

## Projet

# « Mise au point d'une méthode d'analyse globale de la fraîcheur - Test de la comète »

Rapport final – 30 mars 2011

Avec le soutien de :



## SOMMAIRE

Introduction.....	4
I. Mise au point de la méthode / Choix des paramètres .....	6
A. Développement de la méthode .....	6
Matériels et méthodes .....	6
1. Echantillons soumis à étude .....	6
2. Préparation des lames.....	7
3. Préparation de l'échantillon .....	8
4. Préparation et dépôt de la suspension cellulaire.....	9
5. Traitement des lames.....	9
6. Electrophorèse .....	9
7. Coloration des lames / marquage de l'ADN .....	10
8. Stockage des lames .....	10
9. Analyse et interprétation des images.....	10
10. paramètres morphologiques d'une comète .....	11
11. Analyse statistique .....	12
12. Schéma récapitulatif du protocole .....	13
Résultats .....	14
1. Optimisation des images .....	14
2. Optimisation de l'interprétation .....	14
3. Obtention d'un nombre suffisant de comètes.....	15
4. Recherche de conditions optimales .....	16
B. Première validation du protocole « Test de la comète ».....	18
1. Matériels et méthodes .....	18
2. Validation de la méthode sur les échantillons de saumon.....	19
3. Test préliminaire de la méthode sur des échantillons de truite .....	20
4. Améliorations possibles pour augmenter la sensibilité .....	21

II. Détermination de la durée minimale de décongélation détectable à 2, 5 et 10°C.....	25
A. Cinétique de dégradation du saumon à 10°C .....	25
B. Cinétique de dégradation du saumon à 5°C.....	26
C. Cinétique de dégradation du saumon à 2°C.....	28
III. Influence de la durée de congélation sur la qualité du témoin .....	30
IV. Détection d'une double congélation.....	33
V. Test de fraîcheur .....	37
A. Evaluation de l'état de fraîcheur du merlan .....	37
B. Evaluation de l'état de fraîcheur du saumon .....	38
VI. Amélioration de la sensibilité du test .....	41
Conclusion .....	42

## INTRODUCTION

La consommation des produits aquatiques en France est en progression continue. Elle est passée de 12 kg par personne en 1975, à 25 kg/personne en 1988, pour atteindre aujourd'hui 34,5 kg/personne. Le taux de croissance moyen annuel au cours des 10 dernières années est de 1,3%. Cette progression de consommation est conjuguée à la diminution des ressources, en particulier pour les espèces sauvages, très prisées. La pêche française doit aussi faire face à une réduction régulière des quotas de pêche et à l'augmentation des prix du pétrole. En conséquence, les volumes débarqués en France diminuent régulièrement chaque année.

L'import permet de compenser une certaine décroissance des tonnages débarqués et de satisfaire une consommation en augmentation. Les importations de produits aquatiques ont augmenté de plus de 35% ces 10 dernières années. Par ailleurs, pour pallier à l'insuffisance et à l'irrégularité des approvisionnements en poisson frais, on assiste depuis peu à l'apparition d'un mouvement visant à approvisionner les rayons de poisson frais en poisson décongelé. Cette tendance correspond certainement à une évolution logique de la filière, liée notamment à la baisse de la ressource halieutique dans les pays développés. Mais elle représente un risque de concurrence supplémentaire pour les professionnels de la pêche fraîche française, déjà durement éprouvés par les problèmes de baisse de ressources et d'augmentation du prix du pétrole.

La fraîcheur et la qualité des produits aquatiques restent également au centre des préoccupations des professionnels et des consommateurs. Pour les producteurs français, l'amélioration de la qualité du poisson de pêche fraîche, et notamment sa fraîcheur représente un enjeu important. Il est essentiel que les produits issus de la pêche fraîche puissent se différencier des produits d'importation, et notamment des produits vendus à l'état décongelé. Le développement de méthodes objectives de caractérisation de la fraîcheur des filets de poissons (premiers stades après la pêche) par des méthodes physiques ou biochimiques doivent être développées. Actuellement les méthodes d'analyses classiques, telles que le dosage de l'ABVT ou de la TMA, ne donnent de résultats qu'à partir de la deuxième semaine de conservation sous glace fondante. Elles mesurent donc bien l'altération du poisson, mais sont beaucoup moins efficaces pour quantifier sa fraîcheur. Pour faire face à l'augmentation croissante de produits de la pêche d'importation vendus décongelés sur l'étal, la mise en place d'outils de différenciation du frais et du décongelé par des moyens analytiques fiables et incontestables est aussi incontournable.

Enfin, concernant les matières premières d'importation, les nouvelles pratiques (tolérées) dites de « double congélation » qui concernent essentiellement les filets de poissons blancs en provenance d'Asie (= poissons blancs surgelés entiers à bord, expédiés en Asie pour y être filetés, puis recongelés sous forme de filets) ont un impact direct sur la texture des produits, posant des

problèmes technologiques aux utilisateurs de ces matières premières : le développement des outils analytiques permettant de détecter cette double congélation doit aussi être étudié.

Ce projet est dédié à l'optimisation et à la validation d'une méthode permettant de mettre en évidence des altérations de l'ADN (microélectrophorèse de cellules isolées ou test de la comète) pour :

- Détecter des produits ayant été congelés / décongelés et les différencier des produits frais
- Détecter des produits ayant subi une double congélation (surgélation de poisson entier - décongélation - filetage - surgélation des filets)
- Etudier la faisabilité de l'utiliser comme test de l'appréciation de la fraîcheur des poissons

Ce rapport fait état des résultats obtenus conjointement par Aérial, l'Equipe CAMBA (Equipe de Chimie Analytique des Molécules BioActives, Université de Strasbourg) et Haliomer (CEVPM) au terme de ce projet de 21 mois.

## I. MISE AU POINT DE LA METHODE / CHOIX DES PARAMETRES

### A. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE

#### MATERIELS ET METHODES

##### 1. ECHANTILLONS SOUMIS A ETUDE

Les essais ont été réalisés sur 3 espèces différentes, prises comme références, et parmi les plus consommées en France.

Deux espèces de poissons maigres :

- le merlan (*Merlangius merlangus*)
- le cabillaud (*Gadus morhua*)

Une espèce de poisson gras

- le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*)

Les différentes espèces ont été achetées et préparées par HALIOMER, Institut Technique situé à Boulogne-sur-Mer, première plate-forme de négoce et de transformation des produits aquatiques.

