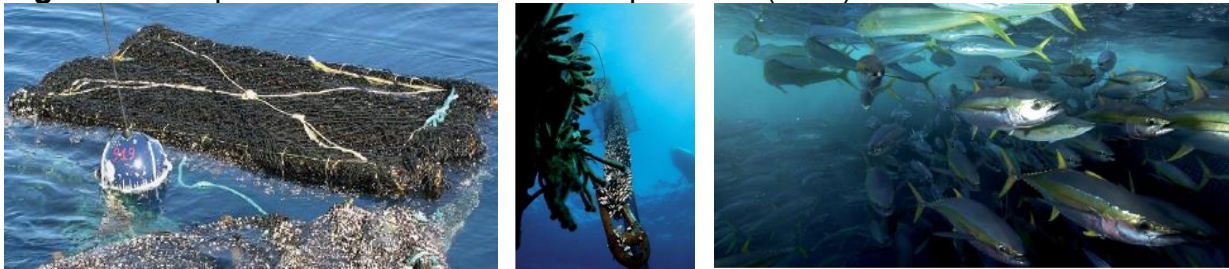
En France, le thon, avec 71 435 tonnes en 2014, représente le plus important des volumes de vente de poisson en conserves, soit 54,3 % des valeurs d'achat de produits aquatiques en conserves par les ménages français ([FranceAgrimer, \(2015\)](#)).

Les thons sont principalement pêchés dans l'Océan Pacifique (65 %), dans l'Océan Indien (20 %), dont le volume de captures a fortement augmenté depuis les années 80, et dans l'Océan Atlantique (15 %).

L'état des ressources halieutiques est variable selon les espèces de thon. Si certaines d'entre elles, comme le thon rouge (*Thunnus thynnus*), ont vu leurs stocks diminués, ce qui a conduit plusieurs pays à en réglementer la capture notamment par la publication de quotas de prise, la pression des prélèvements semble être bien supportée par les principales espèces commerciales de thons tropicaux (FAO, (2005)).

Si des techniques de pêche traditionnelle perdurent, elles ont été majoritairement remplacées par des techniques de pêche à la senne coulissante moins sélectives (<http://wwz.ifremer.fr/peche/Le-monde-de-la-peche/La-peche/comment/Les-engins/Sennes>). Cette technologie de pêche à la senne, concernant le thon, est généralement couplée à l'utilisation d'objets flottants appelés DCP (Dispositifs Concentrateurs de Poissons : **Figure 14** ci-dessous), pratique qui consiste à attirer les poissons au préalable.

Figure 14 : dispositifs de concentration des poissons (DCP)



A : Surface d'un DCP ressemblant à un simple radeau en bambou équipé d'une balise radio

B : Partie immergée d'un DCP dérivant

C : Concentration dense de thons albacore sous un DCP dérivant

Crédits photographiques : Marc TAQUET, FADIO/IRD-Ifremer

Source : [Taquet et al., \(2011\)](http://archimer.ifremer.fr/doc/00115/22657/20383.pdf). <http://archimer.ifremer.fr/doc/00115/22657/20383.pdf>

Dans ce cas, différentes espèces de thon, dont les différences morphologiques peuvent être très faibles au stade juvénile (exemple des juvéniles de thon obèse et albacore), sont souvent capturées simultanément ([Miyake, \(2010\)](#)). C'est d'ailleurs ce qui a constitué le point de départ de la crise d'octobre 2014 déclenchée par Greenpeace vis-à-vis de l'entreprise MWBrands, détentrice de la marque « Petit Navire ». Greenpeace, sur la base d'analyses moléculaires effectuées au sein du laboratoire espagnol AZTI Tecnalia, a reproché à cet industriel thonier d'utiliser cette technique de pêche à l'origine de mélanges entre du thon albacore et du thon obèse au sein des boîtes de conserves (<http://oceans.greenpeace.fr/petit-navire-gros-degats>). Ce contexte de crise a eu un impact très important sur le déroulement de ce programme de recherches et

de la thèse qui lui est associée. Cela a ostensiblement conditionné les travaux menés en se focalisant sur la différenciation entre le thon albacore et le thon obèse.

Il faut aussi mentionner l'impact de la crise de la viande de cheval de février 2013 qui s'est caractérisée, outre les conséquences directes concernant la suspicion accrue des consommateurs vis-à-vis des produits transformés, par une demande des institutionnels et des industriels de résultats sur la mise au point de méthodes moléculaires fiables et rapides permettant de lever tout doute sur l'authentification d'une espèce transformée. C'est le cas du [Rapport 2091\(INI\), \(2013\)](#) de la commission de l'environnement, de la santé publique et de la sécurité alimentaire, présenté au Parlement Européen par Esther DE LANGE, et qui porte sur la crise alimentaire, la fraude dans la chaîne alimentaire et son contrôle suite au « horsegate ». Ce rapport (page 13 item 59) « suggère que les tests ADN deviennent la procédure standard lors des contrôles par sondage pour déterminer les espèces, notamment en ce qui concerne les produits à base de viande et de poisson, et qu'une base centralisée de données ADN soit créée à cette fin ». Ce rapport s'appuie sur les travaux de [Moore et al., \(2012\)](#) pour positionner les poissons dans le « top 10 » des produits qui risquent le plus de faire l'objet de fraude alimentaire.

C'est dans ce contexte que les objectifs de cette étude consistent à mettre à disposition des industriels du secteur de la conserverie du thon des outils moléculaires leur permettant d'identifier et de quantifier les espèces de thon dans les conserves appertisées.

b. Etat de l'art

Au cours de ces dernières années, l'identification des espèces de poissons est devenue une préoccupation importante, ne serait-ce que pour étiqueter correctement les produits de la mer en vertu de la réglementation en vigueur, notamment en Europe ([Règlement CE 104, \(2000\)](#)). De plus, l'augmentation continue de la consommation mondiale des produits de la mer et d'aquaculture (de 80 millions de tonnes en 1985 à 158 millions de tonnes en 2012 : source [FAO, \(2014\)](#)) impacte forcément l'état des ressources marines. Et leur appauvrissement a conduit à la montée en puissance de marchés frauduleux basés sur la substitution d'espèces de poisson à haute valeur ajoutée par des espèces de coût

commercial beaucoup plus faible. Cette tendance a été facilitée par la mondialisation du commerce des produits de la mer et par le fait que ces mêmes produits sont de plus en plus commercialisés sous une forme transformée laissant peu de place à une identification facilitée ([Jacquet et Pauly, \(2008\)](#)). En effet, la perte de l'aspect morphologique et anatomique liée aux transformations des produits halieutiques rend difficile l'authentification des espèces de poisson et par conséquent augmente le risque de substitution par des espèces de qualité inférieure ([Marko et al., \(2004\)](#)).

Quand les caractéristiques morphologiques externes des poissons ne sont plus décelables suite au filetage ou à des procédés tels que la mise en conserve, la seule possibilité d'authentifier les produits de la mer consiste à utiliser des marqueurs moléculaires. Plusieurs techniques d'identification d'espèces de poissons crus ou cuits ont ainsi été développées en se basant sur la composition en protéines, par des techniques électrophorétiques ([Rehbein, \(1990\)](#), [Mackie, \(1996\)](#), [Etienne et al., \(1999\)](#), [Etienne et al., \(2000\)](#), [Etienne et al., \(2001\)](#)), immunologiques ([Mackie, \(1996\)](#), [Asensio et al., \(2008\)](#)) ou basées sur la composition en acides gras ([Gribbestad et al., \(2005\)](#), [Van Ruth et al., \(2010\)](#), [Molkentin et al., \(2015\)](#)). Les techniques d'identification basées sur les protéines sont essentiellement des techniques d'électrophorèses (IEF, PAGE). S'il a été montré que certaines de ces techniques étaient applicables à des produits chauffés, elles ne peuvent l'être à des produits très transformés comme les produits en conserve et plus particulièrement le thon ([Mackie et al., \(1999\)](#), [Etienne et al., \(2000\)](#)). Néanmoins, en se basant sur la composition en acides gras des phospholipides, [Medina et al., \(1997\)](#) ont réussi à discriminer trois espèces de thon en conserve.

Pour autant, ce sont surtout les méthodes basées sur l'étude de l'ADN nucléaire ou mitochondrial qui sont principalement utilisées pour l'étude de l'authenticité des produits de la mer ([Griffiths et al., \(2014\)](#)). Cependant, il n'existe pas de méthode « standard » et les trois récentes revues sur le sujet en dressent le bilan ([Rasmussen et Morrissey, \(2008\)](#), [Teletchea, \(2009\)](#), [Lago et al., \(2014\)](#)).

L'ADN présente le grand avantage, par rapport aux protéines, d'être stable à haute température, d'être présent dans l'ensemble des cellules de l'animal, ainsi que d'être doté d'une plus grande variabilité liée au code génétique ([Mackie,](#)

(1996)). De plus, il peut être utilisé à toutes les étapes de la vie de l'animal depuis l'œuf jusqu'au stade adulte.

De ce fait, l'ADN est, depuis une quinzaine d'années, bien plus utilisé que les protéines pour l'authentification des produits de la mer dans des matrices traitées thermiquement (Lockley et Bardsley, (2000a)).

Depuis la fin des années 1980 (Saiki et al., (1988)), l'utilisation de la réaction en chaîne déclenchée par la polymérase (« Polymerase chain reaction » : PCR) est la méthode de référence pour l'analyse de l'ADN. Elle a donc été largement utilisée pour l'authentification du poisson et des produits de la pêche (Asensio, (2007)).

Bien que des régions de l'ADN à la fois nucléaire (ADN_n) et mitochondrial (ADN_{mt}) peuvent être amplifiées par PCR, l'ADN_{mt} a préférentiellement été utilisé pour l'authentification des espèces, notamment lorsque l'échantillon de départ a subi un traitement thermique intense (Rasmussen et Morrissey, (2008)). C'est bien sûr le cas des conserves de thon. L'ADN_{mt} est en effet utilisé préférentiellement en raison de son abondance par rapport à l'ADN_n et du fait qu'en théorie sa structure circulaire lui procure une plus grande résistance aux dégradations thermiques (Borgo et al., (1996), Bossier, (1999), Civera, (2003)). Il a effectivement été montré qu'un chauffage intense, tel qu'il est appliqué pour les conserves de thon, dégrade fortement l'ADN en le clivant en fragments de très petite taille. La taille moyenne des fragments d'ADN dans des produits en conserves est de 100 à 360 paires de bases (pb), comparativement à une taille d'environ moins de 20 000 pb pour des produits congelés (Quinteiro et al., (1998), Pardo et Pérez-Villareal, (2004), Chapela et al., (2007), Rasmussen et Morrissey, (2009)).

Le gène mitochondrial le plus communément utilisé pour les études d'authentification d'espèces de poisson est constitué du gène du cytochrome b. Il a en effet été utilisé pour identifier les poissons plats, les gadidés, les anguilles, les anchois, et bien sûr les scombridés (Rasmussen et Morrissey, (2008)). Pour autant, d'autres gènes ont été utilisés pour différencier des espèces de poisson entre elles. Le projet *Barcoding of Life* (<http://www.barcodeoflife.org/>), lancé en 2003 par Paul HEBERT et son équipe (Hebert et al., (2003)) et sa déclinaison pour les espèces de poissons : *Fish-BOL* [Fish barcode of life \(Fish-Bol\)](http://www.fishbol.org/) (<http://www.fishbol.org/>) (Ward et al., (2009)) en sont la preuve. Ces projets

ont pour but de déterminer l'espèce à laquelle appartient un individu en ne connaissant que la séquence d'un fragment particulier d'ADN, utilisé comme marqueur universel pour différencier les espèces entre elles, celui du gène mitochondrial codant pour la première sous-unité de la cytochrome oxydase (COI), une protéine qui intervient dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Néanmoins, un certain nombre d'études ont montré que le gène de la sous unité 1 de la cytochrome oxydase n'était pas forcément le meilleur candidat pour différencier des espèces de thon entre elles ([Viñas et Tudela, \(2009\)](#), [Pedrosa-Gerasmio et al., \(2012\)](#)).

[Bartlett et Davidson, \(1991\)](#) ont été parmi les premiers à utiliser le séquençage de l'ADN_{mt} afin d'identifier des espèces de thon. Ils ont en effet utilisé la réaction la PCR pour amplifier un segment de 307 paires de bases du gène mitochondrial du cytochrome *b* prélevé chez des échantillons de quatre espèces de thon (*T. thynnus*, *T. obesus*, *T. albacares*, *T. alalunga*) et ont montré qu'il existait une variation intra-spécifique à ce locus chez chacune des espèces étudiées. [Bartlett et Davidson, \(1992\)](#) ont ensuite proposé la méthode dite FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing : méthode couplée intégrant méthodologie phylogénétique et identification moléculaire) en tant que moyen d'identifier les poissons. Leur méthode est constituée des étapes suivantes : extraction de l'ADN suivie d'une PCR utilisant des sondes universelles amplifiant un fragment court d'ADN constitué d'environ 360 pb provenant du gène mitochondrial du cytochrome *b*, suivi du séquençage de l'amplicon et d'une analyse phylogénétique de cette séquence en la comparant à des bases de données. Ils ont ainsi différencié du cabillaud (*Gadus morhua*) en boîte de conserve. Néanmoins, dans le cas du thon en conserve, il est indispensable d'utiliser des fragments d'ADN beaucoup plus courts pour la PCR, suite à la dégradation importante de l'ADN au cours du traitement thermique des boîtes. Certaines espèces de thon telles que l'albacore et l'obèse étant très proches génétiquement, il est difficile de les différencier sur la base de l'analyse de courts fragments d'ADN. Cependant, comme le rappellent [Quinteiro et al., \(2008\)](#), certains auteurs ont démontré qu'il était possible de différencier sur la base de fragments courts certaines espèces entre elles. C'est ainsi que [Unsel et al., \(1995\)](#) ont démontré que l'amplification et le séquençage d'un fragment de 59 pb (123 pb en comptant les amorces) du

gène mitochondrial codant pour le cytochrome b permet de distinguer 10 de 11 espèces de Scombridés (thons et bonites) analysées par ces auteurs. Néanmoins, ils ne sont pas parvenus à discriminer le thon obèse du thon albacore qui ne se différenciaient que par un seul nucléotide sur le fragment étudié. [Rehbein et al., \(1995\)](#) ont, la même année, mis au point une méthode rapide et peu coûteuse permettant d'identifier des espèces de thon en conserve en utilisant la PCR-SSCP : Single Strand conformation polymorphism (polymorphisme de conformation des simples brins). En effet, l'étape de séquençage était, dans ce cas, remplacée par une électrophorèse en gel de polyacrylamide des amplicons préalablement dénaturés par la chaleur de sorte à constituer un ADN simple brin présentant des migrations différentes en fonction de leur conformation.

Etant donné qu'à l'époque le séquençage constituait une technique relativement longue et coûteuse, différentes méthodes incluant l'utilisation de la PCR couplée à d'autres outils d'identification ont été utilisées pour authentifier des espèces de thon et sont présentées pour la plupart dans le tableau 4 de la revue écrite par [Rasmussen et Morrissey, \(2009\)](#). Outre la PCR sequencing, mentionnée précédemment constituée d'une PCR couplée au séquençage des fragments d'intérêt ([Unsel et al., \(1995\)](#)), ces différentes méthodes sont constituées de la multiplex-PCR : [Lockley et Bardsley, \(2000b\)](#) ; [Bottero et al., \(2007\)](#) ; [Michelini et al., \(2007\)](#) ; [Lin et Hwang, \(2008\)](#) ; [Catanese et al., \(2010\)](#) ; [Santaclara et al., \(2015\)](#), la PCR-RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) : [Ram et al., \(1996\)](#) ; [Quinteiro et al., \(1998\)](#) ; [Takeyama et al., \(2001\)](#) ; [Smith et al., \(2001\)](#) ; [Horstkotte et Rehbein, \(2003\)](#) ; [Pardo et Pérez-Villareal, \(2004\)](#) ; [Lin et al., \(2005\)](#) ; [Lin et Hwang, \(2007\)](#) ; [Kumar et al., \(2012\)](#), la PCR SSCP : Single Strand conformation polymorphism (polymorphisme de conformation des simples brins) : [Rehbein et al., \(1997\)](#) ; [Rehbein et al., \(1999\)](#) ; [Weder et al., \(2001\)](#) ; [Colombo et al., \(2005\)](#). Cependant, la plupart de ces auteurs a noté la nécessité d'étudier le polymorphisme intra-espèces.

Enfin, la PCR en temps réel ou PCR quantitative est une méthode basée sur l'amplification et la détection spécifique d'un fragment d'ADN dont la séquence est unique. Le couplage des fragments d'ADN générés par la réaction d'amplification à des molécules fluorescentes permet de les quantifier et de

déduire le nombre de molécules d'ADN présentes dans l'échantillon avant l'amplification, donc de quantifier la teneur de l'espèce visée par le test. La mise en œuvre de cette méthodologie repose sur la connaissance de séquences d'ADN spécifiques de l'espèce que l'on recherche. Cette méthode permet non seulement l'authentification mais aussi la quantification de différentes espèces en mélange dans un produit alimentaire. De ce fait, l'optimisation d'une telle technique peut permettre d'apporter des éléments de réponse fiables et sans équivoque quant à la nature d'un produit de la mer transformé tant du point de vue de sa composition intrinsèque mais également, en cas de mélange frauduleux ou accidentel, quant à la quantification des espèces qui le composent. C'est en 2005 que cette méthode a été utilisée pour la première fois pour identifier des espèces de thon en mélange, le germon et l'albacore sur la base d'un fragment d'environ 100 pb du gène de l'ARN 16S ([Lopez et Pardo, \(2005\)](#)). D'autres auteurs ont utilisé cette même technique pour l'identification des espèces de thon. [Dalmasso et al., \(2007\)](#) ont développé une méthode de PCR en temps réel basée sur l'amplification d'un fragment de 208 pb du gène codant pour l'ATPase 6 et intégrant l'analyse des courbes de fusion pour différencier 4 espèces de thon (germon, albacore, Listao et thon obèse) frais ou en conserve. [Terio et al., \(2010\)](#) ont réussi à différencier trois espèces de thon (germon, albacore et Listao) pouvant être en mélange dans une conserve par la technique de PCR en temps réel en utilisant des sondes Minor Groove Binder (MGB) pour amplifier de façon sélective des fragments de 69 à 98 pb du gène du cytochrome b. Enfin, [Chuang et al., \(2012\)](#) ont aussi développé une méthode d'identification par PCR en temps réel en utilisant des sondes Taqman et un système SYBR®Green pour distinguer quatre espèces de thon entre elles (thon obèse, thon rouge du sud, albacore et thon bleu du Pacifique) basée sur des fragments courts des gènes du cytochrome b, de la D-loop, de l'ARN 16S et de l'ATPase 6. Enfin, deux études récentes ([Viñas et Tudela, \(2009\)](#), [Pedrosa-Gerasmio et al., \(2012\)](#)) présentent la région de contrôle de l'ADN mitochondrial (D-loop) comme marqueur potentiel de différenciation des espèces de thon.

Pour autant, ces études étaient basées sur de l'identification et non de la quantification. En effet, un grand nombre de techniques quantitatives utilise l'ADN mitochondrial comme cible parce qu'il permet une plus grande sensibilité

de la méthode. Cependant, le problème de l'utilisation des gènes mitochondriaux comme marqueurs moléculaires pour la quantification d'ADN spécifique d'une espèce réside dans le fait qu'il existe un nombre variable de copies de ces gènes mitochondriaux que ce soit en fonction de l'espèce, de l'individu, de son âge ou de la nature du tissu d'extraction ([Alonso *et al.*, \(2004\)](#), [Bottero et Dalmasso, \(2011\)](#), [López-Andreo *et al.*, \(2005\)](#), [Lopparelli *et al.*, \(2007\)](#), [Masuyama *et al.*, \(2005\)](#)). A ce jour, pour effectuer de la quantification par PCR en temps réel, deux approches coexistent : la quantification relative par rapport à un gène de référence et la quantification absolue.

2. Contribution au domaine

L'ensemble des résultats décrits dans ce paragraphe est issu du travail de thèse de Daline BOJOLLY, dont les directrices de thèse sont Véronique VERREZ-BAGNIS et Urania CHRISTAKI. La doctorante est co-encadrée par Périne DOYEN et moi.

Ce projet s'appuie sur le développement de méthodes basées sur l'exploitation de fragments courts d'ADN retrouvés dans des produits très transformés tels que les conserves de thon.

Deux critères importants ont déterminé le choix des méthodes à mettre en œuvre :

- les méthodes doivent être quantitatives pour permettre de distinguer les contaminations croisées fortuites des substitutions volontaires (liées à l'utilisation d'outils communs à la fabrication de produits issus de différentes espèces de thon),
- les méthodes doivent être applicables à l'analyse de produits transformés par les procédés de fabrication, en particulier l'appertisation.

Sur cette base, la PCR quantitative (méthode de PCR en temps réel) est utilisée pour identifier et quantifier les espèces de thon présentes dans des produits transformés par le choix de sondes moléculaires spécifiques.

La finalité du projet consiste ainsi à mettre au point une méthode analytique de différenciation et de quantification des espèces de thon en conserves optimisée et par la suite transférée technologiquement au sein de la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues » (PFINV).

a. Modèle d'étude et sélection des échantillons

Trois modèles d'étude ont été choisis :

- Le thon Listao (*Katsuwonus pelamis*)
- Le thon albacore (*Thunnus albacares*)
- Le thon obèse (*Thunnus obesus*).

Ces espèces ont été sélectionnées, car ce sont les espèces les plus utilisées pour la fabrication des produits appertisés en industrie agroalimentaire.

Les échantillons biologiques sont fournis par PFINV suivant un plan expérimental prenant en compte l'origine géographique (océan Indien, Atlantique et Pacifique), ainsi que l'origine anatomique (tissus prélevés dans les parties ventrales et dorsales du même poisson).

Une autre partie des échantillons a été fournie par Véronique VERREZ de l'Ifremer Nantes.

b. Etude des marqueurs génétiques

i. Sélection des marqueurs génétiques

L'étude de produits appertisés faisant intervenir des contraintes de conservation de l'ADN, le choix s'est porté sur l'utilisation de l'ADN mitochondrial. Les marqueurs les plus couramment utilisés sont les marqueurs mitochondriaux tels que le gène codant pour la Cytochrome b (Cyt b), la NADH déshydrogénase sous-unité 1 (ND 1), la NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND 2), la D-Loop, l'ATP synthétase sous-unité 6 (ATP6), l'ATP synthétase sous-unité 8 (ATP8), la Cytochrome oxydase sous-unité 1 (COX I), la Cytochrome oxydase sous-unité 2 (COX II) et la Cytochrome oxydase sous-unité 3 (COX III).

ii. Création d'une base de données

Ce travail était nécessaire afin de répertorier et récupérer les séquences de gènes d'intérêt pour définir les amorces.

Afin de créer une base de données propre au projet, la recherche s'est portée sur les séquences des neuf gènes précités, et cela, pour chaque espèce sachant que seize espèces différentes correspondent aux substitutions constatées par les entreprises (voir **Tableau VII** page 84). Par conséquent, il a donc été nécessaire d'inclure les séquences de toutes ces espèces afin de pouvoir valider la méthode à utiliser. En d'autres termes, la méthode mise en place a permis l'identification des trois espèces modèles parmi les espèces les plus fréquemment substituées.

Les outils utilisés pour rechercher les séquences de gènes sont les bases de données telles que NCBI (Pubmed).

Cette étude a permis de récupérer 3636 séquences de gènes classées dans une base de données contenant les informations nécessaires pour la poursuite des travaux d'analyse des séquences des gènes d'intérêt (séquences partielles ou complètes...).

Ces séquences d'intérêt ont été alignées afin de déterminer les variations génétiques permettant l'identification précise des espèces de thon utilisées habituellement dans les produits appertisés.

iii. Variations intra-spécifiques pour une espèce

L'objectif de l'analyse des variations intra-spécifiques était d'éviter de dessiner les amorces dans ces régions. En effet, le but de l'étude est de pouvoir identifier une espèce donnée, et non un seul individu d'une espèce. Ces alignements ont été réalisés pour chaque espèce.

Les alignements ont été effectués à l'aide du logiciel d'alignement [Multalin](#), développé par Florence [Corpet, \(1988\)](#) de l'INRA. Il s'agit de l'un des logiciels les plus fréquemment utilisés pour réaliser les alignements de séquences.

Le résultat de ce travail a permis de connaître la position des régions contenant des variations intra-spécifiques à exclure pour l'étude.

iv. Variations interspécifiques entre les espèces

L'objectif de l'analyse des variations interspécifiques a consisté à sélectionner les régions discriminantes pour les amorces permettant de distinguer les espèces entre elles. Ici, les mêmes outils que précédemment cités ont été utilisés. Cependant, l'alignement a été réalisé avec les séquences ne contenant pas de variations intra-spécifiques (préalablement exclues). Les séquences génétiques des seize espèces ont ainsi été alignées entre elles.

Cette analyse des séquences a permis de mettre en évidence une similarité importante entre les espèces de thon. En effet, les différences notées étaient souvent liées à quelques nucléotides isolés.

Ainsi, il a été décidé d'utiliser la technique Taqman pour la PCR quantitative car cette technique est plus sensible. D'autre part, elle nécessite des sondes spécifiques en plus des amorces, ce qui permet de minimiser le risque de faux positifs.

v. *Sélection des gènes pour le dessin des amorces*

Le résultat des travaux réalisés ci-dessus a permis de sélectionner les marqueurs les plus cohérents pour l'étude. Il s'agit des gènes codant pour le Cytochrome b (Cyt b), la NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND2), la Cytochrome oxydase sous-unité 1 et 2 (COX I et COX II) et de l'ARN 16S.

vi. *Dessin des amorces et des sondes*

Lors de l'identification d'espèces *via* la technique de la PCR, il faut définir des amorces permettant d'identifier et de quantifier la présence des différentes espèces. Cependant, dans notre cas, le design (ou dessin) des amorces et des sondes se fait dans des régions limitées à quelques nucléotides.

Le logiciel de design [Primer3plus](#) a été utilisé pour cette étape. Ce logiciel prend en compte les données essentielles pour le design des amorces, tel que le calcul des températures d'hybridation en fonction de la taille des amorces, le pourcentage de G/C...

Ensuite, une étape de vérification de la position des amorces et des sondes a été effectuée. En outre, leurs spécificités ont été testées sur différentes espèces *via* le logiciel [Blast](#).

Le résultat de cette étude a permis de définir 22 couples d'amorces associés à des sondes, dont onze couples pour *K. pelamis*, neuf couples pour *T. albacares*, un couple pour *T. obesus* et un couple 16S universel aux espèces.

