



*Appel à projets 'soutien à l'innovation' 2002
Programme terminé en octobre 2004*

**Détermination de la qualité fraîcheur des poissons marins
par une technique rapide basée sur la PCR**

Chef de file : AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments)
Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Produits de la Pêche
Rue Huret Lagache – 62200 BOULOGNE-SUR-MER
Tél. : 03.21.99.25.00 ; fax : 03.21.30.95.47 ; p.malle@boulogne.afssa.fr
Contact : Pierre Malle

Partenaires : CNRS, Laboratoire de chimie bactérienne (Marseille,13)
SCM Coopérative Maritime Etaploise (Boulogne sur mer,62)
SA PRF (Rungis, 94)

■ **Situation du sujet et objectifs du projet**

Dans la filière poisson, l'évaluation objective de la fraîcheur est aujourd'hui encore difficile à réaliser. Le besoin de méthodes objectives performantes et rapides est largement exprimé au niveau de la production, de la transformation et de la distribution.

Les méthodes sensorielles d'appréciation de la fraîcheur gardent tout leur intérêt, mais elles sont lourdes et coûteuses, notamment en moyens humains. Par ailleurs il y a un besoin justifié de méthodes objectives : certaines déterminations chimiques sont très couramment pratiquées (dosages d'amines volatiles par exemple), mais elles présentent de réelles insuffisances, quant aux méthodes microbiologiques classiques, elles sont peu performantes pour évaluer l'altération et ne fournissent pas d'informations dans des délais compatibles avec les exigences de la filière.

Une réaction essentielle du processus d'altération du poisson correspond à la réduction par des bactéries spécifiques du triméthylamine N-oxyde (TMAO) en triméthylamine grâce à une enzyme bactérienne, la TMAO réductase. Le gène codant pour cette enzyme a été isolé. Les études préliminaires ont montré que ce gène est très conservé parmi les bactéries d'altération. L'utilisation de sondes moléculaires élaborées à partir de ce gène permet par la PCR la détection des bactéries d'altération dans la matrice poisson.

■ Dans un premier temps la technique PCR a été appliquée avec succès sur des cultures bactériennes et des poissons altérés. Pour finaliser ce test et obtenir des réponses à des stades d'altération plus précoces, les conditions PCR et le protocole d'extraction de l'ADN bactérien ont été optimisés.

Les résultats obtenus en PCR classique se sont révélés prometteurs, permettant une détection dans les différentes espèces étudiées (tacaud, merlan, lieu et carrelet) : les résultats positifs de la PCR sont apparus à un niveau d'altération correspondant à une flore totale de l'ordre de 100 000 ufc/g. Cette technique, relativement peu coûteuse, donne des résultats intéressants, mais n'aboutit pas à une quantification précise du nombre de cibles bactériennes présentes dans l'échantillon. Pour définir ce nombre, il faut passer à la technique de PCR quantitative (ou PCR en temps réel), technique qui présente par ailleurs l'avantage d'être très rapide, sans mise en œuvre d'une électrophorèse sur gel.

■ La suite des travaux a donc consisté à mettre au point les conditions précises d'amplification de la PCR quantitative (concentration en MgCl₂ et en sondes nucléiques, temps d'élongation), ces travaux étant le préalable à l'application de la PCR en temps réel sur des poissons d'espèces différentes à des niveaux d'altération différents.

Les essais effectués avec de l'ADN bactérien extrait du poisson (merlan, carrelet) montrent qu'il y a une corrélation entre le niveau d'amplification (crossing point) et l'état de fraîcheur du poisson. Ces résultats expriment une multiplication bactérienne au cours de la conservation sous glace : l'augmentation du nombre de bactéries contenant le système TMAO réductase est corrélée avec la durée de conservation du poisson. Une droite étalon permet de relier les résultats de la PCR quantitative (crossing point) au temps de conservation sous glace.

Des approches complémentaires par PCR quantitative à partir d'extraits de lieu noir et de lingue bleue viennent confirmer les résultats obtenus pour le merlan et la plie.

■ Conclusion

Les résultats démontrent que la PCR quantitative réalisée avec les sondes nucléiques ciblées sur le gène codant pour la TMAO réductase bactérienne peut constituer un outil rapide, précis et sensible pour le suivi de la conservation des poissons.

Pour envisager des applications fiables, ces résultats doivent encore être confirmés et l'étude doit être étendue à d'autres espèces.