Le merlan et le cabillaud sont deux espèces débarquées par la pêche artisanale boulonnaise. Ils ont été achetés à l'état frais / réfrigéré sur le port de Boulogne, dans un excellent état de fraîcheur (48h maximum après la pêche). Leur qualité a, selon les cas, été évaluée extra ou A+.

Le saumon est un poisson d'importation, que l'on peut acquérir 2 à 3 jours après l'abattage. Les essais ont été réalisés à partir de saumon importé de Norvège ou d'Ecosse. Les lots étaient de qualité extra, au moment de leur achat pour la préparation des essais.

Au fur et à mesure de leur préparation, les échantillons ont été expédiés (à l'état frais ou surgelé par transporteur TSE) à AERIAL et à CAMBA, dans l'objectif d'évaluer l'intérêt du test de la comète.

Plusieurs échantillons ont été préparés et fournis par HALIOMER aux partenaires suivant un mode de préparation préétabli et une traçabilité bien définie. Quelques échantillons ont également été préparés « de façon anonyme » et transmis « en aveugle » pour évaluer la fiabilité du test de la comète sur ses différentes applications potentielles.

Quelques échantillons de poissons surgelés (simple et double congélation) ont également été fournis par des entreprises, dans l'objectif de faire des mesures sur des échantillons commerciaux fabriqués de manière industrielle.

#### Préparation d'échantillons congelés / décongelés

Des lots de merlan, cabillaud et saumon ont été achetés à l'état frais / réfrigéré. Les différentes espèces ont été filetées sans peau (ou en pavés pour le saumon), ensachées individuellement sous vide, surgelées rapidement en cellule de surgélation rapide ACFRI à air pulsé (-30°C), stockées pendant une quinzaine de jours à -18°C, puis décongelées en atmosphère réfrigérée selon des pratiques industrielles. Différentes températures de décongélation ont été mises en œuvre et comparées : 2°C, 5°C et 10°C.

#### Préparation des échantillons simple et double congélation

Des lots de merlan, cabillaud et saumon ont été achetés à l'état frais / réfrigéré. Les différentes espèces ont été étêtées / vidées, nettoyées, ensachées individuellement sous vide, surgelées rapidement en cellule de surgélation rapide ACFRI à air pulsé (-30°C), puis stockées pendant une quinzaine de jours à -18°C. Elles ont ensuite été décongelées complètement en atmosphère réfrigérée à 8/10°C selon des pratiques industrielles ; elles ont ensuite été filetées (ou découpées en pavés pour le saumon), reconditionnées sous vide puis surgelées de nouveau rapidement en cellule de surgélation rapide ACFRI à air pulsé (-30°C). Les échantillons ont ensuite été expédiés à l'état surgelé par transports rapides TSE (-20°C).

#### Préparation des échantillons pour l'appréciation de la fraîcheur

Des lots de merlan et de saumon ont été achetés à l'état frais / réfrigéré.

Le merlan a été fileté (sans peau) à HALIOMER. Les filets ont été conservés sous glace à 0°C en chambre froide réfrigérée. Des filets ont été ensachés sous vide à différents stades la conservation sous glace (J0, J2, J5, J7, J9 et J12), puis expédiés aux partenaires pour la réalisation des mesures.

Le saumon a été fileté (sans peau) à HALIOMER, désarêté puis découpé en pavés. Les pavés ont été conservés sous glace à 0°C en chambre froide réfrigérée, puis mis sous vide à différents stades de la conservation sous glace (J0, J2, J5, J7, J9, J12 et J14), et expédiés aux partenaires pour la réalisation des mesures.

## 2. PRÉPARATION DES LAMES

Les lames sont plongées dans une cuve remplie de méthanol toute une nuit dans le but d'éliminer les graisses et les impuretés potentiellement présentes qui pourraient causer le décollement du gel d'agarose par la suite. Ces lames sont ensuite séchées quelques minutes à l'étuve jusqu'à évaporation complète du méthanol puis marquées sur la face dépolie rugueuse. Deux couches d'agarose sont déposées sur les lames. En effet, il est nécessaire de déposer une première couche d'agarose dans le but d'augmenter l'adhérence du dépôt ultérieur. De préférence, cette pré-couche devra être de concentration la plus proche possible de celle contenant l'échantillon.

- La première couche est constituée de LMA à 0,5% ou 1% dans de l'eau suivant les manipulations. La solution est réalisée dans des flacons en verre de 10 mL dont le bouchon sera serré fortement afin d'éviter une évaporation de l'eau lors du passage au micro-onde (ce qui augmenterait la concentration en agarose). On chauffe environ 10 secondes au micro-onde en évitant l'ébullition.

On dépose ensuite 50 µL de cette solution de LMA sur la face dépolie d'une lame et on y applique directement un couvre-lame tout en évitant l'apparition de bulles d'air. La prise en masse du gel d'agarose est favorisée en plaçant les lames au réfrigérateur ou sur glace pilée environ 10 à 15 minutes. Les couvre-lames sont ensuite ôtés délicatement en les faisant glisser.

- La deuxième couche est constituée de LMA de 0,75% ; 1% ; 1,5% ou 2% suivant les manipulations. Ces solutions sont chauffées au micro-onde de la même manière que les précédentes et seront ensuite maintenues à une température comprise entre 37 et 45° C suivant les concentrations dans un bain-marie. Effectivement, il est préférable de ne pas mettre en contact l'ADN des échantillons avec de l'agarose à température élevée afin d'éviter toute dégradation. On mélange dans un tube Eppendorf 600 µL de LMA à 100 µL de la solution contenant l'échantillon et décrite ci-après. On dépose ensuite 100 µL de ce mélange sur les faces dépolies des lames pré-traitées. Les opérations à suivre jusqu'à ce qu'on retire les couvre-lames sont identiques à celles effectuées pour la première couche d'agarose.

### 3. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Dans le but d'éviter une rupture de la chaîne du froid lors des manipulations, on remplit au préalable une boîte en polystyrène de glace pilée. Cette glace pilée sera nécessaire à plusieurs moments de la préparation. On remplit ensuite des flacons de 10 mL en verre avec 5 mL de dissociant cellulaire (CDB-Hanks, CDB-PBS ou trypsine-EDTA) et un barreau magnétique. L'ensemble est déposé dans la glace pilée. Ces flacons seront ensuite enveloppés dans de l'aluminium pour éviter toute dégradation potentielle due aux rayonnements UV. Une fois l'échantillon de poisson sorti du congélateur et extrait de son emballage protecteur, on le place sur une feuille d'aluminium posée sur la glace. Ceci permet de limiter au maximum l'apport de chaleur à l'échantillon. On découpe ensuite l'échantillon à l'aide d'un bistouri stérilisé à usage unique puis on pèse 0,5 à 0,7 g d'échantillon à l'aide d'une balance. Les échantillons témoins sont directement et rapidement transférés dans les flacons refroidis contenant le dissociant. Les échantillons qui ont subi un temps déterminé de décongélation (10min, 20min, 30min, 1h, 2h, 3h...) seront quant à eux entreposés dans une étuve à température contrôlée puis transférés à leur tour dans les flacons de dissociant.