Dès lors, parmi les couples d'amorces et de sondes dessinés, sept couples de *K. pelamis*, quatre couples de *T. albacares*, le couple pour *T. obesus* et le couple 16S ont été sélectionnés pour débiter les expériences sur tissus.

c. *Optimisation de la méthode d'extraction d'ADN*

i. *Sur tissus crus*

Il a été nécessaire d'optimiser la technique d'extraction d'ADN, puisque les produits appertisés subissent des traitements thermiques importants. De ce fait, la quantité, la qualité, la pureté, ainsi que le rendement en ADN risquent d'être insuffisants dans ce type de produits. Par conséquent, la mise en place d'une technique d'extraction d'ADN optimale est impérative. Ainsi, une série de tests, utilisant différents kits et méthodes, a été réalisée. Ces tests ont été effectués en premier lieu sur des tissus frais afin d'évaluer la qualité des différents kits commerciaux. Après les avoir testés, les résultats ont montré que la méthode

d'extraction d'ADN la mieux adaptée à notre étude était celle développée par l'IFREMER de Nantes ([Jérôme et al., \(2003\)](#)).

ii. Sur tissus appertisés

L'ajout de saumure, d'huile, ou encore de sauce dans les produits appertisés ont pour effet d'inhiber la réaction de la PCR. Par conséquent, il a été nécessaire d'enlever ces inhibiteurs, et donc de développer un protocole permettant de les éliminer. Dès lors, des étapes de prétraitements ont été ajoutées pour les échantillons appertisés, avant extraction de l'ADN (séchage, lavage et rinçage).

Ensuite, il a fallu développer un protocole permettant la reproductibilité de la méthode, car, dans une même boîte de thon, des longes différentes peuvent coexister. Ainsi, afin d'éviter des prélèvements subjectifs, une étape de mixage du contenu des boîtes (en condition stérile) avant prélèvement des échantillons a été ajouté à la méthode d'extraction d'ADN.

d. Sélection des amorces et des sondes

i. Sélection des amorces

91 tests d'amorces ont été effectués sur tissus crus, permettant ainsi d'exclure les couples ne donnant pas des résultats satisfaisants. De plus, une étape de séquençage a été ajoutée afin de vérifier que les produits amplifiés par les amorces correspondaient bien à l'espèce étudiée, et donc de montrer l'efficacité des amorces.

Les tests effectués sur tissus crus ont ensuite été réalisés sur des boîtes issues du commerce, suivant le même protocole. Au cours de cette étape, nous avons vérifié que les amorces qui avaient fonctionné sur les tissus frais fonctionnaient également sur les tissus appertisés (voir **Tableau VIII** page 98).

ii. Sélection des sondes et identification de l'espèce

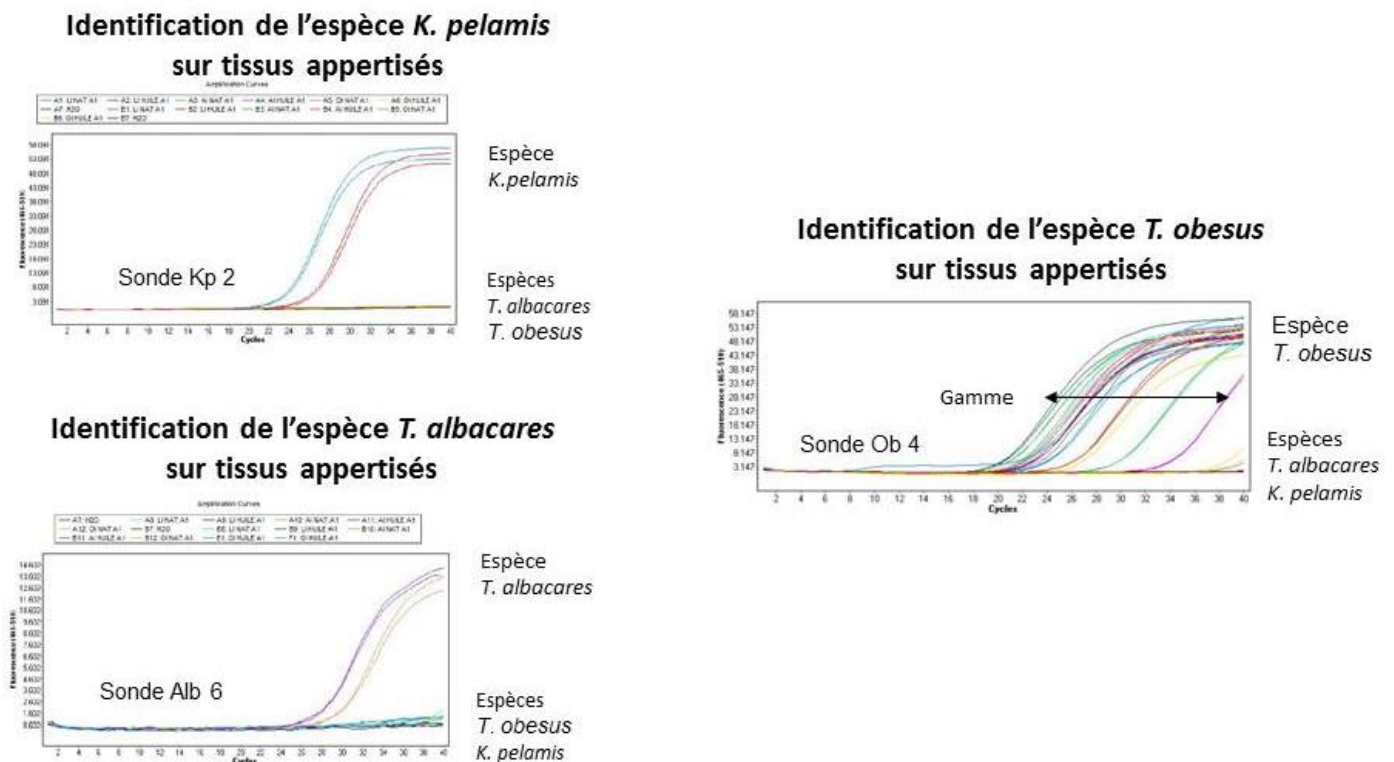
Pour les mêmes raisons que précédemment, il a fallu tester en amont les sondes sur les tissus crus. Les résultats des tests ont montré que sur les échantillons contenant 10 poissons *K. pelamis*, 10 poissons *T. albacares* et 10 poissons *T. obesus*, les sondes étaient fonctionnelles et spécifiques à l'espèce (voir **Tableau VIII** page 98).

De même, des résultats similaires ont été obtenus pour les tests qui ont été réalisés à partir des boîtes de thon fournies par PFINV contenant les trois espèces de l'étude.

Tableau VIII : séquences des amorces et des sondes utilisées pour les mesures par la PCR quantitative en temps réel

Nom	Gène cible	Séquence 5'-3'
F_Kpel_COII	Cytochrome Oxydase sous-unité 2	CGGACATCAATGATACTGAAGC
R_Kpel_COII		GGATTACTATTTCGGTGGTCTGC
P_Kpel_COII (6-FAM)		ACAAGACCTGGCCCCCGGTC
F_Talb_COII		CTCCCTCCCTACGCATTCT
R_Talb_COII		CACTATTTCGGTGGTCTGCTTC
P_Talb_COII (6-FAM)		ACGAAATCAACGACCCCCATCTAA
F_Tobe_NDII	NADH déshydrogenase sous-unité 2	CTAGCCACCTCCTGAGCAA
R_Tobe_NDII		GCCAGGTCTTGTTTGTACAGT
P_Tobe_NDII (6-FAM)		TTCTTCTGTCCCTAGGCGGTCTTCCA

Ces résultats démontrent que malgré l'impact de l'appertisation sur l'ADN, les sondes obtenues sont spécifiques. Ainsi, les trois espèces de l'étude (Listao, obèse, albacore) ont pu être différenciées et ainsi identifiées à partir des produits appertisés (voir **Figure 15** ci-dessous).

**Figure 15** : identification des espèces *Katsuwonus pelamis*, *Thunnus albacares* et *Thunnus obesus* par PCR sur tissus appertisés

iii. Quantification des espèces

La première approche a été d'effectuer des mélanges « théoriques » issus d'ADN extraits. Par la suite, les tests ont été réalisés à base de boîtes contenant un mélange de différentes espèces dans des proportions connues.

Pour cela, la méthode de la PCR quantitative a été utilisée. Les résultats des tests réalisés sur les deux espèces de thon *Thunnus albacares* et *Thunnus obesus* ont démontré que les sondes en présence d'un mélange étaient fonctionnelles et permettaient de quantifier la présence de ces espèces.

Deux méthodes de quantification ont été utilisées, sachant que l'ensemble des essais réalisés a permis de conclure que ces méthodes étaient statistiquement représentatives :

α. Méthode basée sur la quantification absolue

Cette méthode a consisté à comparer directement les pourcentages de thon albacore et de thon obèse en mélange (**Figure 16** ci-dessous). Les pourcentages sont donc obtenus de façon absolue comparativement aux proportions de thon obèse par rapport au thon albacore. La limite de cette méthode réside dans le fait que ce calcul n'est valable que pour des boîtes ne contenant que du thon albacore ou obèse en mélange ou non.

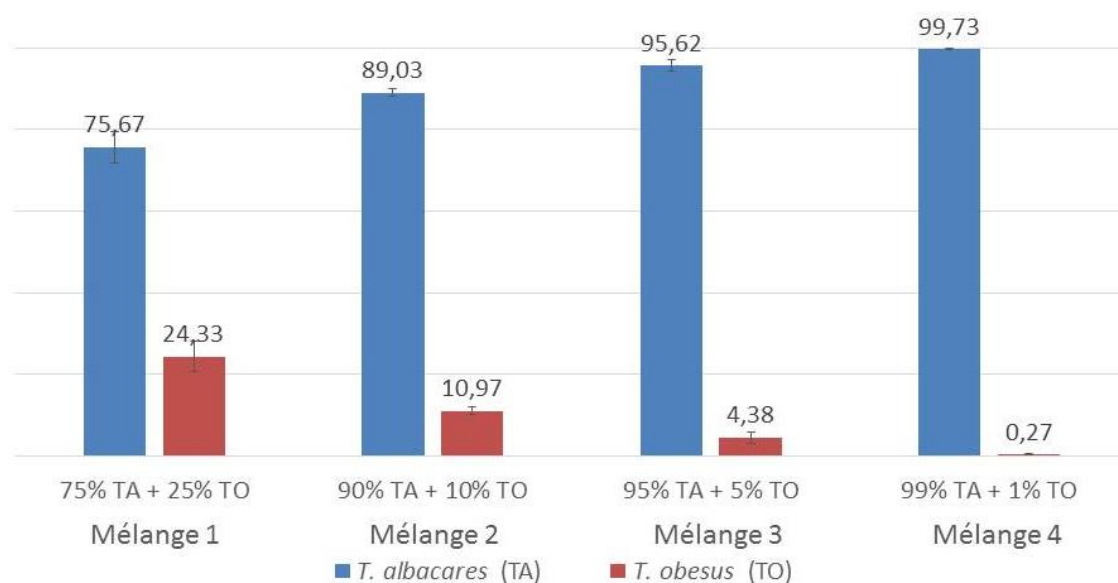


Figure 16 : quantification des espèces *Thunnus albacares* et *Thunnus obesus* en mélange dans des boîtes de conserves

Les boîtes de conserves ont été élaborées par Plateforme « Nouvelles Vagues ». 4 boîtes de conserves ont été testées pour chaque mélange et chaque mélange a fait l'objet de 4 répétitions. Les histogrammes représentent le pourcentage moyen obtenu pour chaque espèce après quantification par la méthode Taqman. Les résultats ont été analysés statistiquement selon le test du chi2 : les valeurs mesurées sont significatives et de même ordre de grandeur que celles attendues

β. Méthode de quantification relative

La seconde, issue d'une méthode de quantification relative par rapport à un gène de référence, a consisté à comparer les pourcentages de thon albacore et de thon obèse en mélange en prenant comme référence le gène ubiquitaire de l'ARN 12S

en se basant sur la méthode utilisée par [Iwobi et al., \(2015\)](#). Cette méthode permet de se dédouaner du problème lié au nombre variable de copies des gènes mitochondriaux d'un individu à l'autre ([Bottero et Dalmaso, \(2011\)](#)). Les résultats obtenus montrent que le calcul des pourcentages en utilisant la sonde spécifique de *Thunnus obesus* permet de procéder à une quantification de façon précise. Par contre, le résultat escompté n'est pas satisfaisant en utilisant la sonde *Thunnus albacares*. La référence que nous utiliserons sera donc constituée de la sonde du thon obèse. Grâce à cette méthode de quantification, nous serons en mesure de quantifier la part de thon obèse dans une boîte de thon prise au hasard et de déterminer le pourcentage d'une ou des différentes espèces en présence.

La méthode de quantification, que nous nous emploierons à transférer à la Plateforme d'innovation « Nouvelles Vagues », s'effectuera en deux temps. La première étape consistera à identifier l'échantillon en utilisant les trois sondes spécifiques aux thons albacore, obèse et Listao. Si cette première étape indique un mélange d'espèces, la deuxième étape consistera à utiliser une quantification relative en se référant à la sonde du thon obèse.

e. Etude sur des espèces différentes du thon

Des analyses ont été réalisées sur des espèces de poisson différentes des thons dans le but de vérifier que les sondes sont uniquement spécifiques des espèces de thon. Les espèces nous ont été fournies par Plateforme d'innovation « Nouvelles Vagues ». Il s'agit des espèces suivantes : le rouget barbet cinnabare (*Parupeneus heptacanthus*), le saumon Atlantique (*Salmo salar*), le merlan (*Merlangius merlangus*), le cabillaud (*Gadus morhua*), la sole (*Solea solea*), le flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*), l'espadon (*Xiphias gladius*), le colin d'Alaska (*Theragra chalcogramma*) et le lieu noir (*Pollachius virens*). Aucune de ces espèces testées n'a permis d'obtenir d'amplification par PCR en temps réel. Ces résultats montrent que les sondes élaborées sont chacune très spécifique aux trois espèces de thon Listao, obèse et albacore qui avaient été ciblées.

f. Etude sur les boîtes de conserve du commerce

Des boîtes de thon du commerce ont été achetées afin d'une part de déterminer si la méthode était applicable à des boîtes élaborées dans différentes entreprises de la filière et d'autre part de vérifier l'absence de mélange d'espèces et le bon

étiquetage de ces boîtes de conserve commerciales. L'échantillonnage portait sur trente boîtes. Il s'est avéré que sur ces trente boîtes achetées au hasard, six ont posé un problème d'étiquetage (voir **Tableau IX** ci-dessous).

Tableau IX : valeur moyenne des cycles seuil et des droites standard obtenues pour les produits frais et les conserves pour l'identification de chaque espèce spécifique

	Information sur la marque et code (CTSx : comercial tuna sample x)	<i>K.pelamis</i> COII		<i>T.albacares</i> COII		<i>T.obesus</i> NDII		
		Valeurs moyennes des cycles seuil	Droite standard	Valeurs moyennes des cycles seuil	Droite standard	Valeurs moyennes des cycles seuil	Droite standard	
Conserves (produits commerciaux)	<i>K. pelamis</i>	CTS1	24,61	0,05	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS2	24,77	0,28	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS3	23,92	0,04	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS4	23,29	0,37	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS5	22,66	0,30	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS6	20,31	0,76	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS7	23,81	0,10	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS8	25,05	0,72	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS9	24,76	0,68	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS10	29,54	0,73	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS11	22,43	1,37	a.v	a.v	a.v	a.v
	<i>T. albacares</i>	CTS12	29,91	0,40	31,58	0,83	a.v	a.v
		CTS13	28,60	0,80	31,43	0,11	a.v	a.v
		CTS14	29,43	0,99	28,18	0,85	a.v	a.v
		CTS15	25,81	0,24	29,41	0,11	a.v	a.v
		CTS16	27,61	1,06	33,35	0,86	a.v	a.v
		CTS17	a.v	a.v	34,65	0,08	a.v	a.v
		CTS18	a.v	a.v	a.v	a.v	25,54	0,17
		CTS19	a.v	a.v	29,60	0,30	a.v	a.v
		CTS20	a.v	a.v	32,30	0,17	a.v	a.v
		CTS21	a.v	a.v	32,79	0,35	a.v	a.v
		<i>T. obesus</i>	CTS22	a.v	a.v	a.v	a.v	25,06
	CTS23		a.v	a.v	a.v	a.v	26,45	0,16
	CTS24		a.v	a.v	a.v	a.v	24,48	0,19
	CTS25		a.v	a.v	a.v	a.v	26,20	1,10
	CTS26		a.v	a.v	a.v	a.v	25,60	0,74
	CTS27		a.v	a.v	a.v	a.v	a.v	a.v
	<i>T. alalunga</i>	CTS28	a.v	a.v	a.v	a.v	a.v	a.v
		CTS29	a.v	a.v	a.v	a.v	a.v	a.v
	Inconnu fourni par PFNI	CTS30	22,89	0,06	a.v	a.v	a.v	a.v

Correct
Incorrect

a.v : aucune valeur.

K. pelamis (Listao); *T. albacares* (albacore); *T. obesus* (obèse); *T. alalunga* (germon)

COII : gène codant pour la cytochrome oxydase sous unité 2

ND2 : gène codant pour la NADH déshydrogénase sous-unité 2

Ce problème concerne uniquement les boîtes étiquetées « albacore ». Pour cinq de ces boîtes, nous avons constaté un mélange de deux espèces : albacore associé à du Listao. Pour l'une d'entre elles, l'étiquetage était erroné puisqu'il indiquait qu'il s'agissait de thon obèse. Ce prélèvement n'a rien de statistique mais après en avoir discuté avec les industriels de la filière, nous allons entreprendre avec l'aide de Plateforme Nouvelles Vagues un plan de contrôles suite aux non conformités détectées. Ce plan sera basé sur un échantillonnage représentatif à la fois des espèces, des marques et des usines de la filière. Cela permettra de revoir très certainement les process de fabrication des boîtes afin de résoudre ce problème de mélanges ou de mauvais étiquetage.

3. Conclusion

Les travaux menés par Daline BOJOLLY font l'objet de la rédaction d'une publication qui sera soumise à Plos-one au printemps 2016 (voir **Annexe 5** page 233 : article en cours de rédaction à la date du 28 mars 2016). L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail est en cours de transfert au sein de la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues » (PFINV). Ce travail a un impact économique conséquent dans un contexte de nécessité d'apport de preuves scientifiques liées à l'authenticité des produits aquatiques.

Une autre piste a été explorée. Elle consiste à utiliser la technologie des puces à ADN au sein de la plateforme Identypath du laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses à Maisons-Alfort.

La « digital PCR » est une technique très sensible de quantification qui permet la détermination de copies d'ADN cibles sans effectuer de courbe d'étalonnage au préalable. Cette amélioration a été rendue possible grâce à la division de l'échantillon sur des puces micro-fluidiques ou micro-gouttelettes jusqu'au stade ultime de la copie unique de l'acide nucléique cible ([Coudray-Meunier et al., \(2015\)](#)). Cette technique a été testée par Daline BOJOLLY sous la responsabilité de Patrick FACH, responsable de la plateforme Identypath, afin de discriminer le thon obèse du thon albacore. Les premiers résultats prometteurs méritent d'être étudiés plus avant.

V. Flore utile

A. Travaux de recherche concernant *Isochrysis galbana*

1. Contexte et état de l'art

Dans le cadre du CPER MARCO et plus particulièrement de l'axe 3 de ce projet intitulé « Productivité et durabilité des ressources halieutiques et aquacoles », l'une des thématiques de recherche porte sur la substitution des proies classiques de l'aquaculture de type artémie (*Artemia salina*) par les copépodes. Nous nous sommes rapprochés de l'équipe du professeur Sami SOUISSI du Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG) localisé à Wimereux afin d'étudier la composition biochimique de la nourriture des copépodes dans le but d'explorer d'autres pistes de valorisation des cultures planctoniques à promouvoir en aquaculture.

Les copépodes constituent une source très riche d'aliments vivants dans l'industrie de l'aquaculture. Les espèces du genre *Acartia* sont considérées comme des proies idéales d'un grand nombre de larves de poisson. Des travaux récents menés par [Pan et al., \(2014\)](#) montrent que l'alimentation du copépode *Acartia bilobata* par la seule algue *Isochrysis galbana* constitue le régime le plus favorable pour la production d'œufs et la durée de vie de la femelle de cette espèce de copépode. Ces résultats montrent qu'*Acartia bilobata* nourri avec *Isochrysis galbana* constitue un potentiel considérable pour la culture de larves de poisson.

La microalgue *Isochrysis galbana* constituant une source de nutriments très importante pour les copépodes (*Acartia bilobata*), nous avons apporté nos compétences dans la caractérisation biochimique de molécules d'intérêt (polysaccharides et lipides polyinsaturés) isolées de cette microalgue.

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques unicellulaires qui jouent un rôle important en termes de producteurs primaires dans la plupart des réseaux trophiques aquatiques. Elles se caractérisent par une grande diversité et par leur richesse en composés naturels pouvant être utilisés en biotechnologies et en thérapeutique ([Borowitzka, \(2013\)](#) ; [Guedes et al., \(2011\)](#) ; [Raja et al., \(2008\)](#)). Ces microalgues ont la capacité de convertir les matières inorganiques en matière organique riche en lipides, protéines, glucides et autres molécules. En raison de

leur haute valeur nutritionnelle, les microalgues sont largement utilisées en aquaculture en tant que nourriture pour les mollusques, le zooplancton et enfin les crustacés et les alevins au cours des premiers stades de leur développement ([Hemaiswarya et al., \(2011\)](#)). Parmi les microalgues, l'espèce *Isochrysis galbana* est connue pour sa bonne qualité nutritionnelle et sa teneur élevée en acides gras polyinsaturés, ce qui lui confère un intérêt croissant en aquaculture ([Liu et Lin, \(2001\)](#) ; [Sánchez et al., \(2000\)](#) ; [Yoshioka et al., \(2012\)](#)). Elle présente également des effets bénéfiques pour la santé humaine dans la mesure où elle constitue une bonne source de substitution à l'huile de poisson ([Batista et al., \(2013\)](#) ; [Yu et al., \(2010\)](#)). De plus, cette microalgue, utilisée comme aliment, présente des effets curatifs prometteurs puisqu'elle induit une perte de poids ainsi qu'une diminution du taux de glucose et des taux de triglycérides et de cholestérol chez des rats diabétiques ([Nuño et al., \(2013\)](#)). Son intérêt ne se limite pas qu'à l'agroalimentaire puisque la culture d'*Isochrysis galbana* a également été explorée dans le cadre de la production de biodiesel ([Sánchez et al., \(2013\)](#)).

L'embranchement des Haptophyta, auquel se rattache la microalgue *Isochrysis galbana*, forme, avec celui des Ochrophyta (diatomées) et des Dinophyta (dinoflagellés), l'un des trois principaux groupes eucaryotes phytoplanctoniques marins. Les haptophytes sont unicellulaires et appartiennent majoritairement au nano-phytoplancton (voir la thèse de Stéphanie [Godet, \(2008\)](#)).

Le genre *Isochrysis* appartient à l'ordre des Isochrysidales, défini par Pascher en 1910. L'espèce *galbana* a été identifiée pour la première fois par Bruce, Knight et Parke en 1939 ([Parke, \(1949\)](#)). C'est une algue mobile, recouverte d'écailles organiques, qui possède deux flagelles lisses, égaux et dont l'haptonème (appendice multi-fonctionnel situé entre les deux flagelles qui jouerait un rôle dans la détection de l'environnement extérieur) est réduit. Elle est ainsi facilement assimilée par les larves animales du fait de sa petite taille (4 à 7 µm) et de l'absence d'une paroi cellulaire épaisse ([Jeffrey et al., \(1994\)](#) ; [Liu et Lin, \(2001\)](#)). Parmi les différentes souches d'*Isochrysis galbana* ([Durmaz et al., \(2008\)](#)), celle qui est la plus cultivée est constituée de la souche tahitienne « T-iso » ([Marchetti et al., \(2013\)](#)). Cette microalgue se caractérise par un taux de croissance rapide dans des gammes de température et de salinité larges et sans production de toxines ([Jeffrey et al., \(1994\)](#)). Comme pour toutes les microalgues,

la croissance et la composition biochimique des cultures d'*Isochrysis galbana* est dépendante des conditions de cultures en termes de nutriments, de température, de salinité et de la photopériode ([Marchetti et al., \(2012\)](#)). *Isochrysis galbana* possède une concentration importante de polysaccharides solubles et insolubles, de protéines ainsi que d'acides gras polyinsaturés ([Sánchez et al., \(2000\)](#)). Les constituants glucidiques d'*Isochrysis galbana* représentent environ 13 % de la matière sèche et sont constitués d'un mélange complexe de polymères contenant du glucose, du galactose, du mannose, du xylose, de l'arabinose, du fucose et du rhamnose dans des proportions variables ([Chu et al., \(1982\)](#) ; [Batista et al., \(2013\)](#)).

[Sun et al., \(2012\)](#) ont été les premiers à caractériser les polysaccharides intracellulaires et extracellulaires d'*Isochrysis galbana*. Ces polysaccharides ont été analysés par spectroscopie UV et infrarouge et ils ont été testés pour leur activité antibactérienne. [Yu et al., \(2010\)](#) ont montré qu'une préparation brute de polysaccharides extraits d'*Isochrysis galbana* exerçait des propriétés immunomodulatrices par le biais de l'induction de l'interleukine-1 dans les macrophages murins. Notre travail a consisté à isoler et à caractériser la structure d'un β -D-glucane hautement ramifié provenant d'*Isochrysis galbana* et à explorer les propriétés immuno-stimulatrices de ce glucane et ses effets cytotoxiques vis-à-vis d'une lignée cancéreuse humaine (lignée des monocytes humains U937).

2. Contribution au domaine

3. Composition en polysaccharides de l'algue *Isochrysis galbana*

L'ensemble des résultats décrits dans ce paragraphe est issu d'un travail en partenariat avec l'équipe du Professeur Sami SOUISSI de l'université de Lille. Irina SADOVSKAYA, Philippe LENCEL et moi avons contribué à cette étude.

Après avoir fait croître l'algue *Isochrysis galbana* dans les conditions optimales, les cellules ont été obtenues par centrifugation puis déshydratées et dégraissées par trempage dans l'alcool. L'hydrolyse acide de la biomasse dégraissée a permis d'obtenir environ 15 % de glucose et environ 0,6 % de chacun des sucres suivants : l'arabinose, le xylose et le galactose. Les polysaccharides ont été extraits de la biomasse dégraissée en utilisant de l'eau chaude en présence de chlorure de calcium (CaCl_2). La préparation brute de polysaccharides a été

séparée en deux par chromatographie d'échanges d'anions : la première fraction neutre (environ 70 %) était exclusivement composée de glucose alors que la deuxième fraction chargée négativement était composée d'acides uroniques (environ 4 %), d'arabinose, de xylose et de galactose selon un rapport molaire de 5 : 1 : 1,5.