On dépose ensuite ces flacons de dissociant contenant les échantillons témoins et décongelés dans un récipient métallique rempli de glace et on agite durant 5 à 15 min grâce à un agitateur magnétique. La solution doit devenir trouble, ce qui indique la dissociation des cellules. Après

agitation, on réalise une filtration sur gaze hydrophile dans des tubes de 10 mL déposés en partie dans la boîte en polystyrène contenant la glace pilée. On laisse décanter environ une minute, puis on récupère 100  $\mu$ L du surnageant de cette suspension cellulaire filtrée. Ce sont ces 100  $\mu$ L qui seront mélangés aux 600  $\mu$ L de LMA.

#### 4. PREPARATION ET DEPOT DE LA SUSPENSION CELLULAIRE

On place donc 100  $\mu$ L du surnageant filtré de la suspension cellulaire dans un tube Eppendorf. On ajoute 600  $\mu$ L de LMA et on passe au Vortex pendant quelques secondes. On prélève ensuite 100  $\mu$ L du mélange que l'on dépose de manière homogène sur les lames pré-traitées qui seront rapidement recouvertes de couvre-lames et déposées au réfrigérateur à l'abri de la chaleur et de la lumière environ 10 minutes. Après cette durée nécessaire à la solidification du gel, on retire délicatement les couvre-lames.

#### 5. TRAITEMENT DES LAMES

Les lames sont directement rassemblées dans un porte-lame après leur avoir retiré les couvre-lames. Ceci va faciliter un passage rapide vers les différents milieux contenus dans des cuves opaques. Les lames sont tout d'abord immergées durant 10 min dans une cuve déposée sur la pailleuse contenant une solution de SDS à 2,5% à température ambiante. La conservation de la cuve de SDS se fait au réfrigérateur en dehors des manipulations ; ceci nécessitant un passage préalable au bain-marie à 40°. On immerge ensuite directement le porte-lame dans une cuve de TBE que l'on va cette fois déposer au réfrigérateur durant 5 min.

#### 6. ELECTROPHORÈSE

On règle le générateur sur le voltage choisi pour l'expérience. On remplit la cuve avec un volume fixe de tampon TBE à 0,45 M pour garantir une manipulation répétable. Les lames sont déposées à la même hauteur et sans espace dans la cuve ; elles doivent être entièrement immergées. Il faut éviter les bulles d'air et vérifier que la cuve soit stable et horizontale. On applique ensuite l'électrophorèse durant un temps déterminé en connectant les câbles du générateur à la cuve. Il est nécessaire de vérifier que l'ampérage soit différent de zéro afin d'être sûr que la connexion soit correcte.

Pour mettre fin à l'électrophorèse, on retire les câbles. On rassemble les lames dans le porte-lame et on immerge l'ensemble durant 5 min dans une cuve d'eau milli-Q placée au réfrigérateur. Cette étape de lavage est nécessaire afin d'éviter de colorer ultérieurement le TBE présent sur les lames. On sèche ensuite les lames durant 5 min sur du papier absorbant déposé au fond d'une boîte en polystyrène recouverte d'aluminium. Les lames doivent être déposées avec soin en faisant bien attention à la face dépolie. Il faut éviter au maximum d'exposer les lames à la lumière durant la manipulation. Cette étape de séchage est nécessaire afin d'éviter une dilution du colorant utilisé ultérieurement.

## 7. COLORATION DES LAMES / MARQUAGE DE L'ADN

Les lames séchées sont rassemblées dans le porte-lame et immergées durant 10 min au réfrigérateur dans une cuve contenant le fluorochrome (Sybr Green I ou Sybr Gold) dilué au 1/10000<sup>ème</sup> dans un tampon Tris-EDTA à pH 8, et conservé au réfrigérateur. Le fluorochrome perd rapidement en intensité lors de son exposition à des températures supérieures à 4°C, c'est pourquoi il doit être constamment stocké au réfrigérateur. Au bout des 10 min de coloration de l'ADN, on rince rapidement en passant le porte-lame dans une cuve d'eau milli-Q afin de limiter le risque de toxicité aigüe pour la platine du microscope.

## 8. STOCKAGE DES LAMES

On dépose ensuite les lames dans une boîte en polystyrène remplie de glace pilée dans laquelle on aura déposé un papier humidifié en surface. Ceci permet de maintenir les lames à l'abri de la chaleur et surtout de maintenir une atmosphère humide permettant de ralentir le séchage des lames. Cette boîte sera fermée et les lames y seront déposées le plus rapidement possible et le plus à l'abri de la lumière possible (pour éviter une perte d'intensité de fluorescence qui se produit à la lumière du jour). En effet, les lames sèchent très rapidement et particulièrement durant l'observation au microscope. La ré-humidification grâce à une pissette d'eau distillée avant ou pendant l'observation facilite et améliore la durée potentielle d'observation des lames. Les lames étant colorées en même temps, il sera nécessaire de réaliser l'observation immédiatement après cette étape pour garantir une interprétation optimale.

## 9. ANALYSE ET INTERPRETATION DES IMAGES

Pour observer les lames traitées par les fluorochromes décrits, un microscope à fluorescence Nikon Eclipse 50i équipé de la caméra Andor™ Technologie Luca S a été utilisé. Le profil des comètes a été observé dans un premier temps avec un objectif de faible grossissement (10X) puis, dans un second temps, avec un objectif à plan fluor de grossissement 20X, cet objectif étant plus adapté et plus précis. Les mesures morphologiques ont été réalisées grâce au logiciel de traitement des données Komet 6.0 Andor™ Technologie; la mesure se faisant de manière automatique par le logiciel (Figure 1). Il suffit de placer un cadre de sélection autour de la comète comme indiqué ci-dessous. La mesure se fait alors de manière automatique par le logiciel qui devra reconnaître correctement la tête et la queue de la comète.