4. Purification et caractérisation de la structure du β -D-glucane

La structure chimique détaillée du polysaccharide neutre a été établie par spectroscopie RMN, puis analyses par méthylations et spectrométries de masse ESI et MALDI-TOF avant et après dégradation de Smith. Ces différentes techniques ont permis de caractériser le β -D-glucane selon la **Figure 17** ci-dessous.

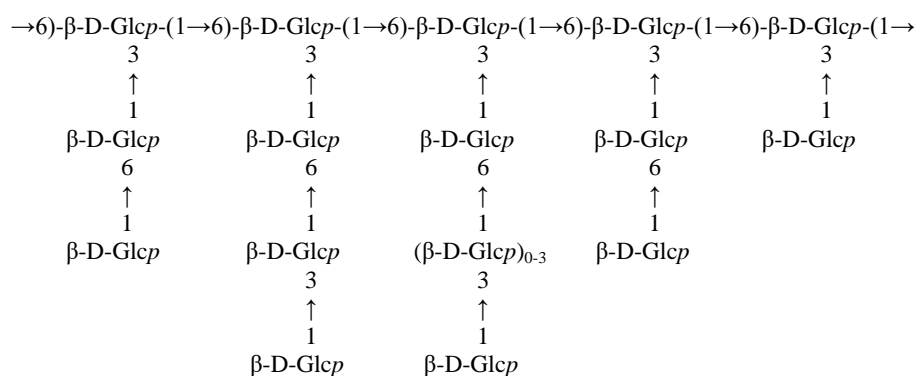


Figure 17 : structure chimique du β -glucane d'*Isochrysis galbana*

Le glucane présente une unité de répétition constituée d'un squelette de cinq résidus de glucose liés en β -1,6, sur lesquels viennent se greffer un résidu de glucose lié en β -1,3 lui-même substitué en C-6 par un glucose simple ou par de courtes chaînes oligosaccharidiques (tétrasaccharide au maximum). La structure du β -D-glucane caractérisé à partir d'*Isochrysis galbana* a permis de vérifier que ce glucane diffère de la plupart de ses analogues structuraux constitués des laminaranes, de par la structure de son squelette, de ses chaînes latérales et de leur degré de branchement.

5. Effet biologique du β -D-glucane caractérisé

Les β -glucanes de type (1,3 ; 1,6) sont des polysaccharides que l'on rencontre communément chez les algues appartenant au règne des chromistes (*Chromista*). Les glucanes de ce type les plus étudiés sont les laminaranes des algues brunes. La majorité des laminaranes contiennent un squelette linéaire constitué de glucoses liés en β -1,3 et substitués par un certain nombre de résidus de glucose

liés en C6 sur le squelette carboné ([Percival et McDowell, \(1967\)](#)), bien qu'il existe des exemples de laminaranes contenant à la fois des liaisons de type (1,3 ; 1,6) sur le squelette principal ([Maeda et Nisizawa, \(1968\)](#)). D'autres familles d'algues peuvent contenir des β -glucanes qui diffèrent considérablement des laminaranes dans les ratios et les types de résidus liés en 1,3 ou en 1,6 ([Usov et Zelinsky, \(2013\)](#)). De nombreux glucanes principalement constitués de résidus de glucose liés en 3 ou en 6 ont été caractérisés à partir de bactéries, d'algues ou de champignons et ont été étudiés en tant que molécules présentant potentiellement une activité biologique ([Bacic et al., \(2009\)](#)). Cette activité biologique est dépendante du taux de branchement des liaisons 1,3 ou 1,6 et de la longueur de la chaîne oligosaccharidique mais aussi et surtout de la capacité des glucanes linéaires de haut poids moléculaire à adopter une conformation en triple hélice en solution ([Sletmoen et Stokke, \(2008\)](#)). De ce fait, les deux polysaccharides suivants : le scléroglycane et le schizophyllane se sont avérés être des immunomodulateurs plus efficaces que les laminaranes du fait de leur interaction plus importante avec les récepteurs de la lignée cellulaire de type monocyte humain U937 spécifiques aux glucanes liés en β -1,3 ([Mueller et al., \(2000\)](#)).

Comme la structure du β -D-glucane caractérisé à partir d'*Isochrysis galbana* diffère de la plupart de ses analogues structuraux connus de par la structure de son squelette, de ses chaînes latérales et de leur degré de branchement (voir **Figure 17** page 106), nous nous sommes intéressés à l'étude de son activité biologique potentielle.

Nous avons étudié la capacité du β -D-glucane, purifié à partir d'*Isochrysis galbana*, à inhiber la prolifération de cellules leucémiques myéloïdes U937 d'origine humaine. Cette propriété est similaire à la fois à l'action inhibitrice d'un fragment oligosaccharidique de laminarane extrait de l'algue brune Aramé (*Eisenia bicyclis*) qui contient une proportion importante de liaisons 1,6 ([Pang et al., \(2005\)](#)) ainsi qu'à l'activité anti-tumorale de laminarane native extrait de cette algue, qui peut inhiber la croissance de cellules du mélanome humain SK-MEL-28 ou du cancer du colon DLD-1 ([Ermakova et al., \(2013\)](#)). Cette observation suggère que le β -D-glucane caractérisé à partir d'*Isochrysis galbana* pourrait exercer un effet anti-tumoral à l'encontre de cellules cancéreuses myéloïdes (voir **Figure 18** page 108).

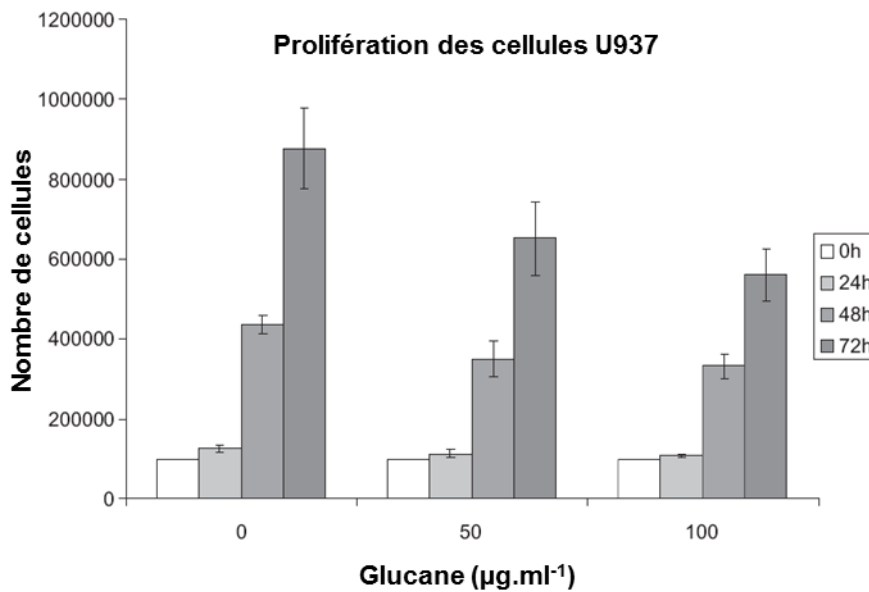


Figure 18 : croissance des cellules U937 à différentes concentrations de β -D-glucane (0, 50 et 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

6. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont fait l'objet d'une publication auprès du journal « Carbohydrate polymers » en 2014 (voir **Annexe 4** page 221).

Les travaux initiés sur les polysaccharides ont donné lieu à une suite. L'étude en cours porte sur la composition biochimique brute (polysaccharides, lipides, protéines) en termes de valeur nutritionnelle d'extraits d'*Isochrysis galbana* à différents stades de croissance. Le but de ce travail consiste à optimiser la culture de l'algue afin d'obtenir des rendements maximaux en termes de phytonutriments intéressants tels que des lipides polysaturés.

VI. Projets de recherche déposés et/ou financés

L'ensemble des thématiques décrites ci-dessus s'inscrit non seulement dans le projet scientifique du laboratoire mais a bénéficié de financements suite à des réponses à projets, dont j'ai activement et principalement contribué au portage.

A. **Projet Nécroptose (2012 -2014)**

Le projet Nécroptose de la thématique 1 est un *projet émergent de la région Nord Pas de Calais* financé de 2012 à 2014 pour un montant de subvention s'élevant à 34200 € sur 3 ans. Ce projet portait sur l'étude de méthodes pour déterminer la fraîcheur, l'altération et la différenciation frais/décongelé des filets de poissons : la nécroptose : approche biochimique et physiologique de l'altération de la chair de poisson liée au choc congélation/décongélation. Un article portant sur le potentiel de la lactate déshydrogénase en tant que marqueur d'altération du poisson a été soumis en juillet 2015 à Food Chemistry (voir **Annexe 2** page 183).

B. **Projet FUI IDThon (2013-2016)**

Le projet FUI (type de projet présenté spécifiquement par les pôles de compétitivité : montage du projet avec le pôle Aquimer) IDThon s'inscrit dans la thématique 3 (financement état-région de 2013 à 2016) pour un montant de subvention état Région et BpiFrance s'élevant à 83580 €. Ce projet consiste à « l'IDentification et à la quantification des espèces de Thon dans les conserves appertisées » (voir paragraphe iii page 41).

C. **Du projet FUI Resasc (2015-2018) non retenu vers deux projets complémentaires PartenAIRR (2016- 2017) et ANR (N3S) (2015- 2018)**

Le projet FUI Resasc portait sur la substitution des sulfites dans le process de cuisson des crevettes. Il s'agissait d'un projet FUI en lien d'une part avec le pôle Aquimer et de ce fait il intégrait deux entreprises de cuisson de crevettes en France, et d'autre part avec l'Anses Boulogne, le laboratoire « Probiogem » de Lille 1 et l'équipe Biochimie des Produits Aquatiques de l'ULCO. Suite à sa non sélection en tant que projet FUI en 2014, ce projet a été scindé en deux et a fait l'objet d'un dépôt de projet ANR « N3S » (voir paragraphe page 111). L'autre partie du programme a été rédigé dans le cadre des nouveaux dispositifs de

financements régionaux « AIRR » mis en place en 2015. Cette partie du projet porte sur la purification et la caractérisation des enzymes responsables du brunissement enzymatique des crevettes, les phénoloxydases... Ce projet a d'ores et déjà fait l'objet du recrutement d'un post-doctorant, Cédric LE BRIS, qui a travaillé du 1^{er} janvier au 31 décembre 2014 en tant que post-doctorant de l'ULCO sur un support ATER. Il a été recruté par Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues du 1^{er} janvier au 30 juin 2015 pour continuer ses travaux de recherche au sein de l'ULCO sur ce même projet. Ses travaux ont donné lieu à une publication au « Journal of Agricultural and Food Chemistry » acceptée en décembre 2015 (voir **Annexe 3** page 211). Nous avons appris en juillet dernier que le projet RESASC avait été officiellement retenu par la région pour un début de programme en janvier 2016. Le financement de ce projet s'élève à 87500 € sur deux ans.

D. Projets FranceAgrimer *Altfish* et *Survib*

1. *Altfish*

Il s'agit d'un projet FranceAgrimer déposé en novembre 2013 qui porte sur la continuité du projet nécroptose. Il a pour but de développer et comparer des méthodes pour déterminer des marqueurs précoces d'altération des filets de poisson. L'ULCO est coordinateur de ce projet. J'en suis le chef de file et nous avons obtenu un financement de FranceAgrimer de 88124,92 € dont 16748 € pour l'unité BPA (QSA ULCO). Nos partenaires sont l'Anses, l'université d'Artois et la Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues.

2. *Survib*

Cet autre projet FranceAgrimer déposé en novembre 2013 porte sur les *Vibrio* potentiellement pathogènes à l'état viable mais non cultivables et sur l'étude de leur capacité à survivre dans les environnements hostiles et leur retour à l'état viable sous des conditions favorables. L'Anses est coordinatrice de ce projet. L'unité BPA (QSA ULCO) a obtenu un financement de FranceAgrimer de 10000 €. Nos partenaires sont l'Anses, l'Institut Pasteur de Paris, la confédération des industries de traitement des produits de pêches maritimes (CITPPM) et le syndicat général des mareyeurs.

E. Dépôts de pré-projets ANR pour 2015

1. N3S (voir paragraphe VI.C page 109: projet RESASC) (2015-2018)

Le projet ANR N3S a été déposé suite à la non sélection du projet FUI sulfites en 2014. Il portait sur la recherche de solutions alternatives à l'utilisation des sulfites pour la prévention de la mélanose des crevettes : N3S. Il reprend les partenaires du précédent projet à savoir : l'Anses, l'Institut VIOLLETTE de Lille, l'unité BPA (QSA ULCO) et un cuiseur de crevettes boulonnais. La subvention sollicitée pour l'unité BPA (QSA ULCO) s'élève à 30000 € de fonctionnement, le recrutement du contractuel étant pris en charge par l'Université de Lille 1. Ce projet n'a finalement pas été retenu par l'ANR.

2. Seafood4kids (2015-2018)

Le projet Seafood4kids résultait du partenariat initié par Pierrette ETHUIN concernant les « serious games » qu'elle a développés en microbiologie. Le consortium était constitué de laboratoires spécialisés en management et consommation infantine (université de Poitiers) et en sciences de l'éducation et ludologie (université de Lille1) ainsi que des différentes équipes de l'Institut Charles VIOLLETTE travaillant sur la qualité et la sécurité des aliments : Lille 1, Artois et ULCO. Le projet s'intitulait : « Analyzing the tensions between food cultures, safety and perceived risks in order to promote responsible consumption and acceptance of product innovation ». Il se focalisait sur l'alimentation à base de poissons à destination des pré-adolescents. Il portait en effet sur l'analyse des tensions entre cultures alimentaires, sécurité et risques perçus pour éduquer à une consommation responsable. Il était dirigé par Inès De La Ville et je coordonnais avec Pierrette ETHUIN la partie boulonnaise. Plus particulièrement, la tâche de l'unité BPA (QSA ULCO) devait consister à développer des méthodes scientifiques d'évaluation de la qualité de produits aquatiques à destination des enfants et à participer à l'évaluation des effets des messages informationnels scientifiques et techniques (halioauthenticité, fraîcheur, méthode de production, avis sanitaires, labels et marques...) en apportant notre expertise. Ce projet, finalement non retenu par l'ANR, avait reçu un avis favorable des experts scientifiques du Pôle de compétitivité Aquimer. Son originalité tenait entre autre dans sa pluridisciplinarité.

F. Projet ICV Aqua

J'ai participé à la rédaction du projet ICVAQUA en décembre 2014. Ce projet résulte de l'Appel à projet de recherche de la région Nord Pas de Calais portant sur l'Analyse en Cycle de Vie et nouveaux modèles de développement. Il se dénomme : Développement d'Inventaires du Cycle de Vie de produits aquatiques (ICVAQUA). Cet appel à projets a pour but de faire monter en compétences les équipes de recherche de la région dans le domaine de l'analyse du cycle de vie. Le pôle Aquimer m'avait contacté pour y répondre. Il m'a semblé indispensable d'y participer pour intégrer désormais cette problématique à l'ensemble de nos sujets de recherche. Cette démarche est valorisable par des publications dans des journaux internationaux à comité de lecture et peu de résultats ont été publiés dans le domaine de la valorisation des produits aquatiques. C'est ce qui a motivé le dépôt de ce projet pour lequel le pôle Aquimer et le cabinet spécialisé dans les ACV « Cycleco » sont partenaires. Ce projet a obtenu un avis favorable et il est financé par la région à compter du 1^{er} octobre 2015. La subvention obtenue pour l'unité BPA (QSA ULCO) s'élève à 23210 € dont 18000 € d'achat de licences de logiciel et bases de données pour constituer les inventaires de cycles de vie (ICV). C'est Pierrette ETHUIN qui est la référente de ce projet au sein de l'unité.

Perspectives scientifiques et projets

I. Principales perspectives de recherches

A. *Thématique altération fraîcheur*

Les travaux préalablement initiés sur la thématique fraîcheur portaient d'une part sur la différenciation frais/décongelé et d'autre part sur la détermination de l'état de fraîcheur par le biais de l'étude d'activités enzymatiques et en particulier de la lactate déshydrogénase. Afin d'apporter de nouvelles réponses à la problématique fraîcheur, développée au sein de l'équipe par Philippe LENCEL et Denis WATIER, consistant à fournir des solutions rapides et efficaces aux industriels de la filière pêche fraîche, nous nous intéressons à la recherche de marqueurs précoces de l'altération du poisson et en particulier aux « mitotrackers ». Nous avons obtenu un financement de thèse depuis novembre 2015 pour développer cette étude. Cette thèse est financée pour moitié par le pôle métropolitain Côte d'Opale et pour moitié par la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues ».

1. *Contexte*

Ce projet est dédié à développer et à expérimenter des outils d'évaluation de la fraîcheur des filets poissons afin de proposer :

- des méthodes de référence qui pourraient être pratiquées en laboratoire et proposées dans le cadre d'expertises ou de contrôles officiels,
- des méthodes rapides de caractérisation de la fraîcheur des filets de poisson pouvant être utilisées par les professionnels.

Les objectifs du projet sont d'ordre scientifique, technique, économique et stratégique. La mise en œuvre d'une méthode rapide associée à une méthode de référence permettra de définir des critères objectifs de fraîcheur utilisables dans le cadre des transactions commerciales entre les différents professionnels de la filière et dans le cadre des plans de contrôle qualité à réception des matières premières. Plus globalement, pour les industriels et les distributeurs, l'enjeu relève de la connaissance des produits et de la clarté des transactions.

Cette double approche va permettre d'engager des actions de recherche nécessaires pour améliorer les connaissances sur les phénomènes de dégradation du tissu musculaire du poisson mais aussi de répondre de manière appliquée aux besoins des professionnels.

Le développement de nouveaux outils d'évaluation de la fraîcheur a été jugé comme une thématique prioritaire par le Pôle de compétitivité AQUIMER dans le cadre de sa feuille de route stratégique. Par ailleurs, les professionnels ont récemment exprimé des attentes très fortes pour disposer d'un test rapide et fiable d'évaluation de la fraîcheur, au cours d'une journée d'information organisée par le pôle AQUIMER sur la fraîcheur du poisson (Journée « Poisson frais, décongelé, double congelé : Quelles méthodes d'évaluation ? Organisée le 27 novembre 2012 à Boulogne-sur-Mer). Ceci a aussi été souligné lors d'une réunion d'information sur les produits de la pêche organisée sur le site de l'Anses de Boulogne sur mer le 28 août 2013 où étaient présents différents intervenants de la filière (syndicats, DGAL, FranceAgriMer, pôle Aquimer, autorités portuaires, organismes de recherche...). Le GIS « Campus de la mer » a inscrit dans ses axes de recherche prioritaires cette problématique et soutient ce projet.

2. Objectifs

La perte des caractéristiques de la chair de poisson lors de l'altération est liée à une nécrose tissulaire, fortement dépendante de la température. La nécrose est typiquement la conséquence de la perturbation aiguë du métabolisme cellulaire et tissulaire liée en partie à la déplétion en ATP ([Chomnawang et al., \(2007\)](#), [Ocaño-Higuera et al., \(2011\)](#)). Elle se caractérise par une dépolarisation mitochondriale ([Bonora et al., \(2015\)](#), [Kroemer et al., \(2007\)](#)) et une rupture lysosomique à l'origine de fuites d'électrolytes. Ces événements vont conduire de façon irréversible à la rupture des membranes plasmiques et intracytoplasmiques ([Repnik et al., \(2014\)](#)).

Les processus associés à la nécrose et à l'apoptose affectent particulièrement les mitochondries ([Lemasters et al., \(1998\)](#), [Nikoletopoulou et al., \(2013\)](#)). Celles-ci peuvent donc constituer un marqueur important du niveau d'altération du filet ou du tissu ([Skulachev, \(2006\)](#)). Elles sont faciles à extraire et communes à tous les organismes supérieurs, ce qui confère à cette étude une approche ubiquiste et non pas en fonction de l'espèce du produit aquatique. Nous disposons aujourd'hui d'un certain nombre de marqueurs ou sondes fluorescentes (Mitotrackers) capables de mesurer leur état. L'objectif consiste à étudier dans le temps la mesure du potentiel électrochimique des mitochondries extraites de filets (par

fluorescence) en fonction du niveau d'altération du tissu en s'inspirant des travaux de [Presley et al., \(2003\)](#).

La première partie de ce travail va donc consister à mettre au point une méthode de traçage de l'activité des mitochondries sur des cellules fibroblastiques de daurade royale (*Sparus aurata*) SAF-1 (modèle cellulaire) dans un contexte d'altération. Cette approche permettra également d'étudier un certain nombre de marqueurs de fluorescence des mitochondries (mitotrackers) selon [Agnello et al., \(2008\)](#). Un premier travail a déjà été effectué sur cette lignée fibroblastique au sein du laboratoire. Il a permis de montrer, grâce à l'utilisation de mitotrackers, que la fluorescence des cellules est directement proportionnelle à leur état énergétique. Ce résultat a été obtenu en microscopie de fluorescence. Il serait maintenant intéressant de pouvoir quantifier cette fluorescence et de montrer son évolution dans le temps (cellules déplétées en énergie). A terme, ce travail devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'altération post-mortem au niveau des tissus du poisson et plus particulièrement au niveau du filet de daurade royale. La mitochondrie est un organe intégrateur ([Le Bras et al., \(2005\)](#)). Son potentiel mitochondrial, son état énergétique et l'intégrité de ces membranes devront être mis en relation avec le niveau de fraîcheur du filet. Cette approche devrait à terme faire émerger un marqueur fiable de fraîcheur.

La seconde partie de ce projet consistera à mettre au point une méthode d'extraction des mitochondries sur filet et de développer une technique de dosage de l'activité des mitochondries extraites ([Gogvadze et Zhivotovsky, \(2007\)](#)) par mesure de fluorescence indirecte. Cette méthode permettra à terme de mesurer l'activité des mitochondries par simple mesure de fluorescence. La mesure du potentiel mitochondrial *via* l'utilisation de mitotrackers se fera conjointement avec la mesure de la perméabilisation des mitochondries ([Hoye et al., \(2008\)](#)).

Deux approches complémentaires pourront être utilisées. La première consistera à mesurer la libération du cytochrome c par la mitochondrie. Le niveau de libération du cytochrome c pourra ainsi être mis en relation avec le niveau d'altération du tissu ([Christensen et al., \(2013\)](#)). La deuxième approche pourra consister à mesurer la perméabilisation des membranes des mitochondries ([Gillies et Kuwana, \(2014\)](#)) en mesurant l'activité d'une enzyme présente dans l'espace intermembranaire : la cytochrome c oxydase.

Le travail consistera ensuite à regarder sur différentes espèces de poissons (poissons de mer ou d'élevage concernant la daurade royale (*Sparus aurata*), le bar (*Dicentrarchus labrax*), le saumon (*Salmo salar*) ou le cabillaud (*Gadus morhua*), puis le merlan (*Merlangius merlangus*), le thon obèse ou albacore (*Thunnus obesus* ou *Thunnus albacares*), la sole (*Solea solea*) ou le hareng (*Clupea harengus*)) s'il existe une corrélation entre la fluorescence mesurée et l'état de fraîcheur des filets étudiés. Cette approche pourra être menée à la fois sur filets frais et sur filets congelés.

Enfin, la dernière partie de ce projet consistera, en fonction des résultats obtenus, à optimiser le dosage des marqueurs mitochondriaux par fluorimétrie.

Ce projet a donc un triple objectif de :

1. Mieux comprendre les altérations cellulaires et moléculaires associées à la conservation des filets à basse température comprise entre 0 et 2°C ou à l'état congelé.
2. Mettre au point des marqueurs fiables de mesure de l'état de fraîcheur de filets de poisson et ainsi de répondre aux attentes de toute une filière.
3. Transférer les données expérimentales acquises à la Plateforme d'Innovation Nouvelle Vagues qui aura comme nouvelle technique d'analyse de la fraîcheur des poissons la quantification de marqueurs mitochondriaux détectables par fluorimétrie.

3. Organisation des travaux de recherche

Le doctorant devra se familiariser dans un premier temps aux techniques de culture cellulaire, à la microscopie de fluorescence et à la mesure et quantification de la fluorescence. Un Nanodrop à fluorescence a été acheté dans ce cadre grâce à un projet BQR (Bonus Qualité Recherche) obtenu en 2015.

La première phase du travail consistera à réaliser des cinétiques sur un modèle cellulaire simple : lignée fibroblastique de daurade royale (SAF-1) sur des temps courts (de J0 à J8). Ce travail devrait permettre au doctorant de confirmer des résultats obtenus précédemment au laboratoire en microscopie de fluorescence (choix du ou des marqueurs de fluorescence).

La deuxième phase du travail va consister à mettre au point une technique d'extraction des mitochondries sur cellules et sur filets et développer une ou des techniques de coloration des mitochondries (Rhodamine, JC-1) ([Hallap et al.](#),

(2005), O'Connor *et al.*, (1988)). Le doctorant devra se familiariser à l'utilisation et à l'étalonnage du nanodrop. Ce travail devrait nous permettre de faire une corrélation entre l'activité des mitochondries et leur niveau de fluorescence.

La troisième phase va consister à réaliser des extractions de mitochondries sur filets frais pour différents temps de conservation compris entre 0°C et 2°C (différents niveaux d'altération). Le doctorant pourra suivre le niveau de fluorescence des mitochondries extraites sur ces filets de daurade royale entreposés entre 0°C et 2°C (cinétique sur 8 jours). Ce travail a pour objectif d'établir une corrélation entre l'état énergétique des mitochondries extraites, leurs niveaux de fluorescence et l'état de fraîcheur du filet.

L'état de fluorescence des mitochondries étant directement lié au potentiel mitochondrial, nous étudierons conjointement, au cours de la quatrième phase, la libération du cytochrome c et la mesure de la perméabilisation des membranes mitochondriales. La libération du cytochrome c sera suivie par western blot et la perméabilisation se fera par une approche enzymatique (mesure de l'activité cytochrome oxydase). Cette approche permettra de mieux cerner l'évolution de l'état des mitochondries durant les premiers jours d'altération du filet et de voir si l'état des mitochondries peut être un marqueur fiable de fraîcheur.

Dans l'affirmative, ce travail effectué sur des filets de daurade royale sera étendu au cours de la cinquième phase du travail de thèse à un plus grand nombre d'espèces de poissons (le bar (*Dicentrarchus labrax*), le saumon (*Salmo salar*), le cabillaud (*Gadus morhua*), le merlan (*Merlangius merlangus*), le thon obèse ou albacore (*Thunnus obesus* ou *Thunnus albacares*), la sole (*Solea solea*) et le hareng (*Clupea harengus*)). Si cette technique répond à nos attentes, elle sera à terme étendue à un plus grand nombre de produits aquatiques dont des coquillages, crustacés, et céphalopodes tels que la coquille Saint Jacques (*Pecten maximus*) ou l'encornet commun (*Loligo vulgaris*).

Le caractère innovant de ce travail devrait permettre au doctorant de valoriser son travail à travers la rédaction de publications à comités de lecture.

Le bon déroulement de ce projet a pour finalité de déboucher sur des applications possibles au sein de l'entreprise (PFINV) et des valorisations possibles sous forme de brevet.

Cette thématique est d'autant plus intéressante qu'elle pourrait à terme nous amener à nous intéresser aux produits congelés et étudier si les mitochondries peuvent être des marqueurs et indicateurs de congélation. Ce travail pourra nous ouvrir d'autres perspectives, en particulier sur l'approche « frais/décongelé ».

4. Retombées économiques pour la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues »

Pour les professionnels, l'amélioration de la qualité du poisson de pêche fraîche, et notamment sa fraîcheur représente un enjeu important. Le développement de méthodes précoces et objectives de caractérisation de la fraîcheur des filets de poissons (premiers stades après la pêche) par des méthodes physiques ou biochimiques restent à développer.

L'objectif de ce travail est de pouvoir proposer à terme une méthode rapide, fiable et facile à mettre en œuvre permettant d'évaluer la fraîcheur des filets de poisson.

Cette méthode pourra à terme permettre de distinguer l'ultra frais du frais et ainsi de repenser indirectement la notion de fraîcheur.

Une fois ces techniques validées au sein de la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues », ces méthodes pourront être appliquées à une grande diversité de produits aquatiques. Ces compétences habilitent la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues » à un nouveau procédé performant leur permettant de se positionner dans le domaine de la fraude et de la qualité et de développer son attractivité vis-à-vis des industriels, non seulement au niveau local mais également aux niveaux national et européen.

B. Thématique flore pathogène : problématique Vibrio

1. Contexte

J'ai été contacté en décembre 2014 par le pôle Aquimer suite au travail que nous avons mené pour solliciter une thèse présentée devant la commission recherche de l'ULCO en janvier 2015 et portant sur : « Les *Vibrio* pathogènes en aquaculture : étude de leur capacité à former des biofilms sur des installations aquacoles et développement de moyens de lutte à partir d'outils biochimiques et de molécules antagonistes issues de bactéries lactiques marines. ». Nous avons l'intention de travailler avec la ferme aquacole Aquanord localisée à Gravelines. Cette demande n'a pas été classée par le conseil scientifique de l'ULCO. Mais c'est par ce biais que nous avons été sollicités pour travailler sur le montage d'un programme FUI intégrant Aquanord Ichthus du groupe Gloria Maris et le laboratoire vétérinaire VIRBAC basé dans les Alpes maritimes. Ce projet porte sur la lutte contre la vibriose du bar (*Dicentrarchus labrax*). Nous n'avons pas pu le déposer en novembre 2015 mais le déposerons en d'avril 2016, date butoir du 22^{ème} appel à projets FUI.

Cependant, quelle que soit l'issue de cette demande de financement, nous avons de toute façon inscrit la thématique de recherches sur la lutte contre la vibriose au sein du CPER MARCO (voir page 37). Et que ce soit avec des partenaires industriels ou non, nous allons travailler sur cette thématique. C'est pourquoi, en accord avec le directeur de l'Institut Charles VIOLLETTE, et par le biais de la possibilité qui nous est offerte de solliciter une bourse de thèse *via* l'Anses et la région Nord Pas de Calais, nous avons déposé une demande de financement de doctorat pour l'année 2016 sur ce thème.

Cette thèse a pour titre : « Impact des pratiques d'élevage du bar (*Dicentrarchus labrax*) sur la flore microbienne et des populations de *Vibrio* spp. d'intérêt en santé animale et publique ».

Ce sujet de thèse basé sur le développement d'une problématique liée à l'aquaculture :

- s'inscrit parmi les thèmes prioritaires au sein de l'axe 4 du CPER MARCO qui sont portés par l'ULCO et l'Anses et correspond en cela aux axes stratégiques de l'ULCO par le biais du programme scientifique du « Campus de la Mer »

- s'appuie sur la feuille de route stratégique du pôle Aquimer qui inclut le développement de l'aquaculture sur le territoire vis-à-vis de la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues » et d'Aquanord, première ferme aquacole de France située à Gravelines
- répond à la volonté des institutionnels de développer la thématique « aquaculture » en Région Nord Pas de Calais.

Ce projet de thèse s'inscrit globalement dans le contexte de la surveillance écologique et halieutique du site de Gravelines ([Antajan et al., \(2015\)](#)) et plus particulièrement dans la problématique de la vibriose du bar (*Dicentrarchus labrax*) d'élevage de l'entreprise Aquanord située à proximité de la centrale nucléaire. Cette pathologie est à l'origine d'un taux de mortalité extrêmement important des juvéniles et elle impacte fortement l'équilibre économique de l'entreprise. Au-delà du sujet de thèse, ce projet sera développé au sein de l'équipe, ne serait-ce que par le biais du recrutement du ou de la maître de conférences qui aura lieu en mai prochain. Les thématiques de recherches de cet enseignant chercheur porteront pour partie sur ce sujet.

A l'échelle mondiale, l'aquaculture demeure l'un des secteurs de la production alimentaire dont la croissance est la plus rapide. En 2012, l'aquaculture fournit désormais près de la moitié du poisson destiné à la consommation humaine ([FAO, \(2014\)](#)). En France, la consommation des produits de la mer est en augmentation constante depuis 1997. Concernant les ventes de produits issus de l'aquaculture, la pisciculture représente 46 900 tonnes pour une valeur de 172 millions d'euros ([FranceAgrimer, \(2014b\)](#)).

La perte des stocks en aquaculture est souvent due aux infections microbiennes. Parmi la multitude de pathologies décrites, les vibrioses représentent un problème majeur dans le cadre de l'élevage des coquillages, des crustacés et des poissons ([Thompson et al., \(2003\)](#), [Travers et al., \(2015\)](#)). A ce jour, plusieurs espèces ont été identifiées comme responsables de mortalités de masse en pisciculture dont *Vibrio alginolyticus* ([Snoussi et al., \(2009\)](#)), *Vibrio vulnificus* ([Austin et Austin, \(2007\)](#)) et *Vibrio salmonicida* ([Karlsen et al., \(2008\)](#)). Mais, ce sont surtout les espèces *Vibrio harveyi* ([Austin et Zhang, \(2006\)](#) ; [Won et Park, \(2008\)](#) ; [Haldar et al., \(2010\)](#)) et *Vibrio anguillarum* ([Austin et Austin, \(2007\)](#)) qui posent un véritable problème dans ce secteur.

Les biofilms formés par *Vibrio* spp. représentent d'importants complexes intervenant dans la survie, la virulence et la résistance au stress de ces bactéries ([Watnick et Kolter, \(1999\)](#), [Yildiz et Schoolnik, \(1999\)](#), [You et al., \(2007\)](#)). Les vibrions possèdent un potentiel d'adhésion sur les surfaces biotiques et abiotiques. En effet, ils peuvent s'attacher à l'exosquelette d'animaux composé de chitine, aux copépodes, algues et protozoaires de l'environnement marin, ainsi qu'à des sédiments ([Vezzulli et al., \(2013\)](#), [Vezzulli et al., \(2010\)](#)). Il a été démontré que les *Vibrio* forment des biofilms en aquaculture sur différents matériaux et surfaces composant les réservoirs d'élevage larvaires ([Bourne et al., \(2006\)](#)), ainsi que sur des équipements dans différentes industries de la filière pêche, pendant le process et après les opérations de nettoyage et désinfection ([Bagge-Ravn et al., \(2003\)](#)). Les surfaces inertes, utilisées pour des installations aquacoles, peuvent être colonisées par *Vibrio harveyi* ([Karunasagar et al., \(1996\)](#)). Des souches de *Vibrio alginolyticus* ont été isolées à partir d'installations produisant la daurade royale (*Sparus aurata*) et le bar (*Dicentrarchus labrax*) en Tunisie. Toutes les souches *V. alginolyticus* testées ont effectivement adhéré aux différentes surfaces et leur capacité à former un biofilm diffère suivant les isolats. Ces propriétés, qui permettent aux *Vibrio* de persister dans un environnement aquacole ([Karunasagar et al., \(1994\)](#)), doivent donc être prises en compte dans l'évaluation du risque de vibriose chez les bars, sujet de notre étude.

2. Origine du projet et partenariat

Ce sujet s'inscrit dans le prolongement de travaux initiés par l'équipe BPA (QSA ULCO) aux côtés de Stéphanie COPIN et de Graziella BOURDIN de l'Anses à travers le projet Survib financé par FranceAgriMer. Ce projet qui se termine au printemps 2016 consiste à étudier la capacité de *Vibrio parahaemolyticus* isolé de crevettes, à entrer sous forme Viable Non Cultivable et à adhérer aux surfaces inox. De plus, cette étude sera la suite logique des travaux menés par Amadou [Tall, \(2013\)](#) avec un focus sur le suivi écologique de pathogènes animaux, en particulier *Vibrio harveyi*, représentant un risque sanitaire majeur pour l'aquaculture.

Dans le cadre de projet, l'équipe BPA (QSA ULCO) apportera ses compétences pour la caractérisation de polysaccharides de la matrice extracellulaire du biofilm de *Vibrio* ([Yildiz et al., \(2014\)](#)) et l'étude des biofilms de bactéries marines ([Ayé](#)

[et al., \(2015\)](#)). Dominique HERVIO-HEATH, de l'Ifremer Brest, apportera ses compétences liées aux études préalables menées sur l'écologie des *Vibrio* spp. en Manche-Mer du Nord et concernant le développement d'outils pour l'indentification moléculaire des souches de vibrions, en particulier de *Vibrio harveyi* ([Tall et al., \(2013\)](#), [Tall et al., \(2012\)](#)). Elvire ANTAJAN, de l'Ifremer Boulogne sur mer, apportera ses compétences liées à la surveillance écologique et halieutique du site de Gravelines ([Antajan et al., \(2015\)](#)). Stéphanie COPIN et Graziella BOURDIN, du Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture (Anses) de Boulogne sur mer, apporteront leurs compétences sur les caractérisations de biofilms ([Tresse et al., \(2007\)](#) ; [Combrouse et al., \(2013\)](#)). Elles sont membres du Laboratoire National de Référence (LNR) pour l'identification de *Vibrio parahaemolyticus*. Elles ont notamment publié des études sur *Vibrio parahaemolyticus* ([Robert-Pillot et al., \(2010\)](#) ; [Copin et al., \(2012\)](#)).

3. Présentation et organisation des travaux de recherche

a. Introduction

La vibriose est l'une des premières maladies touchant les poissons à avoir été décrite ([Sindermann, \(1970\)](#)), sachant que les premiers cas de vibrioses affectant les poissons datent du début du 20^{ème} siècle. La revue de [Colwell et Grimes, \(1984\)](#) présente un état des lieux à partir de 1970 des espèces de poissons et de *Vibrio* impliquées dans cette pathologie. La vibriose est rapportée dans toutes les régions du monde ([Hastein, \(1996\)](#)). Des études témoignent en particulier de cas survenus en Méditerranée : à Malte ([Haldar et al., \(2010\)](#)), en Turquie ([Akayli et al., \(2008\)](#)), en Espagne et au Portugal ([Chabrillón et al., \(2005\)](#); [Zorrilla et al., \(2003\)](#) ; [Balebona et al., \(1998\)](#)). En France, la vibriose est la maladie bactérienne la plus importante chez le bar et elle touche le littoral méditerranéen et atlantique ([Breuil, \(1991\)](#)). La vibriose du bar se traduit par une anorexie, une couleur foncée, un ulcère de la peau, une distension abdominale et une entérite nécrotique. Les vaccins et antibiotiques actuels demeurent insuffisants à l'égard des pertes importantes engendrées par la vibriose. C'est dans ce contexte que nous avons initié ce projet dont les objectifs seront détaillés dans les paragraphes suivants, comprenant :

1. un suivi écologique de la flore incluant l'isolement et la caractérisation de *Vibrio harveyi* et des vibrions pathogènes humains
2. l'étude de la production de biofilms par *Vibrio harveyi*
3. la caractérisation biochimique des exopolysaccharides issus des biofilms

Le sujet consiste à étudier l'impact des pratiques aquacoles sur l'environnement direct de l'élevage et en particulier sur la composition des communautés microbiennes dont les *Vibrio* pathogènes en santé animale et humaine. En effet, l'étude de ces bactéries implique la compréhension de leur interaction avec l'écosystème complexe des bassins d'aquaculture. L'étude portera sur le suivi écologique de la flore totale et de *Vibrio* spp. par séquençage haut débit et par PCR et/ou séquençage de gènes de ménage, à partir de différents prélèvements environnementaux, dont des biofilms de surfaces biotiques et abiotiques. Parmi les *Vibrio* spp., les gènes de virulence des espèces potentiellement pathogènes en santé animale et humaine seront recherchés. Les souches isolées de *Vibrio* d'intérêt seront caractérisées, dans le but de discriminer éventuellement les souches résidentes de souches renouvelées au gré des changements environnementaux au cours de l'année. Les souches *V. harveyi* isolées seront étudiées pour leur capacité à former du biofilm en conditions *in vitro*. L'étude consistera à faire le lien potentiel entre la production de biofilms et le pic de vibriose. En sachant que les exopolysaccharides constituent une cible de choix pour la lutte anti-biofilms, la structure de ces molécules sera étudiée par GC/MS.

b. Suivi écologique de la flore totale et des Vibrio spp.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'Ifremer Brest (Dominique HERVIO-HEATH) et l'Ifremer Boulogne-sur-Mer (Elvire ANTAJAN), et à l'aide d'outils développés au cours des travaux de thèse d'Amadou TALL ([Tall, \(2013\)](#)), un suivi écologique sera mis en place dans les bassins d'Aquanord. Cette étude visera à établir un état des lieux des communautés microbiennes au cours du temps et en particulier des vibrions d'intérêt en santé animale (*Vibrio harveyi*) et humaine (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*) en présence dans les installations aquacoles (eau de surface, sédiments, parois des bassins, ainsi que directement sur la peau des poissons).

Bien que l'étude soit focalisée sur *Vibrio harveyi*, les *Vibrio* potentiellement pathogènes pour l'Homme seront détectés lors des campagnes de prélèvements. En effet, les facteurs environnementaux liés au confinement des poissons d'élevage peuvent engendrer la multiplication des pathogènes humains tels que *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*. Il apparaît donc nécessaire de rechercher la présence de ces *Vibrio* afin de prendre en compte l'impact de l'élevage aquacole sur la qualité sanitaire. Ce travail se justifie notamment suite à l'étude réalisée par [Antajan et al., \(2015\)](#) où des *V. parahaemolyticus* ont été fréquemment isolés en 2013-2014 sur le site de Gravelines.

Les prélèvements seront effectués dans des bassins en béton et en résine, accueillant la même densité de population de poissons juvéniles plus sensibles à la vibriose que les poissons adultes. Ce plan d'échantillonnage sera travaillé en amont et sera adapté en fonction des campagnes de prélèvement. Les prélèvements s'effectueront sur une année, à raison d'une fois par mois, et seront de quatre natures différentes par type de bassin (béton ou résine) : l'eau, les sédiments, les parois des bassins et la peau des poissons.

Des prélèvements d'eau à l'entrée et à la sortie de la ferme aquacole seront effectués quatre fois dans l'année.

L'ensemble des échantillons collectés sera analysé afin d'étudier la diversité microbienne composant la flore totale. Cette étude se basera sur le séquençage haut débit de gènes de ménage dont le gène de l'ARNr 16S. Cet état des lieux permettra d'établir un lien éventuel entre la présence de communautés spécifiques et les pics de vibriose (*V. harveyi*). De plus, les prélèvements seront comparés avec les suivis bactériologiques hebdomadaires réalisés par l'Ifremer Boulogne sur mer dans les canaux d'amenée et de rejet de la Centrale Nucléaire de Production d'Electricité (CNPE) de Gravelines située à proximité de la ferme aquacole de Gravelines. Depuis 1984, les installations aquacoles d'Aquanord utilisent une partie de l'eau réchauffée rejetée dans le canal à ciel ouvert pour l'élevage de bars et de daurades (*Sparus aurata*). L'évolution bactériologique dans le canal de rejet est donc la résultante des influences conjuguées des deux installations, la CNPE et la ferme aquacole.

c. Isolement et détection de *Vibrio harveyi* et des vibrions pathogènes humains

Les échantillons prélevés seront filtrés ou isolés sur gélose spécifique TCBS. Les géloses seront incubées à deux températures différentes selon le type de germe recherché : 22°C pour détecter *Vibrio harveyi* et 37°C pour détecter les vibrions pathogènes humains.

Le but est de déterminer la présence des espèces de *Vibrio* et de comparer les résultats obtenus dans les différents prélèvements. Concernant la recherche et l'identification de *Vibrio harveyi*, le doctorant s'initiera à l'Ifremer Brest à la méthode de PCR quantitative en temps réel développée par Amadou [Tall, \(2013\)](#) et au séquençage du gène *pyrH* ([Tall et al., \(2013\)](#)).

Concernant la recherche et l'identification de Vibrions pathogènes humains, le doctorant utilisera la méthode de PCR quantitative en temps réel développée au sein de l'Anses de Boulogne sur mer ([Robert-Pillot et al., \(2010\)](#)).

Par ailleurs, les gènes de virulence d'espèces d'intérêt en santé animale (*Vibrio harveyi*) et humaine (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*) seront recherchés par PCR. Ainsi, une cartographie des gènes de virulence pour ces espèces sera établie pour un suivi épidémiologique en bassin d'aquaculture.

Ces isolats seront ensuite analysés par électrophorèse à champ pulsé (PFGE) afin de les caractériser génétiquement.

d. Biofilms de *Vibrio harveyi* et des vibrions pathogènes humains

Les souches des différents vibrions précédemment isolées seront testées pour leur capacité à adhérer et à former un biofilm *in vitro* en conditions de laboratoire, par test en microplaques et coloration au crystal violet. De plus, cette formation de biofilms sera analysée en lien avec le génotypage de la souche. La relation si elle existe, pourra être mise en évidence entre la formation de biofilms, capables d'assurer la protection et la persistance de l'espèce pathogène d'intérêt, d'une part et les pics infectieux de vibriose potentiellement associés à des mécanismes répétés de relargages du biofilm vers le milieu liquide, d'autre part.

Le travail consistera à rechercher dans les banques de données, des gènes impliqués dans la formation de biofilms chez *Vibrio harveyi*. Les gènes *luxO* et *rpoN* (codant le facteur sigma 54) interviennent dans la communication cellulaire

(Quorum sensing), mais également dans la motilité (uniquement pour le facteur sigma 54), la production de sidérophores et la morphologie de la colonie, notamment le phénotype rugueux ([Lilley et Bassler, \(2000\)](#)). Chez *Vibrio cholerae* le phénotype rugueux est associé à la production d'exopolysaccharides ([Yildiz et Schoolnik, \(1999\)](#)). Il serait donc pertinent de détecter dans un premier temps ces gènes (et de suivre leur expression dans un second temps) chez *Vibrio harveyi* par PCR ou qPCR. De plus, le facteur sigma 54 contrôle le développement de biofilm chez *Vibrio fischeri* ([Wolfe et al., \(2004\)](#)).

e. Caractérisation biochimique des exopolysaccharides issus des souches de Vibrio harveyi hyper-productrices de biofilms

Le screening des souches par rapport à leur capacité à former des biofilms ayant été effectué précédemment, il sera procédé à l'observation des souches d'intérêt sur milieu solide formant des colonies. Sachant que la formation des colonies rugueuses est souvent révélatrice de formation de biofilms et de surproduction des exopolysaccharides (EPS), notamment chez *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Vibrio cholerae* ([Fong et al., \(2010\)](#)), la capacité à former des biofilms sera testée sur ces colonies rugueuses.

Ces souches, potentiellement virulentes pour le bar, seront cultivées en conditions favorisant la formation de biofilms à grande échelle. Les polymères excrétés dans la matrice extracellulaire du biofilm seront ensuite purifiés et caractérisés en utilisant les techniques chromatographiques (filtration sur gel, échange d'ions, ..) et leur composition sera étudiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (plateforme d'analyse des glucides bactériens, Irina SADOVSKAYA, ICV-QSA, BPA ULCO).

f. Perspectives

i. Etude de la virulence

α. Approche cellulaire : lien biofilm/ virulence

Les souches hyper-productrices de biofilms serviront à infecter des modèles cellulaires (cellules de bars) ou seront employées lors de challenge-tests (collaboration avec le laboratoire de l'Anses Ploufragan Plouzané) dans le but d'établir une corrélation entre biofilms et virulence et d'étudier si les souches de *Vibrio harveyi*, responsables de vibriose, sont productrices de biofilms (surface

biotique *versus* abiotique). L'étude portera de ce fait sur le problème de santé animale et publique posé par la formation de ces biofilms.

β. Approche moléculaire : suivi de la virulence par extraction des ARNm, expression de la virulence dans les différents prélèvements au cours du temps

Une étude par NGS transcriptomique pourra être effectuée lors de la campagne de prélèvements pour un suivi de la virulence de *Vibrio harveyi* au cours des saisons et de l'influence des facteurs environnementaux. Cette étude nécessitera la mise en place d'outils pour une application aux prélèvements effectués dans les différents bassins et sur les différentes surfaces au cours de l'année.

ii. Molécules antagonistes

Cette étape consistera à chercher et tester des substances anti-biofilms de *Vibrio harveyi*, notamment *via* l'utilisation de bactéries marines antagonistes. Dans une perspective à plus long terme, le mode d'action de ces molécules antagonistes sera exploré (partenariat avec Djamel DRIDER ; équipe QSA Université de Lille).

4. Les retombées scientifiques et économiques attendues

Les retombées scientifiques se traduiront par le développement d'outils et de méthodes pour la mise en place de plans de surveillance. Elles seront valorisées par des publications scientifiques dans de revues internationales à comité de lecture.

La finalité de ce projet consiste à trouver des moyens d'éradiquer dans l'absolu ou du moins de limiter la vibriose, maladie bactérienne affectant l'élevage de bars et donc de rendre l'entreprise Aquanord plus compétitive en minimisant l'impact important de cette maladie sur les finances de l'entreprise. La mortalité des poissons d'élevage chez Aquanord se chiffre en effet à environ 1 million d'euros par an depuis six ans et a en partie, engendré la liquidation de la société en novembre 2013. L'impact économique se mesurera très rapidement si les méthodes mises en place conduisent à des résultats probants. Il ne s'agit pas seulement de valoriser la recherche en région, ce qui nous importe en tant qu'universitaires, mais également d'apporter des réponses qui impliquent la survie d'une entreprise. Ainsi, ce projet permettra de glaner des données et des résultats qui pourront par la suite être exploités par Aquanord par le biais d'une

bourse CIFRE par exemple, ce qui constituerait la première étape d'une suite logique à ce projet exploratoire.

II. Le projet transversal ICVAQUA (2015-2018)

L'Analyse de Cycle de Vie (ACV) est une méthode d'évaluation de référence pour les déclarations environnementales de type III ([Norme ISO 14025, \(2010\)](#)) et pour l'affichage environnemental des produits de grande consommation ([PEF](#)). Elle permet aux entreprises de calculer l'empreinte environnementale de leurs produits. Elle constitue également un outil d'aide à la décision dans le cadre d'une démarche d'écoconception. Le développement d'inventaires du cycle de vie (ICV) sur les produits aquatiques et leurs processus de transformation répond à un besoin identifié tant au niveau national qu'international. Le programme [Agribalyse](#), soutenu par l'ADEME, en témoigne. Les résultats de cette étude, portant sur la conception d'ICV en amont de la production agricole, ont été publiés en 2013.

La mise en œuvre pratique de l'ACV à des fins d'affichage environnemental et/ou d'écoconception au sein des entreprises du secteur des produits aquatiques se heurte aujourd'hui à la limite technique du manque de données d'ICV. Les ICV sont les descriptions environnementales des processus ou des produits qui interviennent lors de la production et/ou de la transformation des produits aquatiques. Le manque de telles données conduit soit à des approximations qui empêchent l'interprétation des résultats, soit à une impossibilité de calculer les impacts environnementaux des produits du fait des lacunes dans la connaissance du système de production. Ce verrou doit être levé en développant de nouveaux inventaires dans un format de données conforme aux pratiques actuelles en ACV. De ce fait, le projet ICVAQUA, financé par la région Nord Pas de Calais à compter d'octobre 2014 (voir page 112), vise le développement d'ICV sur les produits aquatiques et les processus de transformation. Il vise également la transmission de compétences relatives à la pratique de l'ACV et à la construction d'ICV du cabinet d'études Cycleco à l'équipe BPA (QSA ULCO) dans le cadre de la mise en œuvre d'un projet d'étude en lien avec nos compétences de recherche actuelles. Au cours de la première année du programme, nous établirons les ICV au format ILCD des deux espèces sur lesquelles nous travaillons concernant la

fraîcheur et l'altération des filets de poisson : le bar (*Dicentrarchus labrax*) et la daurade (*Sparus aurata*). Nous développerons ensuite quatre autres ICV sur la sole (*Solea solea*), le lieu noir (*Pollachius virens*), le merlan (*Merlangius merlangus*) et le maquereau (*Scomber scombrus*). Ce programme nous apportera la maîtrise d'un outil complémentaire aux études biochimiques et microbiologiques permettant d'intégrer les notions relatives à l'ACV. Cet outil complémentaire constituera un atout dans la mise en œuvre de collaborations dans le cadre de projets de recherche pluridisciplinaires.

Afin de pérenniser cette compétence au sein de l'équipe de recherche qui sera acquise au cours de ce projet, cette mission de coordination a été principalement confiée à Pierrette ETHUIN. Les connaissances acquises seront transférables aux étudiants du master Qualité des Procédés Agroalimentaires et Halieutiques en y intégrant un module d'analyse de cycle de vie au sein de la maquette de cette formation.

Ce projet a aussi pour but de sensibiliser les acteurs du secteur des produits aquatiques de la région Nord-Pas-de-Calais à la pensée cycle de vie en les impliquant dans un travail collectif de collecte de données.

Activités administratives et d'enseignement

Je développerai dans cette partie les événements marquants de ma carrière d'enseignant et de responsable administratif.

I. Responsabilités pédagogiques liées à la direction de l'IUP QPAH puis à la responsabilité du Master QPAH

J'ai dirigé l'Institut Universitaire Professionnalisé (IUP) Qualité des Procédés Agroalimentaires et Halieutiques (QPAH) de 2001 à 2006 avant qu'il ne se transforme en master QPAH. Cela représente aujourd'hui environ 55 étudiants inscrits par an en licence 3 (une quinzaine), en master 1 (entre 15 et 20) et en master 2 (une vingtaine).