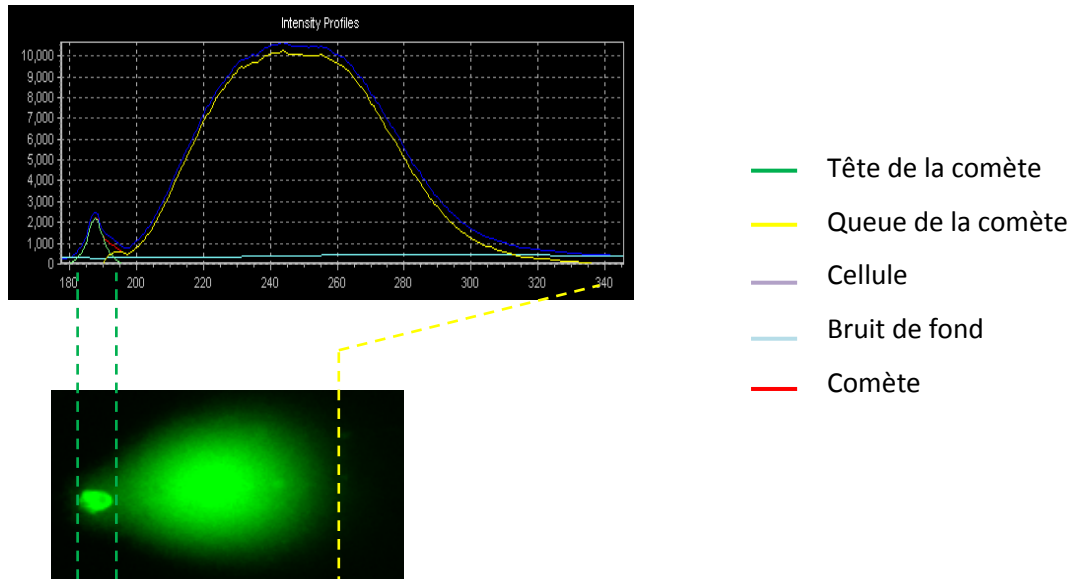


Figure 1: Profil d'intensité des comètes obtenu avec le logiciel Komet 6.0 Andor™ Technologie

## 10. PARAMETRES MORPHOLOGIQUES D'UNE COMETE

Le profil électrophorétique de l'ADN cellulaire a l'apparence d'une « comète » se divisant en deux zones distinctes de taille variable :

- la tête correspondant à la cellule contenant des ADN de poids moléculaires élevés
- la queue correspondant aux ADN de bas poids moléculaires

Cette différence de poids moléculaire en ADN se traduira au moment de l'électrophorèse par une migration plus importante des petits fragments comparativement aux fragments de grande taille. Ainsi, plus l'ADN sera exposé à des conditions favorisant sa dégradation (décongélation ou autre), plus il sera fragmenté et plus la comète sera allongée.

Plusieurs paramètres morphologiques permettent de caractériser une comète :

- L'intensité de la tête : quantité d'ADN cellulaire présent dans la tête de la comète normalisée par la quantité totale d'ADN dans l'intégralité de la comète. Exprimée en pourcentage de la fluorescence totale de la comète.
- L'intensité de la queue : quantité d'ADN cellulaire présent dans la queue de la comète normalisée par la quantité totale d'ADN dans l'intégralité de la comète. Exprimée en pourcentage de la fluorescence totale de la comète.
- La longueur de la queue ou « length of tail » : longueur séparant le centre de la tête de la comète de l'extrémité distale de la queue.
- La longueur du moment de la queue ou « Tail Moment Length » : longueur séparant le centre de gravité (CG) de la tête du centre de gravité de la queue.

L'analyse des comètes se fait principalement par la mesure du Tail Moment qui peut être estimée de deux manières distinctes :

- Le « **Tail Extent Moment** » ou moment de la queue, il correspond au produit de la longueur de la queue par l'intensité de la queue

$$\text{TM} = \text{Longueur de la queue} \times (\text{qté ADN dans la queue} / \text{qté ADN dans la comète}) \times 100$$

- L'« **Olive Tail Moment** », il correspond au produit du Tail Moment Length (Figure 2) par l'intensité de la queue

$$\text{OTM} = | \text{CG de la queue} - \text{CG de la tête} | \times (\text{qté ADN dans la queue} / \text{qté ADN dans la comète}) \times 100$$