Par expérience, je me suis rendu compte que la responsabilité d'une formation représente avant tout du temps passé auprès des étudiants afin de les guider et de les accompagner dans leurs choix de stage en France ou à l'étranger, de les réorienter s'il le faut en cas d'échec ou de projet professionnel évoluant vers d'autres métiers, de les écouter au travers de leurs difficultés matérielles et morales de jeunes adultes, mais également du temps à consacrer aux différentes opérations d'attractivité des futurs étudiants (carrefour des métiers, salons de l'étudiant à Lille, journée portes ouvertes de l'université : autant d'opérations auxquelles j'ai systématiquement participé depuis 2000).

Le second aspect de la responsabilité d'une formation sur 3 ans réside dans l'objectif de construire un parcours pédagogiquement cohérent et progressif. Ce travail s'effectue en partenariat au sein de l'équipe pédagogique et en lien avec le tissu industriel mais aussi en tête à tête avec chacun des intervenants.

J'ai toujours veillé à respecter le cahier des charges des anciennes formations d'IUP qui ont fait leur preuve quant à l'insertion professionnelle des étudiants formés par ce cursus.

L'IUP ayant été transformé en master avec un pré-parcours agroalimentaire en Licence 3, l'organisation pédagogique de la formation s'articule autour :

- d'un stage en entreprise par année de formation (3 mois en licence 3 ; 4 mois en Master 1 avec une incitation très marquée à effectuer le stage à l'étranger, 6 mois en master 2)

- de la participation des industriels agroalimentaires du Boulonnais (150 entreprises agroalimentaires recensées par la CCI Côte d'Opale) à raison de 20 % du temps d'enseignement en licence jusqu'à 50 % en master 2.
- de l'enseignement d'une langue étrangère : l'anglais avec passage de l'épreuve du TOEIC financé par la taxe d'apprentissage en Master 1 (niveau requis pour valider le module : 700 points sur 990) et en master 2 si nécessaire.
- L'ouverture du master 2 en 2006 en formation initiale et continue par le biais de la mise en place des contrats de professionnalisation en master 2. En 2014, 10 étudiants sur 18 avaient signé un contrat de professionnalisation.
- L'ouverture du double diplôme QPAH – MAE entre 2013 et 2015 a permis à des étudiants de master QPAH ayant une fibre managériale plus développée de valider cette double compétence. Un partenariat étroit avec l'équipe pédagogique du master MAE a donc été mis en place sur cette période.

La participation importante (jusqu'à 50 % du volume horaire de M2) des industriels locaux au sein de l'équipe pédagogique est le résultat de la mise en place d'un réseau d'entreprises tissé au prix d'une présence active sur le terrain depuis de nombreuses années. Ce temps consacré au renom de la formation n'est nullement quantifiable mais indispensable afin que la formation de master agroalimentaire devienne une référence non seulement pour agrémenter l'équipe pédagogique mais également au moment où les industriels recrutent un stagiaire ou un futur cadre. Il est ainsi très courant que je reçoive directement des offres d'emploi par courriel ou par téléphone de la part de cadres de nombreuses entreprises agroalimentaires.

II. Création et mise en place de nouveaux enseignements

- J'ai mis en place, dès mon arrivée à l'ULCO, de nouveaux cours, mais surtout de nouveaux TP de biochimie alimentaire dispensés en maîtrise de transformation des produits alimentaires (IUP 3^{ème} année) lors de son ouverture en octobre 1995 (10 au total dont 7 inédits utilisant du matériel spécifique tels que l'HPLC (2), la CPG, la technique ELISA...). Parmi ces dix TP de quatre heures, cinq nécessitent l'utilisation de logiciels pilotés par informatique. Ces TP ont été régulièrement à jour depuis cette date pour être en phase avec l'évolution technologique du matériel utilisé qui a pu être

acquis au cours du temps grâce au versement de la taxe d'apprentissage à la formation.

- J'ai repris une bonne partie de ces TP dans le cadre des travaux pratiques dispensés aux DEUST TVPA-TVPM sur le même site.
- J'ai mis en place les cours, TD et TP de biochimie de licence 3 parcours agroalimentaire et de master 1 QPAH. J'ai conçu ce dernier module en collaboration avec les biochimistes des autres universités régionales dans le cadre du master agroalimentaire régional commun aux 5 universités du Nord pas de Calais impliquées.

III. Cas particulier de l'opération Univ'Innov' pour les étudiants de master 2 QPAH

L'ouverture du master 2 en 2006 s'est concrétisée, en accord avec l'ex-conseil de perfectionnement de l'IUP, par des enseignements orientés sur le « management », qu'il s'agisse de management de la qualité, de la production ou des ressources humaines ainsi que sur la gestion de projet. En participant à une réunion concernant le plan local de développement économique du Boulonnais (PLDE) en septembre 2008, au cours de laquelle était évoquée la possibilité de créer des passerelles plus nombreuses entre les entreprises et l'université, j'ai appris par Pierre TESSE, responsable régional Oséo pour le secteur agroalimentaire, qu'il existait un dispositif dénommé « Aide aux jeunes ». Ainsi, grâce à ce dispositif, j'ai pu modifier le module de recherche & développement du master 2 construit sur la base d'une étude de projet fictive en véritable action R&D d'étudiants pour une entreprise développant de nouveaux produits. Afin de pérenniser ce dispositif, j'ai travaillé avec le service innovation de la chambre de commerce et d'industrie de Boulogne sur mer qui a pour mission de démarcher les entreprises en quête de réalisation de projets R&D. Nous avons initié la démarche en 2009 avec 2 projets d'entreprises sur une période de 3 mois. L'opération étant une réussite, nous avons signé une convention de partenariat entre l'ULCO, la CCI de Boulogne sur mer et Oséo. Suite à la disparition de ce dispositif Oséo, c'est aujourd'hui la CCI et la Communauté d'Agglomération du Boulonnais (CAB) qui cofinancent ces projets de recherche et développement. L'opération est pédagogiquement très intéressante dans la mesure où ce sont les

étudiants qui construisent de A à Z leur projet, du montage financier et technique du dossier à l'étude de faisabilité, et de l'étude de marché jusqu'à la réalisation des produits finis. Entre 2009 et 2014, ce sont ainsi 14 projets Univ' Innov' qui ont été réalisés au sein de 10 entreprises agroalimentaires différentes.

IV. Mise en place d'un enseignement Hygiène et sécurité aux primo-entrants des filières scientifiques à l'ULCO

Dans le cadre de ma charge de mission Hygiène et sécurité au sein de l'ULCO (voir page 140), j'avais proposé au Président Edward ANTHONY d'inscrire au plan quadriennal 2006-2009, la mise en place d'une formation à l'hygiène et sécurité destinée aux primo-entrants (Licences 1) des filières scientifiques de l'université (Biologie, Mathématiques et Sciences pour l'Ingénieur (MSPI) et STAPS : soit environ 350 étudiants en 2010). Cette initiative a été actée par le Président et cet enseignement transversal a été mis en place depuis l'année universitaire 2007-2008, mon rôle ayant consisté au départ à expliquer aux différents présidents de jury ou responsables de ces différentes formations de L1 qu'il fallait introduire dans leur maquette cette formation transversale.

De fait, la formation est dispensée sous la forme d'une unité d'enseignement de 10 heures représentant 1 crédit ECTS. Le programme construit collégialement sous ma responsabilité au sein de l'équipe pédagogique porte sur les consignes de sécurité, les bonnes pratiques de laboratoire, les risques : électrique et rayonnements ionisants, chimiques et biologiques et routier ainsi que la formation au plan particulier de mise en sûreté face aux risques majeurs. Il s'adapte au public visé en proposant des variantes en adéquation avec la finalité de la formation des étudiants. L'équipe pédagogique est constituée de 11 intervenants dont 1 enseignant chercheur et 10 assistants de prévention (agents chargés de la mise en œuvre de l'hygiène et la sécurité) de l'ULCO. En tant que chargé de mission, j'ai coordonné le contenu de cet enseignement et je suis chargé de sa mise à jour annuelle en fonction des retours des étudiants et des remarques des enseignants dans le souci d'une amélioration continue de la formation.

V. Service d'enseignement des deux dernières années universitaires

Etant nommé sur un poste en 64^{ème} section, j'enseigne principalement la biochimie. Mon service statutaire des deux dernières années universitaires est synthétisé sous la forme du **Tableau X** ci-dessous pour l'année 2014/2015 et du **Tableau XI** prévisionnel ci-dessous pour l'année 2015/2016.

Tableau X : service statutaire de l'année universitaire 2014/2015

Niveau	Diplôme	Module	CM	TD		TP		Total
			Nb heures	Nb heures	Nb groupes	Nb heures	Nb groupes	Eq TD
Référentiel	Référentiel Administration	Chargé mission hygiène et sécurité		48	1			48
Référentiel	Référentiel Formation	Dépt Biologie - Directeur Etudes M2 QPAH		18	1			18
Licence 1	L1 Sciences de la Vie CALAIS	Hygiène et sécurité		12	1			12
Licence 1	LP PA-Elevage	LP élevage - qualité du lait		8	1			8
Licence 1	VAE	Rencontre jury candidat/rapporteurs		4	1			4
Licence 2	DEUST 2 TML - Boulogne	Biochimie	10			4	1	14
Licence 2	L2 Sciences de la Vie CALAIS	Biochimie 1	7					7
Licence 2	L2 Sciences de la Vie CALAIS	Travaux Personnels Encadrés TPE 1		10	1			10
Licence 3	L3 Sciences de la Vie Parcours Agro BOULOGNE	Biochimie 2		4	1	8	1	12
Licence 3	L3 Sciences de la Vie Parcours Agro BOULOGNE	Projet personnel professionnalisé 3		5	1			5
Licence 3	L3 Sciences de la Vie Parcours Agro BOULOGNE	Stages		1	3			3
Licence 3	L3 Sciences de la Vie Parcours SVN CALAIS	Biochimie		4	2	4	3	20
Licence 3	L3 Sciences de la Vie Parcours Agro BOULOGNE	Stages		1	3			3
Licence pro	LP génie culinaire	biochimie alimentaire		13	1			13
Master 1	M1 Pro Nutrition, Sciences des Aliments et Agroalimentaire spé QPAH	Biochimie alimentaire	24	2	1	4	1	30
Master 1	M1 Pro Nutrition, Sciences des Aliments et Agroalimentaire spé QPAH	Stages		1	2			2
Master 2	M2 Pro Nutrition, Sciences des Aliments et Agroalimentaire spé QPAH	Evaluation et prévention des risques	5					5
Master 2	M2 Pro Nutrition, Sciences des Aliments et Agroalimentaire spé QPAH	Stages FC		4	2			8
Master 2	M2 Pro Nutrition, Sciences des Aliments et Agroalimentaire spé QPAH	Stages FI		3	4			12
Total :								234

Tableau XI : service statutaire prévisionnel de l'année universitaire 2015/2016

Unités d'enseignement	Formations	CM (h)	TD (h)	Nbre de Groupes TD	TP (h)	Nbre de Groupes TP	Total Eq TD (h)
Hygiène et sécurité	Licence 1 Sciences de la Vie (SV)		02,0	6			12,0
Biochimie	Licence 2 SV	07,0					10,5
Travaux pratiques encadrés	Licence 2 SV		08,0	1			08,0
Enzymologie	Licence 3 SV	07,0	04,0	2	04,0	3	30,5
Projet Professionnel Personnalisé L3	Licence 3 SV parcours agroalimentaire		05,0	1			05,0
PPP M2	M2 QPAH		12,0	1			12,0
Biochimie alimentaire	Licence Professionnelle Génie culinaire		13,0	1			13,0
Biochimie alimentaire	DEUST Technicien de Valorisation des Produits de la Mer	10,0					15,0
Enzymologie	Licence 3 SV parcours agroalimentaire		04,0	1			04,0
Biochimie alimentaire	M1 QPAH	18,0					27,0
Risques industriels	M2 QPAH	04,0					06,0
Suivi de stages	Licence 3 SV parcours agroalimentaire		01,0	3			03,0
Suivi de stages	M1 QPAH		01,0	3			03,0
Suivi de stages	M2 QPAH		03,0	4			12,0
Responsabilité d'année	M2 QPAH		18,0	1			18,0
Total							179,0

La différence significative de charges horaires entre ces deux tableaux s'explique par le fait que pour des raisons liées à la volonté de m'impliquer de plus en plus en recherche, j'ai décidé en 2015 de mettre fin à ma charge de mission en hygiène et sécurité que j'occupais depuis 2004.

VI. Activités administratives

A. Responsabilités administratives au sein de l'ULCO

1. Chargé de mission hygiène et sécurité

Outre cette fonction de chercheur et de responsable de formation, j'ai d'autre part participé en tant qu'élu, à la mise en place du Comité Hygiène et Sécurité (CHS) de l'ULCO en 2000. Suite à mon implication importante au sein du CHS, le Président de l'ULCO m'a chargé de mission pour la politique Hygiène et Sécurité de l'université en 2004. Ma mission a jusqu'à ce jour consisté à mettre en place le document unique annuel d'évaluation des risques de la façon la plus exhaustive possible au sein de l'université multipolaire (4 villes) et pluridisciplinaire (tous secteurs sauf la santé). J'ai particulièrement porté mon attention sur le lien à mettre en place entre les remontées des problèmes liés à l'Hygiène et Sécurité effectués par les agents chargés de la mise en œuvre (ACMO puis assistants de prévention) sur le terrain et la traduction de ces plans annuels d'actions en politique à mener en termes de moyens par les différents services de l'université. J'ai de plus participé activement à la création d'un groupe de travail sur les risques psychosociaux qui a été mis en place en 2011 au sein de l'ULCO. Je suis également membre de ce groupe de travail en tant que chargé de mission hygiène et sécurité. A ce jour, ce groupe a traité intégralement trois cas exposés ensuite devant le CHSCT et pour lesquels les préconisations ont été suivies par la Présidence de l'ULCO.

2. Elu dans les conseils

J'ai été plusieurs fois élu aux différents conseils de l'université. J'ai effectué un mandat en tant qu'élu du conseil scientifique de 1997 à 2000 et j'ai été élu trois fois au CEVU (devenu CFVU en 2015), de 2001 à 2004 et depuis 2008.

- J'ai été membre du jury VAE de l'ULCO depuis sa création en 2005 jusqu'en 2014.

B. Responsabilités collectives au-delà du périmètre de l'ULCO

1. Participation à la création du master agroalimentaire régional

En 2002, j'ai eu l'occasion de participer à une réunion à l'initiative du Professeur DIVIES, Chargé de Mission Pédagogique au Ministère de l'Éducation Nationale.

Au cours de cette réunion, il avait réuni, au sein des services centraux de l'université d'Artois, l'ensemble des porteurs de projet de diplômes de l'Académie de Lille liés à l'agroalimentaire. Son message était très clair. Il fallait que les différentes universités travaillent en collaboration, si ce n'est en partenariat sur cette thématique.

Lors de la campagne d'habilitation de 2005 qui a suivi, cette réunion m'a conforté dans l'idée que l'évolution de l'IUP vers un master ne se ferait que dans un cadre régional. L'ULCO a été l'instigatrice du rapprochement des 5 universités régionales (Lille 1 et 2, Artois, Valenciennes, ULCO). J'ai alors été chargé par le Professeur Bruno BETHOUART, vice-président CEVU de l'ULCO, de mener à bien la concertation afin de construire ce qui s'appelle aujourd'hui le master agroalimentaire régional Nord Pas de Calais. Ce master résulte de la réunion des DESS Qualimapa de Lille 1, Technologies Alimentaires Avancées de l'université d'Artois et des IUP santé de Lille 2 et agroalimentaires de Valenciennes et de l'ULCO. Le master 1 comporte six modules communs aux 5 universités avec un enseignement identique au sein de ces modules pour partie mis en place en visioconférence. Les examens de ces 6 modules sont identiques aux 5 universités. Le master 2 est spécifique à chaque université selon un schéma de construction en Y. Nous nous réunissons en grand jury annuel au mois de juin afin de faire le bilan de l'année écoulée et de programmer l'année à venir d'une part mais aussi d'examiner les candidatures des étudiants de Master 1 souhaitant effectuer le parcours de Master 2 au sein d'une autre filière régionale que celle proposée par leur université d'origine et de répartir équitablement les étudiants au sein de ces 5 options régionales selon un système de passerelles facilitant la mobilité.

2. *Autres responsabilités collectives*

- J'ai été président, de décembre 2009 à décembre 2013, de la commission Formation/Innovation/Recherche désigné par Roger DURAND, Président de l'ULCO au sein de la Mission de prospective sur les métiers aquatiques dans le Boulonnais dénommée « Capécure 2020 ». En effet, la Région Nord-Pas de Calais et la Communauté d'Agglomération du Boulonnais, *via* leurs présidents respectifs, se sont engagées pour une grande réflexion sur l'avenir du port de Boulogne sur Mer. Un comité de pilotage a été mis en place en juin 2009 afin de préparer Capécure à l'horizon 2020. Quatre commissions liées à

la ressource, la transformation, la logistique et la formation, l'innovation et la recherche ont été mises en place. J'ai ainsi coordonné ce dernier groupe de travail au sein duquel se retrouvaient autour d'une même table l'ensemble des chercheurs de la place bouloonnaise (CNRS, Lille 1, IFREMER, Anses, ULCO) mais également l'ensemble des proviseurs des lycées bouloonnais publics ou privés (Lycées Branly, Giroux-Sannier, Mariette, Saint Joseph et lycées aquacole de Coulogne et maritime du Portel) et des responsables de formation universitaires (IUT, DEUST, licence professionnelle, master liés à l'agroalimentaire) ou pour adultes (CUEEP Littoral, Centre de Formation aux Produits de la Mer et Plateforme Nouvelles Vagues). Ces différentes institutions se sont ainsi donné les moyens de travailler ensemble à l'élaboration d'une offre de formation et de recherche complémentaire et exhaustive sur le bassin bouloonnais dans l'optique de constituer à terme un « cluster » performant en termes d'agroalimentaire et halieutique, aquaculture, biologie marine et de logistique et transport.

- J'ai été le représentant de l'ULCO désigné par le Président d'Université au sein du Conseil d'Administration du Pôle de Compétitivité « Aquimer » de 2005 à 2015. Depuis cette année, je suis le suppléant du directeur du campus de la mer, Joseph JEANFILS au sein de ce même conseil d'administration. Je suis membre du conseil scientifique de ce même pôle.
- Je suis le représentant de l'ULCO désigné par le Président d'Université au sein du Conseil de surveillance de la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues » depuis 2013.
- J'ai été le représentant de l'ULCO désigné par le Président d'Université au sein du Conseil Portuaire de Boulogne sur mer de 2008 à 2013.
- J'ai été choisi en tant qu'expert auprès de l'HCERES au sein du département des formations concernant la vague B en 2016.

Bibliographie

- Abdullah, A. et Rehbein, H.** (2015) Authentication of closely related scombrid, catfish and tilapia species by PCR-based analysis and isoelectric focusing of parvalbumin. *European Food Research and Technology* 241, 4, pp 497-511.
- Adachi, K., Endo, H., Watanabe, T., Nishioka, T. et Hirata, T.** (2005) Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization. *Pigment Cell Res* 18, 2, pp 136-43.
- Adachi, K., Hirata, T., Nagai, K., Fujisawa, S., Kinoshita, M. et Sakaguchi, M.** (1999) Purification and Characterization of Prophenoloxidase from Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*. *Fisheries science* 65, 6, pp 919-925.
- Adachi, K., Hirata, T., Nagai, K. et Sakaguchi, M.** (2001) Hemocyanin a most likely inducer of black spots in Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* during storage. *Journal of Food Science* 66, 8, pp 1130-1136.
- Adachi, K., Hirata, T., Nishioka, T. et Sakaguchi, M.** (2003) Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 134, pp 135-141.
- Agnello, M., Morici, G. et Rinaldi, A. M.** (2008) A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology* 56, 3, pp 145-149.
- Agribalyse**, <http://www.ademe.fr/agribalyse-r>; consulté le 3 janvier 2016
- Ainsworth, S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Courtin, P., Guerardel, Y., Mahony, J., Grard, T., Cambillau, C., Chapot-Chartier, M.-P. et van Sinderen, D.** (2014) Differences in lactococcal cell wall polysaccharide structure are major determining factors in bacteriophage sensitivity. *mBio* 5, 3, pp e00880-14.
- Akayli, T., Timur, G., Aydemir, B., Kiziler, A., Coskun, O., Albayrak, G. et Arican, E.** (2008) Characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates from diseased cultured gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 60, 2, pp 89-94.
- Alberio, G. R. A., Barbagallo, R. N., Todaro, A., Bono, G. et Spagna, G.** (2014) Effect of freezing/thawing process in different sizes of blue fish in the Mediterranean through lysosomal enzymatic tests. *Food Chemistry* 148, 0, pp 47-53.
- Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., García, O., Fernández De Simón, L., García-Hirschfeld, J., Sancho, M., De La Rúa, C. et Fernández-Piqueras, J.** (2004) Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Science International* 139, 2-3, pp 141-149.
- Antajan, E., Hervio-Heath, D., Lefebvre, A., Loots, C., Luczak, C. et Ruellet, T.** (2015) Surveillance écologique et halieutique du site de Gravelines, novembre 2013 – octobre 2014. Ifremer Rst.Ode/Littoral/Ler/Bl15.01, 153 pages
- Aramli, S., Kalbassi, M. et Nazari, R.** (2014) Protein concentration and enzyme activities of fresh and frozen–thawed Persian sturgeon, *Acipenser persicus* (Borodin, 1897) semen *International Aquatic Research* March 6:54.
- Aroca, P., Urabe, K., Kobayashi, T., Tsukamoto, K. et Hearing, V.** (1993) Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *Journal of Biological Chemistry* 268, 34, pp 25650-25655.

- Arrêté du 2 octobre 1997.** (1997) Arrêté du 2 octobre 1997 relatif aux additifs pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine.
- Arrêté du 28 décembre 1992.** (1993) Arrêté du 28 décembre 1992 portant réglementation des conditions d'hygiène applicables dans les établissements de manipulation des produits de la pêche. *Journal officiel* 7, p 519.
- Article R112- 9.** (2005) Article R112-9 du code de la consommation portant sur l'étiquetage des denrées alimentaires.
- Asensio, L.** (2007) PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18, 11, pp 558-566.
- Asensio, L., González, I., García, T. et Martín, R.** (2008) Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19, 1, pp 1-8.
- Austin, B. et Austin, D. A.** (2007) dans *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*, ed., Springer.
- Austin, B. et Zhang, X. H.** (2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol* 43, 2, pp 119-24.
- Avis du Comité économique et social européen.** (2005) Avis du Comité économique et social européen du 6 avril 2005 sur la « Proposition de directive du Parlement européen et du Conseil modifiant la directive 95/2/CE concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants et la directive 94/35/CE concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires ».
- Ayé, A., Bonnin-Jusserand, M., Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Koffi, N. R., Rabah, N., Blache, Y. et Molmeret, M.** (2015) Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing AHLs in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. *Microbiology (Reading, England)*.
- Bacic, A., Fincher, G. B. et Stone, B. A.** (2009) dans *Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides*, ed., Academic Press.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C. et Gram, L.** (2003) The microbial ecology of processing equipment in different fish industries - Analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology* 87, 3, pp 239-250.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M., Marine-Font, A. et Vidal-Carou, M.** (2005) Biogenic amine index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Protection*® 68, 11, pp 2433-2438.
- Balebona, M. C., Zorrilla, I., Moriñigo, M. A. et Borrego, J. J.** (1998) Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture* 166, 1, pp 19-35.
- Ballarin, L., Franchi, N., Schiavon, F., Tosatto, S. C., Mičetić, I. et Kawamura, K.** (2012) Looking for putative phenoloxidases of compound ascidians: Haemocyanin-like proteins in *Polyandrocarpa misakiensis* and *Botryllus schlosseri*. *Developmental & Comparative Immunology* 38, 2, pp 232-242.

- Barcode of Life: identifying Species with DNA Barcoding**, <http://www.barcodeoflife.org/>; consulté le 3 janvier 2016
- Bartlett, S. E. et Davidson, W. S.** (1991) Identification of *Thunnus* tuna species by the Polymerase Chain Reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**, 2, pp 309-317.
- Bartlett, S. E. et Davidson, W. S.** (1992) FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* **12**, 3, pp 408-11.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M. et Raymundo, A.** (2013) Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research* **2**, 2, pp 164-173.
- Bechmann, I. E. et Jørgensen, B. M.** (1998) Rapid assessment of quality parameters for frozen cod using near infrared spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology* **31**, 7, pp 648-652.
- Bene, A., Hayman, A., Reynard, E., Luisier, J. et Villettaz, J.** (2001) A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method: Part II. Determination of the freshness of fish. *Sensors and Actuators B: Chemical* **72**, 3, pp 204-207.
- Benjakul, S. et Bauer, F.** (2001) Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis* Linne) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles. *Food Chemistry* **72**, 2, pp 207-217.
- Benjakul, S., Visessanguan, W. et Tanaka, M.** (2005) Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Journal of Food Biochemistry* **29**, pp 470-485.
- Benjakul, S., Visessanguan, W. et Tanaka, M.** (2006) Inhibitory effect of cysteine and glutathione on phenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). *Food Chemistry* **98**, 1, pp 158-163.
- Billaud, C., Brun-Mérimée, S., Louarme, L. c. et Nicolas, J.** (2004a) Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple I: Enzymatic browning and enzyme activity inhibition. *Food Chemistry* **84**, 2, pp 223-233.
- Billaud, C., Maraschin, C. et Nicolas, J.** (2004b) Inhibition of polyphenoloxidase from apple by Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with L-cysteine under various conditions of pH and temperature. *LWT - Food Science and Technology* **37**, 1, pp 69-78.
- Billon, J., Ollieuz, N. et Tao, S.** (1979) Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'azote basique volatil total (ABVT) pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. *Revue Technique Veterinaire de l'Alimentation*.
- Blast**, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; consulté le 3 janvier 2016
- Bøknæs, N., Jensen, K. N., Andersen, C. M. et Martens, H.** (2002) Freshness assessment of thawed and chilled cod fillets packed in modified atmosphere using near-infrared spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology* **35**, 7, pp 628-634.
- Bonilla, A. C., Sveinsdottir, K. et Martinsdottir, E.** (2007) Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food control* **18**, 4, pp 352-358.

- Bono, G., Badalucco, C., Corrao, A., Cusumano, S., Mammina, L. et Palmegiano, G. B.** (2010) Effect of temporal variation, gender and size on cuticle polyphenol oxidase activity in deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chemistry* 123, 2, pp 489-493.
- Bono, G., Badalucco, C. V., Cusumano, S. et Palmegiano, G. B.** (2012) Toward shrimp without chemical additives: a combined freezing-MAP approach. *LWT - Food Science and Technology* 46, 1, pp 274-279.
- Bonora, M., Wieckowski, M. R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L. et Pinton, P.** (2015) Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 34, 12, pp 1475-1486.
- Borgo, R., Souty-Grosset, C., Bouchon, D. et Gomot, L.** (1996) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *Journal of Food Science* 61, 1, pp 1-4.
- Borowitzka, M.** (2013) High-value products from microalgae - their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* 25, 3, pp 743-756.
- Bossier, P.** (1999) Authentication of seafood products by DNA patterns. *Journal of Food Science* 64, 2, pp 189-193.
- Bottero, M. T. et Dalmaso, A.** (2011) Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal* 190, 1, pp 34-38.
- Bottero, M. T., Dalmaso, A., Cappelletti, M., Secchi, C. et Civera, T.** (2007) Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay. *Journal of Biotechnology* 129, 3, pp 575-580.
- Bourne, D. G., Høj, L., Webster, N. S., Swan, J. et Hall, M. R.** (2006) Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* 260, 1-4, pp 27-38.
- Bremner, H. A.** (1985) A convenient easy to use system for estimating the quality of chilled seafood. *Fish Processing Bulletin* 7, pp 59-70.
- Breuil, G.** (1991) Fiches d'identification des maladies et parasites des poissons, crustacés et mollusques. *Conseil international pour l'exploitation de la mer* Fiche n°50.
- Bush, R. K., Taylor, S. L., Holden, K., Nordlee, J. A. et Busse, W. W.** (1986) Prevalence of sensitivity to sulfiting agents in asthmatic patients. *The American Journal of Medicine* 81, 5, pp 816-820.
- Catanese, G., Manchado, M., Fernández-Trujillo, A. et Infante, C.** (2010) A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products. *Food Chemistry* 122, 1, pp 319-326.
- Cerenius, L. et Söderhäll, K.** (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 1, pp 116-126.
- Chabrillón, M., Rico, R., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Balebona, M. et Moriñigo, M.** (2005) Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases* 28, 9, pp 531-537.
- Chan, S. T., Yao, M. W., Wong, Y., Wong, T., Mok, C. et Sin, D. W.** (2006) Evaluation of chemical indicators for monitoring freshness of food and determination of volatile amines in fish by headspace solid-phase

- microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 224, 1, pp 67-74.
- Chantarachoti, J., Oliveira, A., Himelbloom, B., Crapo, C. et McLachlan, D.** (2006) Portable electronic nose for detection of spoiling Alaska pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Journal of food science* 71, 5, pp S414-S421.
- Chapela, M. J., Sotelo, C. G., Pérez-Martín, R. I., Pardo, M. Á., Pérez-Villareal, B., Gilardi, P. et Riese, J.** (2007) Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control* 18, 10, pp 1211-1215.
- Chen, Y. H. et Cui, Z.** (2006) Effect of Salts on the Freezing Denaturation of Lactate Dehydrogenase. *Food and Bioproducts Processing* 84, 1, pp 44-50.
- Chériot, S., Billaud, C., Maillard, M. N. et Nicolas, J.** (2007) Inhibition of polyphenoloxidase activity by mixtures of heated cysteine derivatives with carbonyl compounds. *Molecular nutrition & food research* 51, 4, pp 395-403.
- Chomnawang, C., Nantachai, K., Yongsawatdigul, J., Thawornchinsombut, S. et Tungkawachara, S.** (2007) Chemical and biochemical changes of hybrid catfish fillet stored at 4°C and its gel properties. *Food Chemistry* 103, 2, pp 420-427.
- Christensen, M. E., Jansen, E. S., Sanchez, W. et Waterhouse, N. J.** (2013) Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. *Methods* 61, 2, pp 138-145.
- Chu, F.-L. E., Dupuy, J. L. et Webb, K. L.** (1982) Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 29, 3-4, pp 241-252.
- Chuang, P.-S., Chen, M.-I. et Shiao, J.-C.** (2012) Identification of tuna species by a real-time polymerase chain reaction technique. *Food Chemistry* 133, 3, pp 1055-1061.
- Civera, T.** (2003) Species identification and safety of fish products. *Veterinary Research Communications* 27, 1, pp 481-489.
- Coates, C. J. et Nairn, J.** (2013) Hemocyanin-derived phenoloxidase activity: a contributing factor to hyperpigmentation in *Nephrops norvegicus*. *Food Chemistry* 140, 1-2, pp 361-9.
- Colombo, F., Mangiagalli, G. et Renon, P.** (2005) Identification of tuna species by computer-assisted and cluster analysis of PCR - SSCP electrophoretic patterns. *Food Control* 16, 1, pp 51-53.
- Colwell, R. et Grimes, D.** (1984) *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 37, 1-4, pp 265-287.
- Combrouse, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Kol, O., Guérardel, Y. et Midelet-Bourdin, G.** (2013) Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions. *Journal of Applied Microbiology* 114, 4, pp 1120-1131.
- Copin, S., Robert-Pillot, A., Malle, P., Quilici, M. L. et Gay, M.** (2012) Evaluation of most-probable-number-PCR method with internal amplification control for the counting of total and pathogenic *Vibrio*

- parahaemolyticus* in frozen shrimps. *Journal of Food Protection* **75**, 1, pp 150-153.
- Cornet, F., Anselme, K., Grard, T., Rouahi, M., Noel, B., Hardouin, P. et Jeanfils, J.** (2002) The influence of culture conditions on extracellular matrix proteins synthesized by osteoblasts derived from rabbit bone marrow. *J Biomed Mater Res* **63**, 4, pp 400-7.
- Corpet, F.** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research* **16**, 22, pp 10881-10890.
- Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., Delannoy, S., Fach, P. et Perelle, S.** (2015) A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *Int J Food Microbiol* **201**, pp 17-26.
- Dalgaard, P.** (2000) Freshness, quality and safety in seafoods. *Flair-Flow Europe Technical Manual (F-FE 380A/00)[ISBN 1 84170 110 6]*.
- Dalgaard, P., Buch, P. et Silberg, S.** (2002) Seafood spoilage predictor—development and distribution of a product specific application software. *International Journal of Food Microbiology* **73**, 2, pp 343-349.
- Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Secchi, C. et Bottero, M. T.** (2007) Identification of four tuna species by means of Real-Time PCR and melting curve analysis. *Veterinary Research Communications* **31**, S1, pp 355-357.
- Dalton-Bunnow, M.** (1985) Review of sulfite sensitivity. *American Journal of Health-System Pharmacy* **42**, 10, pp 2220-2226.
- Decker, H. et Jaenicke, E.** (2004) Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology* **28**, 7, pp 673-687.
- Decker, H., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, E. et Tuzek, F.** (2007) Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene* **398**, 1-2, pp 183-91.
- Decker, H., Schweikardt, T. et Tuzek, F.** (2006) The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 28, pp 4546-4550.
- Decker, H. et Terwilliger, N.** (2000) Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *Journal of Experimental Biology* **203**, 12, pp 1777-1782.
- Dehaut, A., Himber, C., Mulak, V., Grard, T., Krzewinski, F., Le Fur, B. et Duflos, G.** (2014) Evolution of volatile compounds and biogenic amines throughout the shelf life of marinated and salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 32, pp 8014-8022.
- Dehaut, A., Krzewinski, F., Grard, T., Chollet, M., Jacques, P., Brisabois, A. et Duflos, G.** (2016) Monitoring the freshness of fish: development of a qPCR method applied to MAP chilled whiting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**, 6, pp 2080-2089.
- Directive 95 2 CE.** (1995) Directive 95/2/CE du parlement européen et du conseil du 20 février 1995 concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants.
- Directive 2000 13 CE.** (2000) Directive 2000/13/CE du parlement européen et du conseil du 20 mars 2000 relative au rapprochement des législations des

- Etats membres concernant l'étiquetage et la présentation des denrées alimentaires ainsi que la publicité faite à leur égard.
- Directive 2003 89 CE.** (2003) Directive 2003/89/CE du parlement européen et du conseil du 10 novembre 2003 modifiant la directive 2000/13/CE en ce qui concerne l'indication des ingrédients présents dans les denrées alimentaires.
- Directive 2006 52 CE.** (2006) Directive 2006/52/CE du parlement européen et du conseil du 5 juillet 2006 modifiant la directive 95/2/CE concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants et la directive 94/35/CE concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires.
- Directive 2007 68 CE.** (2007) Directive 2007/68/CE de la commission du 27 novembre 2007 modifiant l'annexe III bis de la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne certains ingrédients alimentaires.
- Duflos, G., Coin, V. M., Cornu, M., Antinelli, J.-F. et Malle, P.** (2006) Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the science of food and agriculture* 86, 4, pp 600-611.
- Duflos, G., Degremont, S., Copin, S., Santos, J. P., Giordano, G., Mejean, V. et Malle, P.** (2002a) A new PCR method of characterizing seafood freshness. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* 10, 3, pp 149-159.
- Duflos, G., Dervin, C., Malle, P. et Bouquelet, S.** (1999) Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangius merlangus*). *Journal-AOAC International* 82, pp 1357-1363.
- Duflos, G., Leduc, F., N'Guessan, A., Krzewski, F., Kol, O. et Malle, P.** (2010) Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *Journal of the science of food and agriculture* 90, 15, pp 2568-2575.
- Duflos, G., Lefur, B., Mulak, V., Becel, P. et Malle, P.** (2002b) 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.
- Dufour, É., Frencia, J. P. et Kane, E.** (2003) Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness. *Food Research International* 36, 5, pp 415-423.
- Durmaz, Y., Donato, M., Monterio, M., Gouveia, L., Nunes, M., Gama Pereira, T., Gokpınar, S. et Bandarrah, N.** (2008) Effect of temperature on growth and biochemical composition (sterols, α -tocopherol, carotenoids, fatty acid profiles) of the microalga, *Isochrysis galbana*. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 60, 3, pp 190-197.
- Encarnacion, A. B., Fagutao, F., Hirono, I., Ushio, H. et Ohshima, T.** (2010) Effects of ergothioneine from mushrooms (*Flammulina velutipes*) on melanosis and lipid oxidation of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 4, pp 2577-2585.
- Encarnacion, A. B., Fagutao, F., Jintataporn, O., Worawattanamateekul, W., Hirono, I. et Ohshima, T.** (2012) Application of ergothioneine-rich extract from an edible mushroom

- Flammulina velutipes* for melanosis prevention in shrimp, *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *Food Research International* **45**, 1, pp 232-237.
- Encarnacion, A. B., Fagutao, F., Shozen, K.-i., Hirono, I. et Ohshima, T.** (2011) Biochemical intervention of ergothioneine-rich edible mushroom (*Flammulina velutipes*) extract inhibits melanosis in crab (*Chionoecetes japonicus*). *Food Chemistry* **127**, 4, pp 1594-1599.
- Enzyme nomenclature**, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>; consulté le 3 janvier 2016
- Ermakova, S., Men'shova, R., Vishchuk, O., Kim, S.-M., Um, B.-H., Isakov, V. et Zvyagintseva, T.** (2013) Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Structural characteristics and antitumor activity. *Algal Research* **2**, 1, pp 51-58.
- Ethuin, P., Marlard, S., Delosière, M., Carapito, C., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Dehaut, A., Lencel, V., Duflos, G. et Grard, T.** (2015) Differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis. *Food Chemistry* **176**, pp 294-301.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Costa, H. et Martínez, 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., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Costa, H., Pérez-Martin, R., Piñeiro-González, C., Craig, A., Mackie, I., Malmheden Yman, I., Ferm, M., Martínez, I., Jessen, F., Smelt, A. et Lutén, J.** (2000) Identification of fish species after cooking by SDS-PAGE and urea IEF: a collaborative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 7, pp 2653-2658.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Yman, I. M., Ferm, M., Craig, A., Mackie, I., Jessen, F., Smelt, A. et Lutén, J.** (1999) A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focusing: a collaborative study. *Electrophoresis* **20**, 10, pp 1923-1933.
- Evaluation de l'AERES sur l'unité Institut Régional de Recherche en Agroalimentaire et Biotechnologie "Charles Viollette"**, http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.aeres-evaluation.fr%2Fcontent%2Fdownload%2F23048%2F352865%2Ffile%2FE2015-EV-0593559Y-S2PUR150007534-005171-RD.pdf&ei=AnwVImCL4rvav_dgbAC&usg=AFQjCNFxeJ1Xz16_nOG2R6_nhlWDS_t1AxQ&sig2=qA_MV-YbggeCqMxZvPkIHw&bvm=bv.87269000.d.d2s&cad=rja; consulté le 3 janvier 2016
- FAO** (2005) dans Review of the state of world marine fishery resources, ed.
- FAO** (2014) dans The state of world fisheries and aquaculture, ed.
- Fernandez, M., Mano, S., Garcia de Fernando, G. D., Ordonez, J. et Hoz, L.** (1999) Use of β -hydroxyacyl-coA-deshydrogenase (HADH) activity to differentiate frozen from unfrozen fish. *European Food Research*, 209, pp 205-209.

- Fish barcode of life (Fish-Bol)**, <http://www.fishbol.org/>; consulté le 3 janvier 2016
- Fishbase**, <http://fishbase.mnhn.fr/search.php?lang=French>; consulté le 3 janvier 2016
- Fong, J. C. N., Syed, K. A., Klose, K. E. et Yildiz, F. H.** (2010) Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology* **156**, 9, pp 2757-2769.
- FranceAgrimer.** (2014a) Commerce extérieur des produits de la pêche et aquaculture 2013.
- FranceAgrimer.** (2014b) Les filières pêche et aquaculture en France édition avril 2014.
- FranceAgrimer.** (2015) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- Garcia-Carreno, F. L., Cota, K. et Navarrete Del Torao, M. A.** (2008) Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *J Agric Food Chem* **56**, pp 6454-6459.
- Garcia-Molina, F., Penalver, M. J., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F. et Tudela, J.** (2005) Enzymatic Method with Polyphenol Oxidase for the Determination of Cysteine and N-Acetylcysteine. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 16, pp 6183-6189.
- Garcia de Fernando, G. D., Fernandez, M., Diaz, O., Ordonez, J. et Hoz, L.** (1992) An objective method to differentiate between fresh and thawed trout meat (*Salmo gairdneri*). *Archiv. für Lebensmittelhygien* **43**, 1, pp 13-14.
- Gastaminza, G., Quirce, S., Torres, M., Tabar, A., Echechipia, S., Munoz, D. et Fernandez de Corres, L.** (1995) Pickled onion-induced asthma: a model of sulfite-sensitive asthma? *Clinical and Experimental Allergy* **25**, 8, pp 698-703.
- Gillies, L. A. et Kuwana, T.** (2014) Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *Journal of Cellular Biochemistry* **115**, 4, pp 632-640.
- Godet, S.** (2008) Isolement et caractérisation de trois gènes codant une lipase et deux estérases hypothétiques chez la microalgue *Isochrysis galbana* (*Prymnesiophyceae, Haptophyta*). Thèse de doctorat en Biophysologie des Organismes et des Populations. Université du Maine
- Gogvadze, V. et Zhivotovsky, B.** (2007) Alteration of mitochondrial function and cell sensitization to death. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**, 1, pp 23-30.
- Gokoglu, N. et Yerlikaya, P.** (2008) Inhibition effects of grape seed extracts on melanosis formation in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *International Journal of Food Science & Technology* **43**, 6, pp 1004-1008.
- Göller, K. et A. Galinski, E.** (1999) Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **7**, 1-4, pp 37-45.
- Gómez-Guillén, M. C., Martínez-Alvarez, Ó., Llamas, A. et Montero, P.** (2005) Melanosis inhibition and SO₂ residual levels in shrimps (*Parapenaeus longirostris*) after different sulfite-based treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 7, pp 1143-1148.

- Gould, E. et Medler, M.** (1970) Test to determine whether shucked oysters have been frozen and thawed. *Ass Offic Anal Chem J*, 53, pp 1237-1241.
- Gram, L. et Huss, H. H.** (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 1, pp 121-137.
- Greenpeace: Petit Navire, gros dégâts !**, <http://oceans.greenpeace.fr/petit-navire-gros-degats>; consulté le 3 janvier 2016
- Gribbestad, I. S., Aursand, M. et Martinez, I.** (2005) High-resolution ^1H magnetic resonance spectroscopy of whole fish, fillets and extracts of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) for quality assessment and compositional analyses. *Aquaculture* 250, 1-2, pp 445-457.
- Griffiths, A. M., Sotelo, C. G., Mendes, R., Pérez-Martín, R. I., Schröder, U., Shorten, M., Silva, H. A., Verrez-Bagnis, V. et Mariani, S.** (2014) Current methods for seafood authenticity testing in Europe: is there a need for harmonisation? *Food Control* 45, 0, pp 95-100.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M. et Malcata, F. X.** (2011) Microalgae as sources of high added-value compounds - a brief review of recent work. *Biotechnology Progress* 27, 3, pp 597-613.
- Gultekin, F. et Doguc, D. K.** (2013) Allergic and immunologic reactions to food additives. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 45, 1, pp 6-29.
- Haldar, S., Maharajan, A., Chatterjee, S., Hunter, S., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Asakura, M. et Yamasaki, S.** (2010) Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiological research* 165, 8, pp 639-648.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A. et Rodriguez-Martinez, H.** (2005) Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by mitotracker deep red 633. *Theriogenology* 63, 8, pp 2311-22.
- Hammond, J., Marquis, B., Michaels, R., Oickle, B., Segee, B., Vetelino, J., Bushway, A., Camire, M. E. et Davis-Dentici, K.** (2002) A semiconducting metal-oxide array for monitoring fish freshness. *Sensors and Actuators B: Chemical* 84, 2, pp 113-122.
- Hassoun, A. et Karoui, R.** (2015) Quality evaluation of fish and other seafood by traditional and nondestructive instrumental methods: advantages and limitations. *Critical reviews in food science and nutrition*.
- Hastein, T.** (1996) dans Rapports de synthèses sur les thèmes techniques présentés au comité international ou aux commissions régionales animale, O. m. d. l. s., Ed. pp 204-208.
- Hebert, P. D., Cywinska, A. et Ball, S. L.** (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270, 1512, pp 313-321.
- Heia, K., Esaiassen, M., Nilsen, H. et Sigernes, F.** (2003) Visible spectroscopy-evaluation of storage time of ice stored cod and frozen stored hake. *Quality of Fish from Catch to Consumer: Labelling, Monitoring & Traceability*, p 200.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V. et Anbazhagan, C.** (2011) Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 8, pp 1737-1746.
- Hernández-Martínez, M., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Almaraz-Abarca, N., Ponce-Mendoza, A. et Vásquez-Murrieta, M. S.** (2013) Prediction of total fat, fatty acid composition and nutritional

- parameters in fish fillets using MID-FTIR spectroscopy and chemometrics. *LWT - Food Science and Technology* **52**, 1, pp 12-20.
- Horstkotte, B. et Rehbein, H.** (2003) Fish species identification by means of restriction fragment length polymorphism and high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Science* **68**, 9, pp 2658-2666.
- Hoye, A. T., Davoren, J. E., Wipf, P., Fink, M. P. et Kagan, V. E.** (2008) Targeting mitochondria. *Acc Chem Res* **41**, 1, pp 87-97.
- Huang, J.-r., Huang, C.-y., Huang, Y.-w. et Chen, R.-h.** (2007) Shelf-life of fresh noodles as affected by chitosan and its Maillard reaction products. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 7, pp 1287-1291.
- Huang, J., Yang, Y. et Wang, A.** (2010) Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* **28**, 1, pp 240-4.
- Hyldig, G., Bremner, A., Martinsdóttir, E. et Schelvis, R.** (2007) dans Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality Ed. pp 529-548.
- Idakieva, K., Raynova, Y., Meersman, F. et Gielens, C.** (2013) Phenoloxidase activity and thermostability of *Cancer pagurus* and *Limulus polyphemus* hemocyanin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **164**, 3, pp 201-209.
- Ifremer : DCP employés par les pêcheries artisanales et industrielles : une question d'échelle,** <http://archimer.ifremer.fr/doc/00115/22657/20383.pdf>; consulté le 3 janvier 2016
- Ifremer : Sennes tournantes et coulissantes,** <http://wwz.ifremer.fr/peche/Le-monde-de-la-peche/La-peche/comment/Les-engins/Sennes>; consulté le 3 janvier 2016
- 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.
- Iwobi, A., Sebah, D., Kraemer, I., Losher, C., Fischer, G., Busch, U. et Huber, I.** (2015) A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food Chemistry* **169**, pp 305-313.
- Iyengar, R. et McEvily, A. J.** (1992) Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends in Food Science & Technology* **3**, pp 60-64.
- Jacquet, J. L. et Pauly, D.** (2008) Trade secrets: renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy* **32**, 3, pp 309-318.
- Jaenicke, E. et Decker, H.** (2003) Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochemical J* **371**, pp 515-523.
- Jang, M. S., Sanada, A., Ushio, H., Tanaka, M. et Ohshima, T.** (2003) Inhibitory effect of enokitake extract on melanosis of shrimp. *Fish. Sci.* **69**, 2, pp 379-384.
- Jeffrey, S., Brown, M. et Volkman, J.** (1994) Haptophytes as feedstocks in mariculture. *SYSTEMATICS ASSOCIATION SPECIAL VOLUME* **51**, pp 287-287.
- Jérôme, M., Lemaire, C., Verrez-Bagnis, V. et Etienne, M.** (2003) Direct Sequencing Method for Species Identification of Canned Sardine and

- Sardine-Type Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 25, pp 7326-7332.
- Jimenez, M. et Garcia-Carmona, F.** (1997) 4-substituted resorcinols (sulfite alternatives) as slow-binding inhibitors of tyrosinase catecholase activity. *J Agric Food Chem* 45, pp 2061-2065.
- Joslyn, M. et Braverman, J.** (1954) The chemistry and technology of the pre-treatment and preservation of fruit and vegetable products with sulfur dioxide and sulfites. *Advances in food research* 5, p 97.
- Kaneki, N., Tanaka, H., Kurosaka, T., Shimada, K. et Asano, Y.** (2003) Measurement of fish freshness using potentiometric gas sensor. *Sensors and materials* 15, 8, pp 413-422.
- Karlsen, C., Paulsen, S. M., Tunsjø, H. S., Krinner, S., Sørsum, H., Haugen, P. et Willassen, N.-P.** (2008) Motility and flagellin gene expression in the fish pathogen *Vibrio salmonicida*: effects of salinity and temperature. *Microbial pathogenesis* 45, 4, pp 258-264.
- Karoui, R., Lefur, B., Grondin, C., Thomas, E., Demeulemester, C., Baerdemaeker, J. D. et Guillard, A. S.** (2007) Mid-infrared spectroscopy as a new tool for the evaluation of fish freshness. *International journal of food science & technology* 42, 1, pp 57-64.
- 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.
- Karunasagar, I., Otta, S. K. et Karunasagar, I.** (1996) Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture* 140, 3, pp 241-245.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R. et Karunasagar, I.** (1994) Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128, 3-4, pp 203-209.
- Kent, M., Oehlenschlager, J., Mierke-Klemeyer, S., Knöchel, R., Daschner, F. et Schimmer, O.** (2004a) Estimation of the quality of frozen cod using a new instrumental method. *European Food Research and Technology* 219, 5, pp 540-544.
- Kent, M., Oehlenschlager, J., Mierke-Klemeyer, S., Manthey-Karl, M., Knöchel, R., Daschner, F. et Schimmer, O.** (2004b) A new multivariate approach to the problem of fish quality estimation. *Food Chemistry* 87, 4, pp 531-535.
- Kent, M., Tejada Yábar, M. et Huidobro, A.** (2004c) Time domain reflectometry as a tool for the estimation of quality in foods. *International agrophysics* 18, pp 225-229.
- Kim, J., Marshall, M. R. et Wei, C.** (2000) dans *Seafood Enzymes. Utilization and influence on post-harvest seafood quality* Norman, F., & Benjamin, K., Ed. pp 271-315, Marcel Decker, New York.
- 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 values. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 1, pp 159-164.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. et Brenner, C.** (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews* 87, 1, pp 99-163.
- Kumar, G., Kunal, S. P. et Menezes, M. R.** (2012) Genetic stock structure of frigate tuna (*Auxis thazard*) along Indian coast based on PCR-RFLP

- analyses of mtDNA D-loop region. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 12, 4.
- Lago, F. C., Alonso, M., Vieites, J. M. et Espiñeira, M.** (2014) dans *Seafood Processing* Ed. pp 419-452, John Wiley & Sons, Ltd.
- Le Bras, M., Clément, M. V., Pervaiz, S. et Brenner, C.** (2005) Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology* 20, 1, pp 205-220.
- Le Bris, C.** (2013) Le système phénoloxydase : caractérisation biochimique et rôle dans la réponse immunitaire chez la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* exposée à *Vibrio tapetis*. Thèse de doctorat en biologie marine. Université de Bretagne Occidentale
- Le Bris, C., Cudennec, B., Dhulster, P., Drider, D., Duflos, G. et Grard, T.** (2016) Melanosis in *Penaeus monodon*: involvement of the laccase-like activity of hemocyanin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 3, pp 663-670.
- 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.** (2012) 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 12, pp 2560-2568.
- Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A., Brenner, D. A. et Herman, B.** (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1366, 1-2, pp 177-196.
- Lilley, B. N. et Bassler, B. L.** (2000) Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Molecular microbiology* 36, 4, pp 940-954.
- Lin, W. F. et Hwang, D. F.** (2007) Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control* 18, 9, pp 1050-1057.
- Lin, W. F. et Hwang, D. F.** (2008) A multiplex PCR assay for species identification of raw and cooked bonito. *Food Control* 19, 9, pp 879-885.
- Lin, W. F., Shiau, C. Y. et Hwang, D. F.** (2005) Identification of four *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochrome b gene sequence and PCR-RFLP analysis. *Journal of Food and Drug Analysis* 13, 4, pp 382-387.
- Liu, C.-P. et Lin, L.-P.** (2001) Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42.
- Lobner, D.** (2000) Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods* 96, pp 147-152.
- Lockley, A. K. et Bardsley, R. G.** (2000a) DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11, 2, pp 67-77.
- Lockley, A. K. et Bardsley, R. G.** (2000b) Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 10, pp 4463-4468.