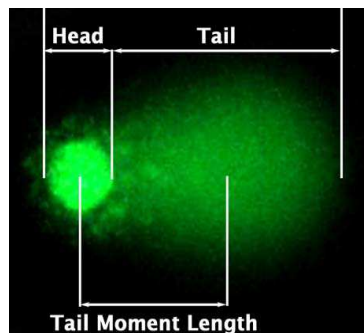


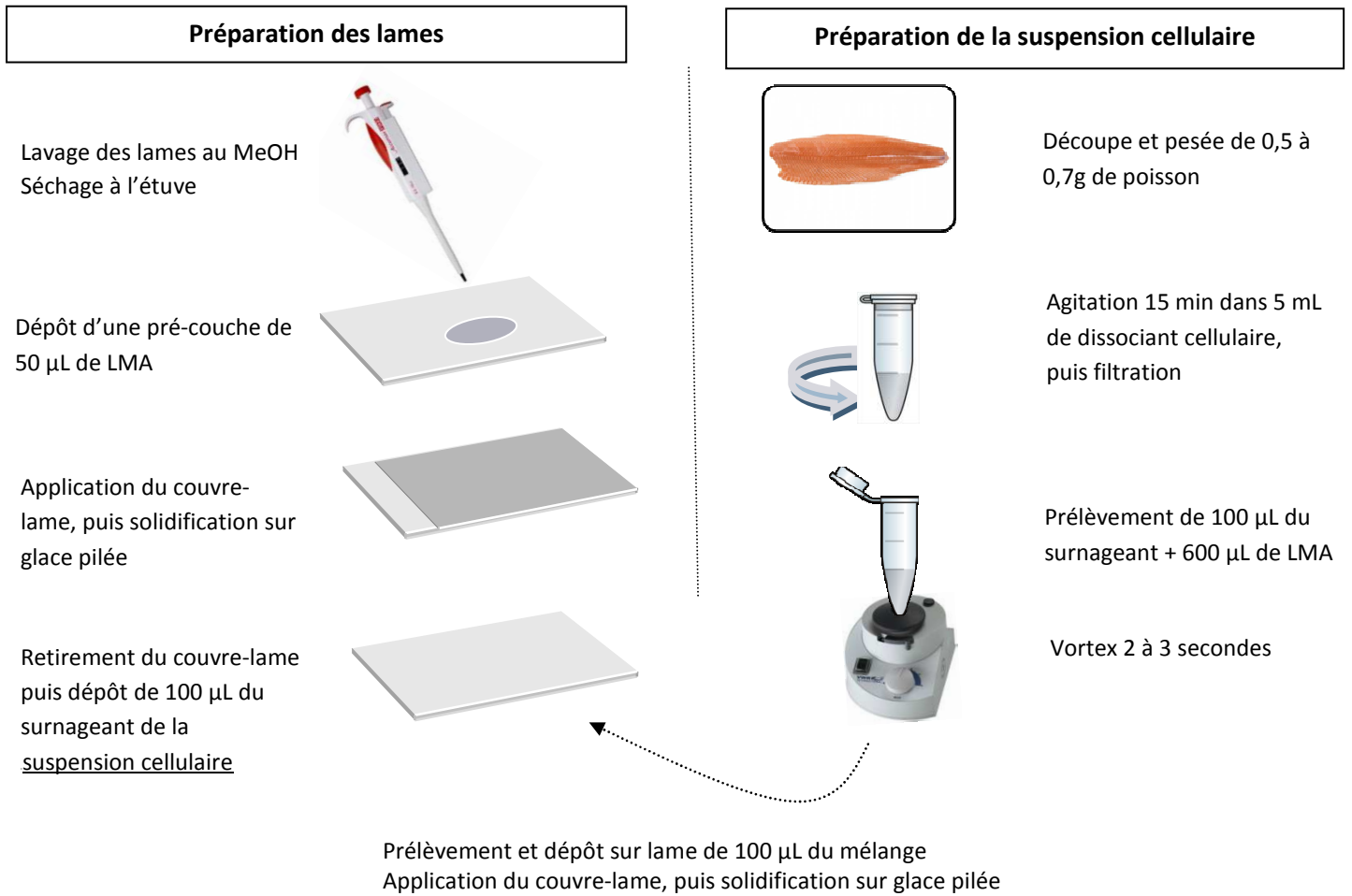
Figure 2: Définition des paramètres d'une comète utilisés pour le calcul du Tail Extent Moment et du Olive Tail Moment

Le Tail Extent Moment est le paramètre le plus utilisé. Il est fortement dépendant de la longueur de la queue comme l'explique sa formule ci-dessus. Cependant, le logiciel utilisé par Aérial ne donne accès qu'à un seul paramètre morphologique : le Olive Tail Moment. Ce paramètre est nettement moins dépendant de la longueur de la queue ; en effet, il met en avant le transfert d'intensité de la tête vers la queue de la comète au cours des dégradations observées. En parcourant la littérature, on retrouve des essais sur le test de la comète faisant intervenir ce paramètre morphologique pour suivre l'évolution des résultats.

## 11. ANALYSE STATISTIQUE

Les ADN au sein d'un même échantillon seront plus ou moins dégradés au cours des expériences. En effet, à titre d'exemple, on peut imaginer aisément que les cellules situées dans les couches superficielles de l'aliment en contact avec la température ambiante seront plus affectées que celles situées au centre de l'échantillon ou encore que la face de l'échantillon en contact avec l'aluminium sera moins affectée que celle exposée directement à la lumière du jour. Ainsi, on retrouve une population de comètes plus ou moins hétérogène suivant les lames. C'est la raison pour laquelle il est évidemment nécessaire d'apporter un caractère statistique au protocole analytique. Cela consiste à réaliser le comptage de 100 comètes par échantillon. Les résultats seront exprimés sous forme de courbes et d'histogrammes représentés par les valeurs moyennes des paramètres morphologiques retenus accompagnés de l'écart type de leur distribution.

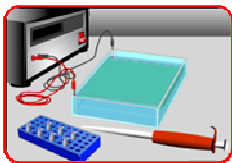
## 12. SCHEMA RECAPITULATIF DU PROTOCOLE



## Traitement des lames



Cuves de coloration opaques



Cuve d'électrophorèse



Porte-lames

Immersion des lames dans du SDS 2,5% : 10 min



Immersion des lames dans du TBE 0,45 M : 5 min



Electrophorèse dans du tampon TBE 0,45M



Immersion des lames dans de l'eau milli-Q : 5 min



Séchage sur papier absorbant : 5 min



Coloration au fluorochrome : 10 min

Lyse cellulaire

Rinçage

Migration de l'ADN

Rinçage

Séchage

Marquage de l'ADN

## RESULTATS

### 1. OPTIMISATION DES IMAGES

#### ○ LE FLUOROCHROME

---

Afin d'obtenir des mesures dont la justesse et la fidélité ne seront pas à mettre en cause, il est tout d'abord nécessaire d'obtenir des images nettes et bien contrastées, sans interférences et avec des comètes prenant intensément la coloration du fluorochrome. Bien que les durées de vie des fluorochromes varient, les expériences montrent que de manière générale, une solution fraîche de fluorochrome diminue considérablement les interférences et marque intensément d'un fort signal les comètes présentes sur la lame. En effet, si le fluorochrome perd en intensité, le contraste entre les double-brins d'ADN et les éléments interférents va diminuer, rendant ainsi l'image floue et difficilement interprétable. La solution de fluorochrome doit être maintenue constamment au réfrigérateur et renouvelée tous les 7 à 14 jours suivant la fréquence d'utilisation. Par ailleurs, le choix d'un fluorochrome doit nécessairement être accompagné de celui d'un filtre adapté en termes de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission.

Cinq fluorochromes, avec les filtres adaptés, ont été testés : Sybr Green I, Sybr Green II, Sybr Gold, YOYO et Gel red. Le Sybr Green I, le Sybr Green II et le Sybr Gold ont permis d'obtenir des résultats équivalents : des images de comètes bien nettes et contrastées et avec très peu d'interférences. Le YOYO et le Gel red n'ont pas présenté de résultats satisfaisants lors de l'expérience et ont donc été écartés. Grâce à la sélection des fluorochromes et des filtres adaptés, le contraste et la netteté des images et par conséquent la précision des mesures ont pu être améliorés. Par ailleurs, le passage pour CAMBA d'un objectif 10X à un objectif plan fluor 20X a apporté une amélioration supplémentaire. Ainsi, compte tenu des matériels disponibles dans chaque laboratoire, et dans un objectif de comparaison, CAMBA a continué ses travaux avec du Sybr Green I (Invitrogen) alors qu'Aérial a utilisé du Sybr Gold (Invitrogen).