- López-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I. et Puyet, A.** (2005) Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 339, 1, pp 73-82.
- López-Caballero, M., Martínez-Álvarez, Ó., Gómez-Guillén, M. et Montero, P.** (2006) Effect of natural compounds alternative to commercial antimelanotics on polyphenol oxidase activity and microbial growth in cultured prawns (*Marsupenaeus tiger*) during chilled storage. *European Food Research and Technology* 223, 1, pp 7-15.
- Lopez, I. et Pardo, M. A.** (2005) Application of relative quantification TaqMan real-time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 11, pp 4554-4560.
- Lopparelli, R. M., Cardazzo, B., Balzan, S., Giaccone, V. et Novelli, E.** (2007) Real-time TaqMan polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: method validation and its application on commercial samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9, pp 3429-3434.
- Lougovois, V. P., Kyranas, E. R. et Kyrana, V. R.** (2003) Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International* 36, 6, pp 551-560.
- Luna-González, A., Almaraz-Salas, J. C., Fierro-Coronado, J. A., Flores-Miranda, M. d. C., González-Ocampo, H. A. et Peraza-Gómez, V.** (2012) The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture* 362-363, pp 28-32.
- Luten, J. et Martinsdottir, E.** (1997) QIM: a European tool for fish freshness evaluation in the fishery chain. *Proceedings of the final meeting of the concerted action evaluation of fish freshness* Paris, France: International Institute of Refrigeration., pp 87-296.
- Macagnano, A., Careche, M., Herrero, A., Paolesse, R., Martinelli, E., Pennazza, G., Carmona, P., D'Amico, A. et Natale, C. D.** (2005) A model to predict fish quality from instrumental features. *Sensors and Actuators B: Chemical* 111-112, pp 293-298.
- Mackie, I.** (1996) dans Food authentication Ashurt, P. R., & Dennis, M. J., Ed. pp 140-170, Blackie Academic and Professional, London.
- Mackie, I. M., Pryde, S. E., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Pérez-Martín, R., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M. et Rehbein, H.** (1999) Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science & Technology* 10, 1, pp 9-14.
- Maeda, M. et Nisizawa, K.** (1968) Fine structure of laminaran of *Eisenia bicyclis*. *Journal of biochemistry* 63, 2, pp 199-206.
- Malle, P. et Le Pezennec, I.** (1992) Rapid determination of fish freshness by evaluation of ATP degradation reflected in K value. *Détermination rapide de la fraîcheur du poisson par évaluation de la dégradation de l'ATP exprimée par le rapport K* 12, 2, pp 257-269.

- Malle, P. et Poumeyrol, M.** (1989) A new chemical criterion for the quality control of fish : trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *Journal of Food Protection* **52**, 6, pp 419-423.
- Malle, P. et Tao, S.** (1987) Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *Journal of Food Protection* **50**, 9, pp 756-760.
- Malle, P., Valle, M., Eb, P. et Tailliez, R.** (1998) Optimization of culture conditions for enumeration of H₂S bacteria in the flesh of seafish. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* **6**, 2, pp 129-141.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M. C. et Lerici, C. R.** (2000) Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science & Technology* **11**, 9–10, pp 340-346.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Robert, R. et Cadoret, J. P.** (2013) Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp.(T-iso). *Journal of applied phycology* **25**, 1, pp 109-119.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Le Dean, L., Mégrier, C., Lukomska, E., Kaas, R., Olivo, E., Baron, R., Robert, R. et Cadoret, J. P.** (2012) Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture* **326–329**, pp 106-115.
- Marko, P. B., Lee, S. C., Rice, A. M., Gramling, J. M., Fitzhenry, T. M., McAlister, J. S., Harper, G. R. et Moran, A. L.** (2004) Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature* **430**, 6997, pp 309-310.
- Marlard, S.** (2013) Différenciation de filets de poisson frais de filets congelés/décongelés sur le modèle du bar (*Dicentrarchus labrax*). Thèse de doctorat en biochimie alimentaire. Université du Littoral Côte d'Opale
- Martínez-Alvarez, O., Gómez-Guillén, C. et Montero, P.** (2008) Presence of hemocyanin with diphenoloxidase activity in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) post mortem. *Food Chemistry* **107**, 4, pp 1450-1460.
- Martínez-Alvarez, O., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C. et Montero, P.** (2009) The effect of several cooking treatments on subsequent chilled storage of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with different melanosis-inhibiting formulas. *LWT - Food Science and Technology* **42**, 8, pp 1335-1344.
- Martinez-Alvarez, O., Montero, P. et Gomez-Guillen, C.** (2008) Evidence of an active laccase-like enzyme in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chem* **108**, 2, pp 624-32.
- Martinez, I. et Friis, T. J.** (2004) Application of proteome analysis to seafood authentication. *Proteomics* **4**, 2, pp 347-354.
- Masuyama, M., Iida, R., Takatsuka, H., Yasuda, T. et Matsuki, T.** (2005) Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1723**, 1-3, pp 302-308.
- Matmaroh, K., Benjakul, S. et Tanaka, M.** (2006) Effect of reactant concentrations on the Maillard reaction in a fructose–glycine model system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase. *Food Chemistry* **98**, 1, pp 1-8.

- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H. et Sugiyama, M.** (2006) Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 13, pp 8981-8990.
- McEvily, A. J., iyengar, R. et Otwell, W. S.** (1991) Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food technology* **45**, 9, pp 80-86.
- Medina, I., Aubourg, S. P. et Pérez Martín, R.** (1997) Species differentiation by multivariate analysis of phospholipids from canned atlantic tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 7, pp 2495-2499.
- Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Simoni, P., Baraldini, M., De Laude, L. et Roda, A.** (2007) One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of yellowfin (*Thunnus albacares*), bigeye (*Thunnus obesus*), and skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and canned tuna samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 19, pp 7638-7647.
- Miyake, M. P.** (2010) dans Recent developments in the tuna industry : stocks, fisheries, management, processing, trade and markets, ed., Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Molkentin, J., Lehmann, I., Ostermeyer, U. et Rehbein, H.** (2015) Traceability of organic fish – authenticating the production origin of salmonids by chemical and isotopic analyses. *Food Control* **53**, pp 55-66.
- Montero, P., Ávalos, A. et Pérez-Mateos, M.** (2001a) Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chemistry* **75**, 3, pp 317-324.
- Montero, P., Lopez-Caballerro, M. E. et Perez-Mateos, M.** (2001b) The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). *Journal of Food Science* **66**, 8, pp 1201-1206.
- Montero, P., Martínez-Álvarez, O., Zamorano, J. P., Alique, R. et Gómez-Guillén, M. C.** (2006) Melanosis inhibition and 4-hexylresorcinol residual levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) following various treatments. *European Food Research and Technology* **223**, 1, pp 16-21.
- Moore, J. C., Spink, J. et Lipp, M.** (2012) Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science* **77**, 4, pp R118-R126.
- 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.
- Mueller, A., Raptis, J., Rice, P. J., Kalbfleisch, J. H., Stout, R. D., Ensley, H. E., Browder, W. et Williams, D. L.** (2000) The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1→3)-β-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology* **10**, 4, pp 339-346.
- Multalin: Multiple sequence alignment by Florence CORPET,** <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; consulté le 3 janvier 2016
- Nagai, T. et Kawabata, S. I.** (2000) A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 38, pp 29264-29267.

- Naish-Byfield, S. et Riley, P. A.** (1998) Tyrosinase autoactivation and the problem of the lag period. *Pigment Cell Research* **11**, 3, pp 127-133.
- Nambudiri, D. et Gopakumar, K.** (1992) ATPase and lactate dehydrogenase activities in frozen stored fish muscle as indices of cold storage deterioration. *Journal of Food Science* **Volume 57, Issue 1**, pages 72–76.
- NCBI Protein Database**, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>; consulté le 3 janvier 2016
- Nema, S. et Avis, K. E.** (1996) Protection of a model protein, lactate dehydrogenase, by encapsulation in liposome. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **50**, 4, pp 213-218.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K. et Tavernarakis, N.** (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1833**, 12, pp 3448-3459.
- Nilsen, H. et Esaiassen, M.** (2005) Predicting sensory score of cod (*Gadus morhua*) from visible spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology* **38**, 1, pp 95-99.
- 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*). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **197**, 1, pp 3-7.
- Nirmal, N. P. et Benjakul, S.** (2009) Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. *J Agric Food Chem* **57**, 9, pp 3578-86.
- Nirmal, N. P. et Benjakul, S.** (2011a) Inhibitory effect of mimosine on polyphenoloxidase from cephalothoraxes of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 18, pp 10256-10260.
- Nirmal, N. P. et Benjakul, S.** (2011b) Retardation of quality changes of Pacific white shrimp by green tea extract treatment and modified atmosphere packaging during refrigerated storage. *Int J Food Microbiol* **149**, 3, pp 247-253.
- Nirmal, N. P. et Benjakul, S.** (2011c) Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. *LWT - Food Science and Technology* **44**, 4, pp 924-932.
- Nirmal, N. P. et Benjakul, S.** (2012) Inhibition kinetics of catechin and ferulic acid on polyphenoloxidase from cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry* **131**, 2, pp 569-573.
- Nirmal, N. P., Benjakul, S., Ahmad, M., Arfat, Y. A. et Panichayupakaranant, P.** (2015) Undesirable enzymatic browning in crustaceans: causative effects and its inhibition by phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**, 14, pp 1992-2003.
- Norme ISO 14025.** (2010) NF EN ISO Août 2010 Marquages et déclarations environnementaux - Déclarations environnementales de type III - Principes et modes opératoires.
- Nott, K. P., Evans, S. D. et Hall, L. D.** (1999) Quantitative magnetic resonance imaging of fresh and frozen-thawed trout. *Magnetic Resonance Imaging* **17**, 3, pp 445-455.
- Nuño, K., Villarruel-López, A., Puebla-Pérez, A. M., Romero-Velarde, E., Puebla-Mora, A. G. et Ascencio, F.** (2013) Effects of the marine

- microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* in diabetic rats. *Journal of Functional Foods* **5**, 1, pp 106-115.
- O'Connor, J. E., Vargas, J. L., Kimler, B. F., Hernandez-Yago, J. et Grisolia, S.** (1988) Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **151**, 1, pp 568-73.
- O'Connell, M., Valdora, G., Peltzer, G. et Negri, R. M.** (2001) A practical approach for fish freshness determinations using a portable electronic nose. *Sensors and Actuators B: chemical* **80**, 2, pp 149-154.
- Ocaño-Higuera, V. M., Maeda-Martínez, A. N., Marquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D. F., Castillo-Yáñez, F. J., Ruíz-Bustos, E., Graciano-Verdugo, A. Z. et Plascencia-Jatomea, M.** (2011) Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chemistry* **125**, 1, pp 49-54.
- Oehlenschläger, J., Nychas, G. J. E., Lutén, J., Smelt, A., Nielsen, J., Dalgaard, P., Magnussen, M. P., Vaz-Pires, P., Nunes, M. L., Borderias, J., Careche, M., Proctor, M., McLoughlin, V., Hattula, T., Luoma, T., Olafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Mackie, I., Fleurence, J., Etienne, M., Verrez-Bagnis, V., Sørensen, N. K., Nielsen, H., Undeland, I. et Akeson, G.** (1997) Recherche de méthodes analytiques rapides et objectives - Méthodes pour déterminer la fraîcheur du poisson dans la recherche et l'industrie. *Action concertée : évaluation de la fraîcheur du poisson Séminaire pour les professionnels*
- Okombi, S.** (2005) Recherche et étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. Thèse de doctorat en chimie. Université Joseph-Fourier-Grenoble I
- 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.
- Olafsdóttir, 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.
- Olafsdóttir, G. et Tothill, I.** (2003) Rapid olfaction arrays for determining fish quality. *Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance*, pp 339-360.
- Pacquit, A., Frisby, J., Diamond, D., Lau, K. T., Farrell, A., Quilty, B. et Diamond, D.** (2007) Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chemistry* **102**, 2, pp 466-470.
- Pan, Y.-J., Souissi, S., Souissi, A., Wu, C.-H., Cheng, S.-H. et Hwang, J.-S.** (2014) Dietary effects on egg production, egg-hatching rate and female life span of the tropical calanoid copepod *Acartia bilobata*. *Aquaculture Research* **45**, 10, pp 1659-1671.
- Pang, Z., Otaka, K., Maoka, T., Hidaka, K., Ishijima, S., Oda, M. et Ohnishi, M.** (2005) Structure of β -Glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**, 3, pp 553-558.

- Parcke, M.** (1949) Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 28, pp 255-288.
- Pardo, M. A. et Pérez-Villareal, B.** (2004) Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. *Food Chemistry* 86, 1, pp 143-150.
- Pedrosa-Gerasmio, I. R., Babaran, R. P. et Santos, M. D.** (2012) Discrimination of juvenile yellowfin (*Thunnus albacares*) and bigeye (*T. obesus*) tunas using mitochondrial DNA control region and liver morphology. *PLoS ONE* 7, 4, p e35604.
- Product Environmental Footprint (PEF) News**, http://ec.europa.eu/environment/eussd/smgp/product_footprint.htm; consulté le 3 janvier 2016
- Percival, E. et McDowell, R. H.** (1967) dans *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*, ed.
- Pougnat, R., Loddé, B., Lucas, D. et Dewitte, J. D.** (2010) Occupational asthma with metabisulfite in a fisherman: report of one case. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* 71, 5, pp 836-840.
- Presley, A. D., Fuller, K. M. et Arriaga, E. A.** (2003) MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 793, 1, pp 141-150.
- Primer3Plus**, <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>; consulté le 3 janvier 2016
- Prost, C., Hallier, A., Cardinal, M., Courcoux, P., Le Quéré, J. et Étiévant, P.** (2003) Contribution of sensory and olfactometry analysis to discriminate the aroma of different species of seafood products analysed at three states of freshness, *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century- Proceedings of the 10th Weurman Flavour Research Symposium, Beaune, France, 25-28 June, 2002*. Editions Tec & Doc, pp 482-487.
- Qian, Y. F., Xie, J., Yang, S. P., Wu, W. H., Xiong, Q. et Gao, Z. L.** (2014) *In vivo* study of spoilage bacteria on polyphenoloxidase activity and melanosis of modified atmosphere packaged Pacific white shrimp. *Food Chem* 155, pp 126-31.
- QUERE Hervé sculptures** <http://hervequere.blogspot.fr/p/molecule-dadn.html>; consulté le 3 janvier 2016
- Quinteiro, J., Santaclara, F. J. et Rehbein, H.** (2008) dans *Quality parameters in canned seafood* A.G. Cabado, J. M. V., Ed. pp 135-158, Nova Science Publishers, Inc.
- Quinteiro, J., Sotelo, C. G., Rehbein, H., Pryde, S. E., Medina, I., Perez-Martin, R. I., Rey-Mendez, M. et Mackie, I. M.** (1998) Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4, pp 1662-1669.
- Raatikainen, O., Reinikainen, V., Minkkinen, P., Ritvanen, T., Muje, P., Pursiainen, J., Hiltunen, T., Hyvönen, P., von Wright, A. et Reinikainen, S.-P.** (2005) Multivariate modelling of fish freshness index

- based on ion mobility spectrometry measurements. *Analytica chimica acta* 544, 1, pp 128-134.
- Radha, S., Mullainadhan, P. et Arumugam, M.** (2013) Detection of two distinct types of hemolymphatic prophenoloxidase and their differential responses in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, upon infection by white spot syndrome virus. *Aquaculture* 376-379, pp 76-84.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N. A., Sridhar, S. et Rengasamy, R.** (2008) A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* 34, 2, pp 77-88.
- Ram, J. L., Ram, M. L. et Baidoun, F. F.** (1996) Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 8, pp 2460-2467.
- Rapport 2091(INI).** (2013) Rapport présenté le 4/12/2013 devant le Parlement Européen portant sur la crise alimentaire, la fraude dans la chaîne alimentaire et son contrôle.
- Rasmussen, R. S. et Morrissey, M. T.** (2008) DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 3, pp 280-295.
- Rasmussen, R. S. et Morrissey, M. T.** (2009) Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 2, pp 118-154.
- Règlement CE 104.** (2000) Règlement (CE) n°104/2000 du 17 décembre 1999 portant organisation commune des marchés dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- Règlement CE 178.** (2002) Règlement (CE) n°178/2002 du parlement européen et du conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires.
- Règlement CE 606.** (2009) Règlement (CE) n°606/2009 de la commission du 10 juillet 2009 fixant certaines modalités d'application du règlement (CE) n°479/2008 du Conseil en ce qui concerne les catégories de produits de la vigne, les pratiques œnologiques et les restrictions qui s'y appliquent.
- Règlement CE 1536.** (1992) Règlement (CEE) n°1536/92 du Conseil du 9 juin 1992 fixant les normes communes de commercialisation pour les conserves de thon et de bonite. *Règlement (CE) 1536*, L 163/1.
- Règlement CE 2065.** (2001) Règlement (CE) n°2065/2001 de la commission du 22 octobre 2001 établissant les modalités d'application du règlement (CE) n°104/2000 du conseil en ce qui concerne l'information du consommateur dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- Règlement CE 2073.** (2005) Règlement CE n°2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.
- Règlement CE 2074.** (2005) Règlement CE n°2074/2005 de la commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) n°854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE)

- n°882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) n°852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) n°853/2004 et (CE) n°854/2004.
- Règlement CE 2406.** (1996) Règlement CE n°2406/96 du conseil du 26 novembre 1996 fixant des normes communes de commercialisation pour certains produits de la pêche.
- Règlement UE 1169.** (2011) Règlement (UE) n°1169/2011 du conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires.
- Rehbein, H.** (1979) Development of an enzymatic method to differentiate fresh and sea-frozen and thawed fish fillets. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 169, 4, pp 263-265.
- Rehbein, H.** (1990) Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 191, 1, pp 1-10.
- Rehbein, H. et Aust, M.** (1980) Application of the Gr torrymeter and enzymic methods for the detection of thawed fish and fillets. *Archiv für Fischereiwissenschaft* 30, 2-3, pp 181-188.
- Rehbein, H., Kress, G. et Schmidt, T.** (1997) Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74, 1, pp 35-41.
- Rehbein, H., Kress, G. et Schreiber, W.** (1978) An enzymatic method for differentiating thawed and fresh fish fillets. *J. Sci. Food Agric.* 29, pp 1076-1082.
- Rehbein, H., Mackie, I. M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martin, R., Quinteiro, J. et Rey-Mendez, M.** (1999) Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry* 64, 2, pp 263-268.
- Rehbein, H., Mackie, I. M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Perez-Martin, R., Quinteiro, J. et Rey-Mendez, M.** (1995) Fish species identification in canned tuna by DNA analysis (PCR-SSCP). *Informationen für die Fischwirtschaft aus der Fischereiforschung* 42, 4, pp 209-212.
- Repnik, U., Hafner Česen, M. et Turk, B.** (2014) Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges. *Mitochondrion* 19, pp 49-57.
- Rezaei, M., Montazeri, N., Langrudi, H. E., Mokhayer, B., Parviz, M. et Nazarinia, A.** (2007) The biogenic amines and bacterial changes of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice. *Food Chemistry* 103, 1, pp 150-154.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P. et Quilici, M. L.** (2010) Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 143, 3, pp 190-197.
- Robles, V., Cabrita, E., de Paz, P., Cuñado, S., Anel, L. et Herráez, M. P.** (2004) Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. *Theriogenology* 61, 7-8, pp 1367-1379.

- Rodríguez-Jérez, J. J., Hernández-Herrero, M. M. et Roig-Sagués, A. X.** (2000) New methods to determine fish freshness in research and industry. *Global quality assessment in Mediterranean aquaculture*, Cahiers Options Méditerranéennes; n. 51, pp 63-69.
- Rolle, R. S., Guizani, N., Chen, J. S., Marshall, M. R., Yang, J. S. et Wei, C. I.** (1991) Purification and characterization of phenoloxidase isoforms from taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Food Biochemistry* 15, 1, pp 17-32.
- Ruiz-Capillas, C. et Moral, A.** (2001) Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. *Journal of Food Science* 66, 7, pp 1030-1032.
- Sadovskaya, I., Souissi, A., Souissi, S., Grard, T., Lencel, P., Greene, C. M., Duin, S., Dmitrenok, P. S., Chizhov, A. O., Shashkov, A. S. et Usov, A. I.** (2014) Chemical structure and biological activity of a highly branched (1→3,1→6)-β-D-glucan from *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers* 111, 0, pp 139-148.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. et Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 4839, pp 487-91.
- Saito, T., Arai, K.-i. et Matsuyoshi, M.** (1959) A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 24, 9, pp 749-750.
- Salfi, V., Fucetola, F. et Pannunzio, G.** (1985) A micromethod for the differentiation of fresh from frozen fish muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36, 9, pp 811-814.
- Sánchez, Á., Maceiras, R., Cancela, Á. et Pérez, A.** (2013) Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Applied Energy* 101, pp 192-197.
- Sánchez, S., Martínez, M. et Espinola, F.** (2000) Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal* 6, 1, pp 13-18.
- Sant'Ana, L. S., Soares, S. et Vaz-Pires, P.** (2011) Development of a quality index method (QIM) sensory scheme and study of shelf-life of ice-stored blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). *LWT - Food Science and Technology* 44, 10, pp 2253-2259.
- Santaclara, F. J., Velasco, A., Pérez-Martín, R. I., Quinteiro, J., Rey-Méndez, M., Pardo, M. A., Jimenez, E. et Sotelo, C. G.** (2015) Development of a multiplex PCR-ELISA method for the genetic authentication of *Thunnus* species and *Katsuwonus pelamis* in food products. *Food Chemistry* 180, pp 9-16.
- Schubring, R.** (1999) Determination of fish freshness by instrumental colour measurement. *Fleischwirtschaft International*, pp 26-29.
- Seguro, K., Tamiya, T., Tsuchiya, T. et Matsumoto, J. J.** (1989) Effect of chemical modifications on freeze denaturation of lactate dehydrogenase. *Cryobiology* 26, 2, pp 154-161.
- Sharrock, P., Zahraoui, C., Anselme, K., Rouahi, M., Noël, B., Grard, T., Jeanfils, J. et Hardouin, P.** (2001) Molecularly engineered hydroxylapatite. *Key Engineering Materials* 192-195, pp 483-486.

- Shewan, J. M.** (1977) dans *The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action*, ed., Torry Research Station.
- Siddiqui, N. I., Akosung, R. F. et Gielens, C.** (2006) Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **348**, 3, pp 1138-1144.
- Sikorski, Z. E. et Kotakowski, E.** (2000) Endogenous enzyme activity and seafood quality: influence of chilling, freezing, and other environmental factors. *Food Science and Technology - New York -Marcel Dekker*, pp 451-488.
- Sindermann, C. J.** (1970) Disease and parasite problems in marine aquaculture. *Contr. Trop. Atlant. Biol. Lab., Bur. Comm. Fish., Miami, Flo, USA*, 140.
- Sivertsen, A. H., Kimiya, T. et Heia, K.** (2011) Automatic freshness assessment of cod (*Gadus morhua*) fillets by Vis/Nir spectroscopy. *Journal of Food Engineering* **103**, 3, pp 317-323.
- Skálová, T., Dohnálek, J., Østergaard, L. H., Østergaard, P. R., Kolenko, P., Dušková, J., Štěpánková, A. et Hašek, J.** (2009) The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *Journal of Molecular Biology* **385**, 4, pp 1165-1178.
- Skulachev, V. P.** (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* **11**, 4, pp 473-485.
- Sletmoen, M. et Stokke, B. T.** (2008) Higher order structure of (1,3)- β -D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers* **89**, 4, pp 310-321.
- Smith, P. J., Griggs, L. et Chow, S.** (2001) DNA identification of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) in the New Zealand fishery. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **35**, 4, pp 843-850.
- Snoussi, M., Noumi, E., Hajlaoui, H., Usai, D., Sechi, L. a., Zanetti, S. et Bakhrouf, A.** (2009) High potential of adhesion to abiotic and biotic materials in fish aquaculture facility by *Vibrio alginolyticus* strains. *Journal of Applied Microbiology* **106**, 5, pp 1591-1599.
- Soudan, F., Daknof, A., Bazin, J., Chapel, G., Daspét, G. et Seynave, R.** (1957) Appréciation de l'altération du poisson frais par un examen organoleptique systématique. *Annal. Nutr. Alimentation* **11**, pp 1-24.
- Sun, Y.-y., Zhou, B., Xu, S.-z., Li, W.-h. et Yan, B.-l.** (2012) Separation and purification of intracellular and extracellular polysaccharides from *Isochrysis galbana* and their antimicrobial activity. *Food Science* **33**, 11, pp 137-141.
- Sveinsdottir, K., Hyldig, G., Martinsdottir, E., Jørgensen, B. et Kristbergsson, K.** (2003) Quality Index Method (QIM) scheme developed for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Quality and Preference* **14**, 3, pp 237-245.
- Takeyama, H., Chow, S., Tsuzuki, H. et Matsunaga, T.** (2001) Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification. *Journal of Fish Biology* **58**, 6, pp 1646-1657.

- Tall, A.** (2013) Ecologie des *Vibrio* spp. en Manche-Mer du Nord : diversité et occurrence de souches potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux, et déterminisme des paramètres environnementaux sur l'abondance des *Vibrio* spp. Thèse de doctorat en biologie marine. Université de Bretagne Occidentale
- Tall, A., Hervio-Heath, D., Teillon, A., Boisset-Helbert, C., Delesmont, R., Bodilis, J. et Touron-Bodilis, A.** (2013) Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by pyrH sequencing. *J Appl Microbiol* **114**, 6, pp 1713-24.
- Tall, A., Teillon, A., Boisset, C., Delesmont, R., Touron-Bodilis, A. et Hervio-Heath, D.** (2012) Real-time PCR optimization to identify environmental *Vibrio* spp. strains. *J Appl Microbiol* **113**, 2, pp 361-72.
- Taquet, M., Blanc, M., Dagorn, L., Filmalter, J. D., Fonteneau, A., Forget, F., Gaertner, J.-C., Galzin, R., Gervain, P., Goujon, M., Guillotreau, P., Guyader, O., Hall, M., Holland, K., Itano, D., Monteagudo, J.-P., Morales-Nin, B., Reynal, L., Sharp, M., Sokimi, W., Tanetoa, M. et Yen Kai Sun, S.** (2011) Artisanal and industrial FADs: a question of scale. Tahiti conference reviews current FAD use and technology. *Fisheries Newsletter* **136**, pp 35-45.
- Tavoularis, G., Recours, F. et Hebel, P.** (2007) Perception de la qualité et des signes officiels de qualité dans le secteur alimentaire. *Centre de Recherche pour l'Etude et l'Observation des Conditions de Vie (Crédoc)* **236**.
- Teletchea, F.** (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **19**, 3, pp 265-293.
- Terio, V., Di Pinto, P., Decaro, N., Parisi, A., Desario, C., Martella, V., Buonavoglia, C. et Tantillo, M. G.** (2010) Identification of tuna species in commercial cans by minor groove binder probe real-time polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA sequences. *Molecular and Cellular Probes* **24**, 6, pp 352-356.
- Thompson, F. L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G. S., Pereira, A., De Bem, M. M., Sorgeloos, P. et Swings, J.** (2003) *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 1, pp 245-252.
- Tian, X.-Y., Cai, Q. et Zhang, Y.-M.** (2011) Rapid classification of hairtail fish and pork freshness using an electronic nose based on the PCA method. *Sensors* **12**, 1, pp 260-277.
- TNS Sofres : innovation alimentaire : les tendances 2012**, <http://www.tns-sofres.com/etudes-et-points-de-vue/innovation-alimentaire-les-tendances-2012>; consulté le 3 janvier 2016
- Travers, M.-A., Miller, K. B., Roque, A. et Friedman, C. S.** (2015) Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of invertebrate pathology* **131**, pp 11-31.
- Tresse, O., Shannon, K., Pinon, A., Malle, P., Vialette, M. et Midelet-Bourdin, G.** (2007) Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. *Journal of Food Protection* **70**, 7, pp 1569-1578.

- Unsel, M., Beyermann, B., Brandt, P. et Hiesel, R.** (1995) Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods and Applications* 4, 4, pp 241-243.
- Uriarte, S., Fernández-Nieto, M., Arochena, L. et Sastre, J.** (2015) Occupational asthma in seafood manufacturing and food allergy to seafood. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 25, 1, pp 59-60.
- Usov, A. I. et Zelinsky, N. D.** (2013) dans *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* Domínguez, H., Ed. pp 23-86, Woodhead Publishing.
- Vally, H. et Misso, N. L. A.** (2012) Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 5, 1, pp 16-23.
- Vally, H., Misso, N. L. A. et Madan, V.** (2009) Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy* 39, 11, pp 1643-1651.
- Van Ruth, S. M., Rozijn, M., Koot, A., Garcia, R. P., Van der Kamp, H. et Codony, R.** (2010) Authentication of feeding fats: classification of animal fats, fish oils and recycled cooking oils. *Animal Feed Science and Technology* 155, 1, pp 65-73.
- Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., Morzel, M., Noël, 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 1539-1544.
- Vezzulli, L., Colwell, R. R. et Pruzzo, C.** (2013) Ocean warming and spread of pathogenic *Vibrios* in the aquatic environment. *Microbial Ecology* 65, 4, pp 817-825.
- Vezzulli, L., Previati, M., Pruzzo, C., Marchese, A., Bourne, D. G. et Cerrano, C.** (2010) *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology* 12, 7, pp 2007-2019.
- Viñas, J. et Tudela, S.** (2009) A validated methodology for genetic identification of tuna species (genus *Thunnus*). *PLOS one* 4, 10, p e7606.
- Vinogradov, E., Valence, F., Maes, E., Jebava, I., Chuat, V., Lortal, S., Grard, T., Guerardel, Y. et Sadovskaya, I.** (2013) Structural studies of the cell wall polysaccharides from three strains of *Lactobacillus helveticus* with different autolytic properties: DPC4571, BRO1, and LH1. *Carbohydr Res* 379, pp 7-12.
- Walker, J. R. et Ferrar, P. H.** (1998) Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and genetic engineering reviews* 15, 1, pp 457-498.
- Ward, R. D., Hanner, R. et Hebert, P. D. N.** (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* 74, 2, pp 329-356.
- Warm, K., Boknass, N. et Nielsen, J.** (1998) Development of quality index methods for evaluation of frozen cod (*Gadus morhua*) and cod fillets. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 7, 1, pp 45-59.
- Watnick, P. I. et Kolter, R.** (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology* 34, 3, pp 586-595.
- Weder, J. K. P., Rehbein, H. et Kaiser, K. P.** (2001) On the specificity of tuna-directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. *European Food Research and Technology* 213, 2, pp 139-144.

- Wolfe, A. J., Millikan, D. S., Campbell, J. M. et Visick, K. L.** (2004) *Vibrio fischeri* o54 controls motility, biofilm formation, luminescence, and colonization. *Applied and environmental microbiology* **70**, 4, pp 2520-2524.
- Won, K. M. et Park, S. I.** (2008) Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture* **285**, 1-4, pp 8-13.
- Xu, J., Wu, S. et Zhang, X.** (2008) Novel function of QM protein of shrimp (*Penaeus japonicus*) in regulation of phenol oxidase activity by interaction with hemocyanin. *Cellular Physiology and Biochemistry* **21**, 5-6, pp 473-480.
- Yan, F., Zhang, Y.-l., Luo, H.-q., Hu, Z., Huang, T.-w. et Ye, X.-q.** (2008) The phenoloxidase activity of hemocyanin from white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries Science* **1**, p 001.
- Yang, W. H. et Purchase, E. C.** (1985) Adverse reactions to sulfites. *Canadian Medical Association Journal* **133**, 9, p 865.
- Yildiz, F., Fong, J., Sadovskaya, I., Grard, T. et Vinogradov, E.** (2014) Structural characterization of the extracellular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O1 El-Tor. *PLoS ONE* **9**, 1, p e86751.
- Yildiz, F. H. et Schoolnik, G. K.** (1999) *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7, pp 4028-4033.
- Yoshioka, M., Yago, T., Yoshie-Stark, Y., Arakawa, H. et Morinaga, T.** (2012) Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* **338–341**, pp 111-117.
- You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L. et Zhou, S.** (2007) Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**, 5, pp 1137-1144.
- Yu, C. C., Chen, H. W., Chen, M. J., Chang, Y. C., Chien, S. C., Kuo, Y. H., Yang, F. L., Wu, S. H., Chen, J., Yu, H. H. et Chao, L. K. P.** (2010) Chemical composition and bioactivities of the marine alga *Isochrysis galbana* from Taiwan. *Natural Product Communications* **5**, 12, pp 1941-1944.
- Zamorano, J.-P., Martínez-Álvarez, O., Montero, P. et Gómez-Guillén, M. d. C.** (2009) Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chemistry* **112**, 1, pp 104-111.
- Zhu, K.-X., Li, J., Li, M., Guo, X.-N., Peng, W. et Zhou, H.-M.** (2013) Functional properties of chitosan–xylose Maillard reaction products and their application to semi-dried noodle. *Carbohydrate Polymers* **92**, 2, pp 1972-1977.
- Zorrilla, I., Chabrillon, M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M. et Morinigo, M.** (2003) Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. *Aquaculture* **218**, 1, pp 11-20.

Annexes : publications scientifiques représentatives

Annexe 1 : differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis



Differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis



Pierrette Ethuin^{a,*}, Sylvain Marlard^a, Mylène Delosière^b, Christine Carapito^c, François Delalande^c, Alain Van Dorselaer^c, Alexandre Dehaut^d, Valérie Lencel^a, Guillaume Duflos^d, Thierry Gard^a

^a Université du Littoral Côte d'Opale, équipe Biochimie des Produits Aquatiques (BPA), Boulevard du Bassin Napoléon, BP 120, 62327 Boulogne-sur-Mer, France

^b INRA, UR 370 Qualité des Produits Animaux (QuaPA), Site de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^c Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC, Université de Strasbourg, CNRS UMR7178, Strasbourg, France

^d ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments – Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2014

Received in revised form 1 December 2014

Accepted 16 December 2014

Available online 23 December 2014

Chemical compounds studied in this article:

3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonium]-1-propanesulfonate (PubChem CID: 107670)
Acetonitrile (PubChem CID: 6342)
Diaminopropane (PubChem CID: 6567)
Dithiothreitol (PubChem CID: 19001)
Ethanol (PubChem CID: 702)
Formic acid (PubChem CID: 284)
Iodoacetamide (PubChem CID: 3727)
Perchloric acid (PubChem CID: 24247)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (PubChem CID: 93573)
Urea (PubChem CID: 1176)

Keywords:

Sea bass (*Dicentrarchus labrax*)
2D-electrophoresis
Frozen–thawed
Fresh
Biogenic amines

ABSTRACT

This study aimed to identify a protein marker that can differentiate between fresh skinless and frozen–thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) technique. Distinct gel patterns, due to proteins with low molecular weight and low isoelectric points, distinguished fresh fillets from frozen–thawed ones. Frozen–thawed fillets showed two specific protein spots as early as the first day of the study. However, these spots were not observed in fresh fillets until at least 13 days of storage between 0 and 4 °C, fillets were judged, beyond this period, fish were unfit for human consumption as revealed by complementary studies on fish spoilage indicators namely total volatile basic nitrogen and biogenic amines. Mass spectrometry identified the specific proteins as parvalbumin isoforms. Parvalbumins may thus be useful markers of differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass fillets.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past several years, wild-caught fish have become rare although consumer demand for them has increased. The

development of frozen storage has allowed producers and suppliers to commercialize products worldwide, and thus meet consumer demand. Nevertheless, a common practice consists in thawing frozen fish and selling it as fresh fish; this practice is illegal under current regulations in the European Union, as mentioned in Directive 2000/13/EC, which lays down the rules for the labeling of foodstuffs including specifications as to their physical condition and the specific treatment that they have undergone (e.g. deep-frozen). There are several methods to differentiate between fresh and frozen–thawed fish (Duflos, Le Fur, Mulak, Becel, & Malle, 2002; Karoui, Thomas, & Dufour, 2006). Some methods are suitable for whole fish and skin-on fillets, but difficulties remain

* Corresponding author. Tel.: +33 3 21 99 45 20; fax: +33 3 21 99 45 24.

E-mail addresses: pierrette.ethuin@univ-littoral.fr (P. Ethuin), sylvain.marlard@univ-littoral.fr (S. Marlard), mylene.delosiere@clermont.inra.fr (M. Delosière), ccarapito@unistra.fr (C. Carapito), delaland@unistra.fr (F. Delalande), vandors@unistra.fr (A. Van Dorselaer), alexandre.DEHAUT@anses.fr (A. Dehaut), talon@univ-littoral.fr (V. Lencel), Guillaume.DUFLOS@anses.fr (G. Duflos), thierry.gard@univ-littoral.fr (T. Gard).

Annexe 2 : assessment of freshness and freeze-thawing of sea bream fillets (*Sparus aurata*) by a cytosolic enzyme: lactate dehydrogenase



Assessment of freshness and freeze-thawing of sea bream fillets (*Sparus aurata*) by a cytosolic enzyme: Lactate dehydrogenase



Mamadou Diop^{a,g}, Denis Watier^{b,c,d,e,f}, Pierre-Yves Masson^b, Amadou Diouf^g, Rachid Amara^a, Thierry Grard^{b,c,d,e,f,*}, Philippe Lencel^{b,c,d,e,f,1}

^a Univ. Littoral Côte d'Opale, CNRS, Univ. Lille, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, 32 Avenue Foch, Wimereux, France

^b Univ. Littoral Côte d'Opale, USC ANSES, EA 7394 – ICV – Institut Charles Viollette, F-62200 Boulogne sur Mer, France

^c Univ. Lille, F-59000 Lille, France

^d Univ. Artois, F-62000 Arras, France

^e INRA, France

^f ISA, F-59000 Lille, France

^g Université Cheikh Anta DIOP de Dakar, Laboratoire de Toxicologie et d'Hydrologie, BP 5005 Dakar, Senegal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2015

Received in revised form 23 February 2016

Accepted 29 April 2016

Available online 30 April 2016

Chemical compounds used in this article:

L-glutamine (PubChem CID 5961)

Penicillin (PubChem CID 5904)

Streptomycin (PubChem CID 19649)

Disodium phosphate (PubChem CID 24203)

Monosodium phosphate (PubChem CID 23672064)

Sodium chloride (PubChem CID 5234)

Hydrochloric acid (PubChem CID 313)

Iodonitrotetrazolium chloride (PubChem CID 64957)

Keywords:

Lactate dehydrogenase

Autolysis

Sea bream (*Sparus aurata*)

Fish cell lines SAF-1

Frozen-thawed

Fish freshness

ABSTRACT

The evaluation of freshness and freeze-thawing of fish fillets was carried out by assessment of autolysis of cells using a cytosolic enzyme lactate dehydrogenase. Autolysis plays an important role in spoilage of fish and postmortem changes in fish tissue are due to the breakdown of the cellular structures and release of cytoplasmic contents. The outflow of a cytosolic enzyme, lactate dehydrogenase, was studied in sea bream fillets and the *Sparus aurata* fibroblasts (SAF-1) cell-line during an 8 day storage period at +4 °C. A significant increase of lactate dehydrogenase release was observed, especially after 5 days of storage. The ratio between the free and the total lactate dehydrogenase activity is a promising predictive marker to measure the quality of fresh fish fillets. The effect of freeze-thawing on cytosolic lactate dehydrogenase and lysosomal α -D-glucosidase activities was also tested. Despite the protecting effect of the tissue compared to the cell-line, a loss of lactate dehydrogenase activity, but not of α -D-glucosidase, was observed. In conclusion, lactate dehydrogenase may be used as a marker to both assess freshness of fish and distinguish between fresh and frozen-thawed fish fillets.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Freshness is a key factor determining the quality of fish for human consumption. The alterations in fish tissues begin rapidly post-mortem and proceed through biochemical, physicochemical and microbial mechanisms (Ahmed, Donkor, Street, & Vasiljevic, 2015; Ocaño-Higuera et al., 2011). They depend considerably on species, age at the time of capture, slaughter methods, methods and temperature of storage (Álvarez, García García, Garrido, &

* Corresponding author at: Univ. Littoral Côte d'Opale, USC ANSES, EA 7394 – ICV – Institut Charles Viollette, F-62200 Boulogne sur Mer, France.

E-mail addresses: mamedou82@yahoo.fr (M. Diop), denis.watier@univ-littoral.fr (D. Watier), pierreyves.masson@gmail.com (P.-Y. Masson), amdiouf@refer.sn (A. Diouf), rachid.amara@univ-littoral.fr (R. Amara), thierry.grard@univ-littoral.fr (T. Grard), philippe.lencel@univ-littoral.fr (P. Lencel).

¹ T. Grard and P. Lencel share co-authorship of this article.

Annexe 3 : melanosis in *Penaeus monodon*: involvement of the laccase-like activity of hemocyanin

Melanosis in *Penaeus monodon*: Involvement of the Laccase-like Activity of Hemocyanin

Cédric Le Bris,^{*,†,‡,§,||,⊥} Benoit Cudennec,^{†,‡} Pascal Dhulster,^{†,‡} Djamel Drider,^{†,‡} Guillaume Duflos,[#] and Thierry Grard[†]

[†]Université Littoral Côte d'Opale, EA 7394—ICV—Institut Charles Viollette, F-62200 Boulogne sur Mer, France

[‡]Université Lille, F-59000 Lille, France

[§]Université Artois, F-62000 Arras, France

^{||}INRA, France

[⊥]ISA, F-59000 Lille, France

[#]ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments—Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Boulevard du Bassin Napoléon, F-62200 Boulogne sur Mer, France

ABSTRACT: In shrimp, the development of postmortem melanosis resulting from phenoloxidase activities leads to important economic losses. Phenoloxidase enzymes include catechol oxidases, laccases, and tyrosinases, but hemocyanin is also capable of phenoloxidase activities. These activities have been explored in *Penaeus monodon*, using different substrates. Results highlighted that tyrosinase-specific substrates were little oxidized, whereas hydroquinone (laccase-specific substrate) was more highly oxidized than L-DOPA (nonspecific substrate) in the pereopods and pleopods. Global phenoloxidase activity, assayed with L-DOPA, did not appear thermally stable over time and probably resulted from phenoloxidase enzymes. Conversely, the laccase-like activity assayed with hydroquinone was thermally stable over time, reflecting the thermal stability of hemocyanin. Independently of the anatomical compartment, the temperature, or the substrate, the highest activities were assayed in the cuticular compartments. This study demonstrates the complexity of phenoloxidase activities in *P. monodon*, and the importance of considering all the activities, including laccase-like activities such as that of hemocyanin.

KEYWORDS: melanosis, *Penaeus monodon*, phenoloxidase activities, laccase, hemocyanin

■ INTRODUCTION

Today, the global shrimp industry and more generally the crustacean industry have a high market value. *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) and *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798), the two major farmed shrimp species, are mainly exported to the United States, Japan, and the European Union. One issue with these seafood products is the development of a melanosis phenomenon commonly called “black spot”. This phenomenon, observed on both fresh and cooked shrimp, leads to a blackening of the cephalothorax carapace, the abdomen, the pods, and the whole shrimp from the head to the tail.¹ While this blackening does not modify the taste of the shrimp and appears to be harmless to consumers, it causes an undesirable appearance and radically reduces the consumer acceptability and consequently the market value of the product.^{1a,2} Many studies have focused on the origin of this melanosis, and all agree that this blackening results from phenoloxidase activities (PAs), independently of the molecules responsible for it. The term “phenoloxidases” includes three different enzymes: catechol oxidases (EC 1.10.3.1), laccases (EC 1.10.3.2), and tyrosinases (EC 1.14.18.1). The PAs correspond to the oxidation of monophenols into *o*-diphenols and *o*-diphenols into *o*-quinones as well as to the oxidation of *p*-diphenols into *p*-quinones.³ These different quinones then undergo a series of oxidation and polymerization processes resulting in the formation of melanin derivatives.⁴

In crustaceans, phenoloxidase enzymes are not the only proteins able to exhibit phenoloxidase activity (PA). Indeed,

hemocyanin, which is the oxygen carrier for arthropods and some mollusk species, could be activated like the prophenoloxidases and in so doing exhibit PA.⁵ This similarity between phenoloxidases and hemocyanin underlined the importance of differentiating the PAs from the phenoloxidase enzymes themselves. In crustaceans, hemocyanin is present in the hemolymph plasma in large quantities and represents between 90 and 95% of total plasma proteins whereas phenoloxidase enzymes, located in hemocytes in their inactivated form (prophenoloxidase), are present in negligible quantities.⁶ This imbalance in proportions has logically led to investigation of the role of hemocyanin in the melanosis process. The predominant role of hemocyanin in this blackening phenomenon has been demonstrated in various crustacean species^{2,6,7} whereas it has long been imputed to phenoloxidase enzymes alone.

A growing number of studies⁸ have investigated the responsibility of both hemocyanin and phenoloxidase enzymes in the postmortem development of melanosis in shrimp. The current trend is to find and characterize natural compounds in order to replace the currently used sodium metabisulfite which is known to cause allergic reactions in asthmatic people in particular.⁹ For example, inhibition of shrimp melanosis using

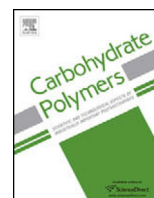
Received: October 16, 2015

Revised: December 9, 2015

Accepted: December 15, 2015

Published: December 15, 2015

Annexe 4 : chemical structure and biological activity of a highly branched (1→3,1→6)-β-D-glucan from *Isochrysis galbana*



Chemical structure and biological activity of a highly branched (1 → 3,1 → 6)-β-D-glucan from *Isochrysis galbana*

Irina Sadovskaya^a, Anissa Souissi^b, Sami Souissi^b, Thierry Grard^a, Philippe Lencel^a, Catherine M. Greene^c, Sarah Duin^c, Pavel S. Dmitrenok^d, Alexander O. Chizhov^e, Alexander S. Shashkov^e, Anatolii I. Usov^{e,*}

^a Equipe BPA, USC ANSES, Université du Littoral-Côte d'Opale, Boulogne sur Mer, France

^b Laboratoire de Océanologie et de Géosciences, UMR CNRS 8187 LOG, Université de Lille 1, Wimereux, France

^c Department Medicine, Royal College of Surgeons in Ireland, Education and Research Centre, Beaumont Hospital, Dublin 9, Ireland

^d G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

^e N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 47, Moscow, Russian Federation

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2014

Received in revised form 16 April 2014

Accepted 18 April 2014

Available online 28 April 2014

Keywords:

(1 → 3,1 → 6)-β-D-Glucan

Microalgae

Isochrysis galbana

Antiproliferative activity

ABSTRACT

A highly branched (1 → 3,1 → 6)-β-D-glucan was isolated from the microalga *Isochrysis galbana* Parke (Isochrysidales, Haptophyta). The polysaccharide structure was analyzed by methylation and Smith degradation, as well as by ESI and MALDI TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy. The glucan was shown to contain a (1 → 6)-linked backbone, where every residue is substituted at position 3 by Glc, which in turn may be substituted at C-6 by a single Glc or by rather short (up to tetrasaccharide) oligosaccharide chains. All the 3-linked Glc residues are present in these side chains. In the biological activity experiments it was demonstrated that the polysaccharide directly inhibits the proliferation of U937 human leukemic monocyte lymphoma cells and therefore has potential anti-tumor activity.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Microalgae are photosynthetic microorganisms with an important role as primary producers in most aquatic food webs. They are characterized by a high diversity and are potentially a great source of natural compounds for several biotechnological and therapeutic applications (Borowitzka, 2013; Guedes, Amaro, & Malcata, 2011; Raja, Hemaiswarja, Kumar, Sridhar, & Rengasamy, 2008). In fact, they convert inorganic substances into organic matter rich in lipids, proteins, carbohydrates and other molecules. Because of their high nutritional value, microalgae have been widely used in aquaculture as food for molluscs, zooplankton and early life-stages of crustaceans and small fishes (Hemaiswarja, Raja, Kumar, Ganesan, & Anbazhagan, 2011). Among microalgae, the species *Isochrysis galbana* is known to have good nutritional quality, and has received increasing interest in aquaculture mainly due to its polyunsaturated fatty acid content (Liu & Lin, 2001; Sánchez, Martínez, & Espinola, 2000; Yoshioka, Yago, Yoshie-Stark, Arakawa, & Morinaga, 2012). It also has beneficial effects on human health

and provides a good source of fish oil substitution in the human diet (Batista, Gouveia, Bandarra Narcisa, Franco, & Raymundo, 2013; Yu et al., 2010). In addition, *I. galbana* showed promising curative effects inducing weight loss, decreased glucose, triacylglycerol and cholesterol levels in diabetic rats (Nuño et al., 2013). Cultivation of *I. galbana* has also been suggested for biodiesel production (Sanchez, Maceiras, Cancela, & Pérez, 2013).

I. galbana is a marine flagellated microalga belonging to the phylum Haptophyta, class Coccolithophyceae, subclass Prymnesiophycidae, order Isochrysidales, family Isochrysidaceae (Guiry & Guiry, 2013). Its cells are easily assimilated by larval animals because of their small size (4–7 μm) and absence of a tough cell wall (Jeffrey, Brown, & Volkman, 1994; Liu & Lin, 2001). *I. galbana* is represented by different strains (Durmaz et al., 2008), the most commonly cultured one is the Tahitian strain “T-iso” (Marchetti et al., 2012a). Generally, this microalga is characterized by a fast growth rate, wide temperature and salinity tolerance and absence of toxins (Jeffrey et al., 1994). As all microalgae, the growth and biochemical composition of *I. galbana* cultures is dependent on variations of culture conditions (e.g. nutrients, temperature, salinity, and photoperiod) (Marchetti et al., 2012b).

I. galbana has a high content of soluble and insoluble polysaccharides and proteins as well as significant percentages of

* Corresponding author. Tel.: +7 499 137 6791; fax: +7 499 135 5328.
E-mail address: usov@ioc.ac.ru (A.I. Usov).

Annexe 5 : development of a qPCR method for the identification and quantification of *Thunnus obesus*, *Thunnus albacares* and *Katsuwonus pelamis* in canned tuna

Development of a qPCR Method for the Identification and Quantification of Two Closely Related Tuna Species, Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) and Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*), in Canned Tuna

Daline Bojolly,^{†,Δ,Σ} Périne Doyen,^{†,§,#,⊥,○} Bruno Le Fur,^Σ Urania Christaki,^Δ Véronique Verrez-Bagnis,[⊗] and Thierry Grard^{*,†,§,#,⊥,○}

[†]Université Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV – Institut Charles Viollette, USC Anses – ULCO, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

[§]Université Lille, F-59000 Lille, France

[#]Université Artois, F-62000 Arras, France

[⊥]INRA, France

[○]ISA, F-59000 Lille, France

^ΔLaboratoire d'Océanologie et de Géosciences, UMR 8187 (ULCO, Lille 1, CNRS), 62930 Wimereux, France

[⊗]Ifremer, F-44300 Nantes, France

^ΣPFINV, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

ABSTRACT: Bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) are among the most widely used tuna species for canning purposes. Not only substitution but also mixing of tuna species is prohibited by the European regulation for canned tuna products. However, as juveniles of bigeye and yellowfin tunas are very difficult to distinguish, unintentional substitutions may occur during the canning process. In this study, two mitochondrial markers from NADH dehydrogenase subunit 2 and cytochrome *c* oxidase subunit II genes were used to identify bigeye tuna and yellowfin tuna, respectively, utilizing TaqMan qPCR methodology. Two different qPCR-based methods were developed to quantify the percentage of flesh of each species used for can processing. The first one was based on absolute quantification using standard curves realized with these two markers; the second one was founded on relative quantification with the universal 12S rRNA gene as the endogenous gene. On the basis of our results, we conclude that our methodology could be applied to authenticate these two closely related tuna species when used in a binary mix in tuna cans.

KEYWORDS: tuna, authentication, quantification, canned products, TaqMan, qPCR, species identification, bigeye tuna (*Thunnus obesus*), yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

INTRODUCTION

Recent years have been marked by various food scandals such as “Horsegate” (meat adulteration crisis in Europe in 2013) and the results of fish product mislabeling studies.^{1,2} These events have highlighted the need to set up an enhanced traceability system to improve quality process in industries, to reinforce consumer protection, and to reduce fraudulent activities. Seafoods are in the “top 10” food products that are most likely to be the subject of fraud.³ Among these is one of the major marine species captured in 2012,⁴ tuna, which represents an important economic value in the canning industry. According to the European legislation, mixing of tuna species in tuna cans is strictly forbidden.⁵ However, substitutions between tuna species could appear during the filleting and canning process when external morphological characteristics, such as dorsal fins or finlets, are removed and fillets with similar appearance and texture are obtained. Furthermore, difficulties exist in identifying juveniles of bigeye tuna (*Thunnus obesus* Lowe, 1839) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares* Bonnaterre, 1788) due to their similarity.⁶ Moreover, these two species are

often captured together from the same schools, particularly around fish aggregation devices (FADs),⁷ which are extensively used nowadays, resulting in potential substitutions. It was these observations that led this study to focus on these two particular species.

Several methods have been developed to identify species when the flesh is raw or cooked. Prior to the 1990s, the most used technique was the isoelectric, which focused on proteins (IEF) through sarcoplasmic protein profiles.⁸ However, sterilization, which takes place during the canning process, induces an irreversible denaturation of proteins.⁹ Furthermore, IEF is sometimes of no value in discriminating fish species within families such as scombridae (mackerels, tunas, and bonitos).⁹ DNA, however, represents a great advantage over proteins as it is stable at high temperatures, is present in all cells

Received: October 24, 2016

Revised: January 10, 2017

Accepted: January 13, 2017

Published: January 13, 2017