#### ○ LE DISSOCIANT

---

Des expériences ont montré que le dissociant choisi pouvait avoir un effet sur la netteté de l'image : test en parallèle de 3 types de dissociants (le PBS-CDB, le HANKS-CDB et enfin la trypsine-EDTA). Les 3 dissociants sont globalement équivalents en termes de netteté et de contraste de l'image, toutefois la trypsine-EDTA permet de mieux dissocier les tissus et donc d'obtenir un nombre plus important de comètes sur la lame.

### 2. OPTIMISATION DE L'INTERPRETATION

#### ○ PARAMETRES FIXES

---

L'interprétation optimale permettant de différencier correctement la tête et la queue d'une comète par le logiciel nécessite de faire varier les paramètres de celui-ci. Par conséquent, il est nécessaire de déterminer les paramètres optimaux pour le logiciel qui permettent de lire correctement et automatiquement une large gamme de formes et de longueurs de comètes qu'elles soient d'échantillons témoins ou d'échantillons décongelés. Dans un souci de répétabilité des mesures, ces paramètres, une fois arrêtés, sont conservés pour la suite des expériences. Ce travail long et fastidieux a été réalisé avec la problématique suivante : le logiciel ne reconnaissant pas la formes rondes comme étant des comètes, il était nécessaire, en plus d'avoir des paramètres optimaux de lecture, d'adapter les conditions électrophorétiques afin d'obtenir des comètes témoin avec une tête suffisamment distinguée, assez intense.

#### ○ SUIVI DES TAIL EXTENT MOMENT ET DES OLIVE TAIL MOMENT

---

Comme dit précédemment, le suivi de 2 paramètres morphologiques a été réalisé au cours des expériences. Initialement, l'interprétation ne s'effectuait qu'à partir de la mesure des Tail Extent Moment, paramètre dépendant grandement de la longueur de la queue. Ainsi, lorsque le contraste est faible, le logiciel pouvait définir la fin de la comète à des distances supérieures à la fin réelle de celle-ci. La limite dépend dans ce cas énormément du cadre de sélection de la comète que l'opérateur définit, et donc de l'appréciation de ce dernier. C'est une des raisons pour lesquelles il a tout d'abord été nécessaire d'optimiser le contraste des images et d'éliminer les interférences présentes lors des manipulations.

Le Tail Olive Moment, à l'inverse, s'est avéré être très intéressant puisqu'il a l'avantage de ne pas être trop dépendant de la longueur de la queue mais plutôt du transfert d'intensité de fluorescence de la tête vers la queue de la comète. En effet, suivant les conditions de décongélation et/ou conditions liées à la migration de l'ADN (électrophorèse, concentration d'agarose), les comètes révèlent des aspects plus ou moins hétérogènes quant à leur aspect ; ceci confortant le choix de suivre ces 2 paramètres qui semblent adaptés pour suivre l'évolution de cette hétérogénéité des comètes. Cependant, il faut noter que les résultats obtenus avec l'un ou l'autre de ces paramètres aboutissent aux mêmes conclusions. Pour cette raison, l'ensemble des résultats présentés auront été exploités à l'aide du Tail Olive Moment.

### 3. OBTENTION D'UN NOMBRE SUFFISANT DE COMETES

L'utilisation initiale du CDB-HANKS comme dissociant cellulaire a permis d'obtenir un nombre suffisant de comètes pour des échantillons témoins. En revanche, le nombre de comètes à l'image diminue progressivement en fonction du temps de décongélation des échantillons. Lors des manipulations sur des échantillons doublement congelés, le nombre de comètes dépasse péniblement les 5 comètes sur une lame, ce qui est très insuffisant pour une interprétation statistique correcte.

En parcourant les publications scientifiques, on retrouve notamment une étude comparative du nombre de cellules viables après utilisation de trypsine et d'autres dissociants cellulaires non enzymatiques sur des cellules souches mésenchymateuses. Il apparaît que l'utilisation de trypsine maintient un nombre de cellules viables significativement supérieurs comparativement aux dissociants « enzyme free ».

L'application pratique de cette information a permis d'obtenir un nombre important de comètes grâce à l'utilisation de trypsine-EDTA comme dissociant cellulaire, même dans des échantillons doublement congelés ou ayant subi une nuit de décongélation. La trypsine-EDTA a donc été maintenue pour la suite des expériences.

#### 4. RECHERCHE DE CONDITIONS OPTIMALES

Pris isolément, il est aisé de faire varier indépendamment chaque paramètre et ainsi de définir la meilleure condition lors de chaque essai. Cependant, la combinaison des meilleurs paramètres ne va pas forcément donner les meilleurs résultats. Il est donc nécessaire de tester simultanément la variation de plusieurs paramètres.

Le but des modifications de chaque paramètre est d'obtenir les meilleurs rapports entre un échantillon témoin et un décongelé, mais également les différences les plus élevées tout en réduisant les écart-types des moyennes des valeurs des Tail Extent Moment et des Olive Tail Moment.

Les différents niveaux d'intervention du protocole sont les suivants :

- Le dissociant cellulaire
- La solution de lyse
- Le pourcentage d'agarose dans la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> couche
- Les conditions d'électrophorèse : temps de migration et voltage
- Le fluorochrome

Le fluorochrome peut par exemple influencer sur les valeurs des Tail Extent Moment en affectant le contraste de l'image.

Concernant les solutions de lyse, seul le SDS a prouvé son efficacité jusqu'à présent dans cette utilisation. Les autres solutions de lyse plus douces et non dénaturantes (CellLytic™-M et CellLytic™-MT) n'ont par conséquent plus été utilisées.

Comme déjà mentionné ci-dessus, l'utilisation de la trypsine-EDTA comme dissociant cellulaire semble la plus appropriée de par sa forte capacité à dissocier les cellules et ainsi à obtenir un nombre élevé de comètes. Ceci est particulièrement intéressant pour les échantillons doublement congelés ou les échantillons ayant subi une longue décongélation, les comètes étant alors moins abondantes.

Les paramètres influençant très majoritairement la migration de l'ADN sont le pourcentage d'agarose utilisé ainsi que les conditions d'électrophorèse. Ce sont donc les 4 paramètres suivants qui ont été testés de manière combinée lors de la recherche de conditions optimales pour chaque type de poisson.

- 1<sup>ère</sup> couche de LMA
- 2<sup>ème</sup> couche de LMA
- Temps d'électrophorèse
- Voltage de l'électrophorèse

La recherche des conditions optimales s'est faite en comparant les valeurs moyennes des Tail Extent Moment et des Olive Tail Moment entre un échantillon témoin de référence et un échantillon décongelé à température ambiante.

Afin d'obtenir la meilleure combinaison possible, un grand nombre de combinaisons de ces 4 paramètres a été testé (54 combinaisons). Cette mise au point très chronophage a permis de réaliser quelques observations et de sélectionner la condition la plus intéressante.

- Premier constat, lorsque l'échantillon témoin est d'emblée trop dégradé, on minimise les différences avec l'échantillon décongelé. Il faut clairement obtenir un échantillon encore peu dégradé au vu des observations.
- La concentration de la première couche d'agarose ne semble pas avoir d'effet significatif au vu des résultats. En effet, lorsque la 1<sup>ère</sup> couche d'agarose est sèche, le dépôt à 40°C de la deuxième couche d'agarose est inférieur au point de fusion de l'agarose. Ainsi, la 1<sup>ère</sup> couche agit simplement en adhérence nécessaire à la 2<sup>ème</sup>, et ne va pas re-fusionner avec celle-ci pour former une concentration intermédiaire.

Plusieurs options ont été testées, comme des voltages forts avec des temps d'électrophorèse courts et inversement, ceci en faisant varier la concentration d'agarose. On observe des différences visuelles pour des variations de l'ordre de 5 Volts ou d'une dizaine de secondes d'électrophorèse. La sensibilité de l'ADN est donc élevée à ces changements de conditions et nécessite donc une approche fine.

Le merlan et le cabillaud présentent sensiblement le même comportement électrophorétique de manière empirique. L'apparence des comètes ou encore les résultats chiffrés proposent des similitudes entre cabillaud et merlan, ceci ayant amené à maintenir les mêmes conditions pour le merlan que celles vues précédemment pour le cabillaud.

En appliquant les conditions retenues pour le cabillaud et le merlan, on observe immédiatement un comportement électrophorétique différent pour le saumon. Il a donc été nécessaire d'adapter un protocole spécifique pour ce poisson. On observe dans le cas du saumon, des comètes plus allongées que celles obtenues avec le merlan ou le cabillaud dans les mêmes conditions. On observe également

des comètes qui ont un bien meilleur aspect, un fond très net et parfaitement contrasté. Encore une fois, un grand nombre de combinaisons des différents paramètres a été testé.

Globalement, le constat est le même, il n'y a pas d'effet de la 1<sup>ère</sup> couche d'agarose et il y a toujours la nécessité d'obtenir des témoins les moins dégradés possibles.

Le protocole finalement retenu pour l'analyse des trois types de poissons étudiés est la suivante :

LMA 1<sup>ère</sup> couche : 0,5%  
LMA 2<sup>ème</sup> couche : 1%  
Dissociant : Trypsine-EDTA  
Solution de lyse : SDS 2,5% m/v  
Conditions d'électrophorèse : 45 Volts durant 1 minute 30  
Fluorochrome : Sybr Green I

## B. PREMIERE VALIDATION DU PROTOCOLE « TEST DE LA COMETE »

### 1. MATERIELS ET METHODES

Cette première validation effectuée par Aérial a été réalisée en utilisant un protocole testé par CAMBA, mais avant que les paramètres optimaux définitifs n'aient été sélectionnés. Néanmoins, le protocole utilisé dans cette partie a permis d'observer des différences entre l'échantillon et le témoin. Le protocole mis en œuvre est le suivant :

LMA 1<sup>ère</sup> couche : 1%  
LMA 2<sup>ème</sup> couche : 1%  
Dissociant : Trypsine-EDTA  
Solution de lyse : SDS 2,5% m/v  
Conditions d'électrophorèse : 2V/cm (soit 50 V durant 1 minute)  
Fluorochrome : Sybr Gold

Quelques différences sont également à noter au niveau de l'équipement. En effet, le microscope à épifluorescence utilisé (Olympus BHS-2) possède des filtres et des objectifs différents. Le fluorochrome utilisé est le Sybr Gold Nucleic Acid Gel Stain® (Invitrogen). L'interface caméra-logiciel est également différente de celle utilisée par CAMBA. La caméra est de la marque Sony DXC-107P et le logiciel utilisé par Aérial est Comet Assay III (Perspectives Instruments, Royaume-Uni). Tous les résultats présentés par Aérial sont exprimés en Olive Tail Moment (OTM), qui est défini comme suit dans le logiciel Comet Assay III :

$$\frac{\text{Intensité de la queue}}{\text{Intensité totale}} \times (\text{Centre de gravité de la queue} - \text{Position d'intensité maximale de la tête})$$

Les résultats obtenus chez Aérial n'ont pas pu être exprimés en Tail Extent Moment, du fait de l'absence de ces données.

## 2. VALIDATION DE LA METHODE SUR LES ECHANTILLONS DE SAUMON

Trois répétitions sont effectuées pour chaque condition testée et la moyenne et l'écart-type sont calculés. L'impact de la décongélation à 25°C sur un échantillon de saumon a été évalué et les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 3. D'après l'exploitation des résultats proposée, pour considérer que la dégradation d'un échantillon est significative par rapport au témoin, il faut que les écart-types du témoin et de l'échantillon ne se superposent pas. On voit que pour le saumon décongelé à 25°C, une différence significative (représentée par \*) entre un échantillon ayant été décongelé et un témoin est visible à partir de 3h de décongélation. Cependant, si l'on s'intéresse aux photos prises lors de la lecture des lames, on s'aperçoit que bien que le calcul des OTM ne donne pas de différence significative pour 2h de décongélation, une différence est bien visible à l'œil entre les comètes de cet échantillon et celles du témoin. Il est clair que la comète est beaucoup plus allongée et que sa tête a perdu en intensité. Il en va de même pour 4h de décongélation.

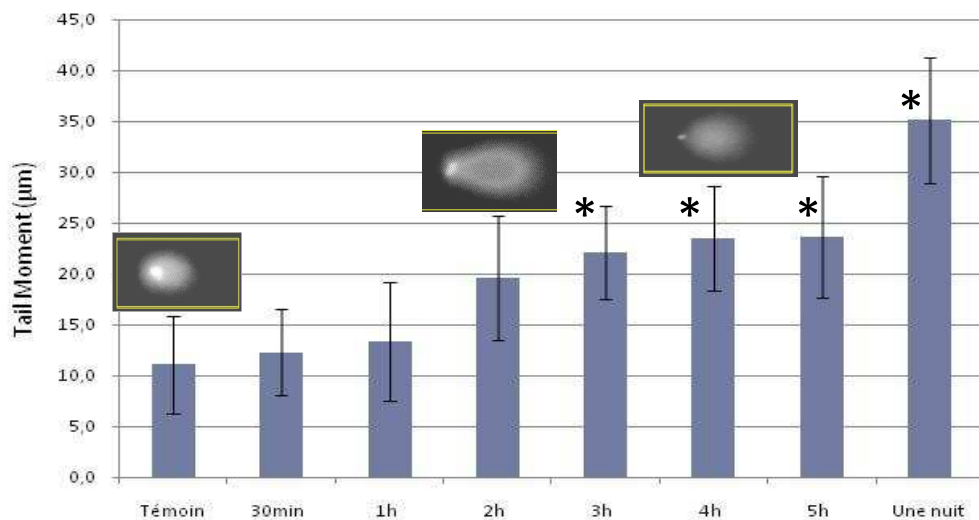


Figure 3: Evolution de l'OTM pour des échantillons de saumon décongelés à 25°C pendant des durées variables allant de 30 minutes à une nuit. Pour chaque échantillon, 3×100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus ± écart-type. Les échantillons sont considérés significativement différents du témoin lorsque les écart-types correspondants ne se superposent pas. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin.

La répartition des OTM des comètes indique clairement que l'OTM augmente en fonction de la durée de décongélation (Figure 4). Les OTM des comètes ayant subi une décongélation de faible durée sont concentrés autour des valeurs faibles. Par contre, au fur et à mesure que les tissus se dégradent, c'est-à-dire que la durée de décongélation augmente, les OTM s'éloignent vers les fortes valeurs. On constate donc un étirement des profils vers les valeurs plus importantes.

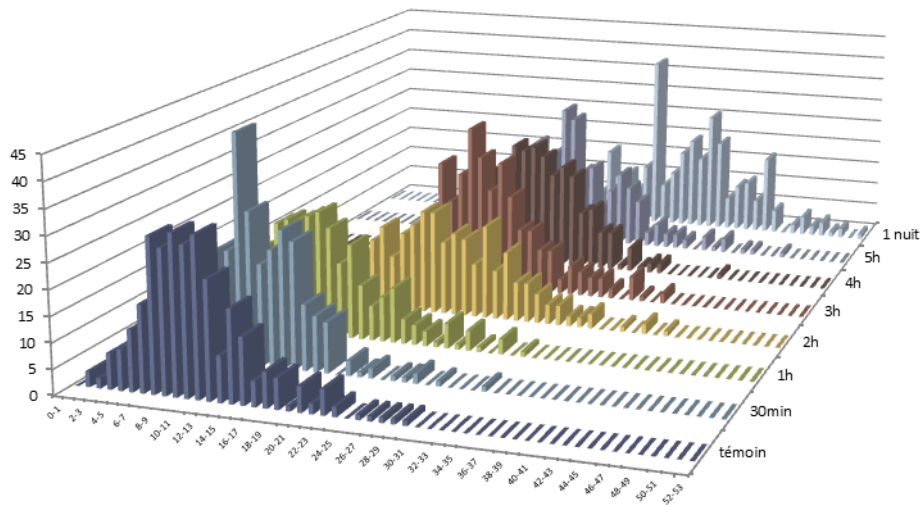


Figure 4: Répartition des OTM obtenus à partir des comètes issues d'échantillons de saumon décongelés à 25°C (300 comètes pour chaque point)

### 3. TEST PRELIMINAIRE DE LA METHODE SUR DES ECHANTILLONS DE TRUITE

Trois répétitions sont effectuées pour chaque condition testée et la moyenne et l'écart-type sont calculés. L'impact de la décongélation à 25°C sur un échantillon de truite a été évalué et les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 5. L'échantillon sera considéré comme différent du témoin dans les mêmes conditions que celles énoncées pour le saumon. On voit que contrairement au saumon, 3h de décongélation n'altèrent pas suffisamment l'ADN pour que les OTM de l'échantillon soient significativement différents de ceux du témoin.

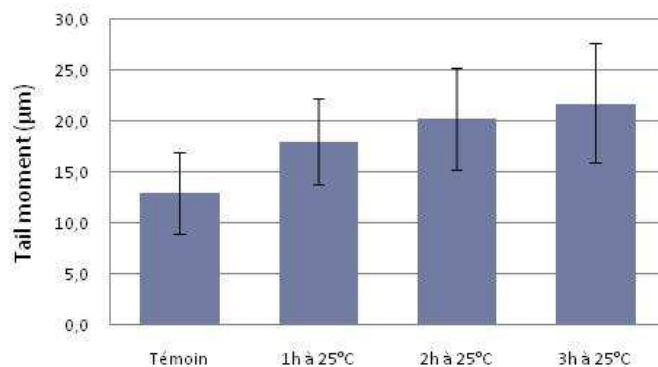


Figure 5: Evolution de l'OTM pour des échantillons de truite décongelés à 25°C pendant des durées variables allant de 1 à 3h. Pour chaque échantillon, 3×100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus ± écart-type. Les échantillons sont considérés significativement différents du témoin lorsque les écart-types correspondants ne se superposent pas. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin.

#### 4. AMELIORATIONS POSSIBLES POUR AUGMENTER LA SENSIBILITE

La cinétique de décongélation du saumon à 25°C, a permis de mettre en évidence une différence significative entre l'OTM de l'essai et celui du témoin pour une décongélation de 3h. L'objectif est de modifier certains paramètres du test de la comète, afin d'abaisser la limite de détection de dégradation de l'ADN. Cette partie a été réalisée par Aérial avant que CAMBA ne débute ses travaux sur le saumon. Les résultats obtenus ont permis d'orienter le travail réalisé par CAMBA.

Différentes modifications du protocole ont été testées sur des échantillons de saumon pour une durée de décongélation fixe de 2h à 25°C.

##### a. Pourcentage d'agarose

Afin de rendre visible la dégradation de l'ADN pour des durées inférieures à 3h de décongélation, le pourcentage d'agarose a été modifié. Deux pourcentages sont testés, 0,75% et 1%. Seuls ces deux pourcentages sont réalisés, en effet un pourcentage d'agarose plus faible tel que 0,5% n'est pas envisageable du fait du risque élevé de décollement du gel. En ce qui concerne l'utilisation d'un pourcentage d'agarose plus élevé, l'ADN serait plus retenues dans le maillage de la gélose lors de l'électrophorèse et les comètes seraient moins longues, il y aurait alors moins de différences par rapport au témoin.

Afin de déterminer l'influence exacte du pourcentage d'agarose, tous les autres paramètres (voltage, durée, ...) seront fixés. Pour les deux pourcentages d'agarose testés, un témoin est réalisé afin de pouvoir les comparer l'un à l'autre.

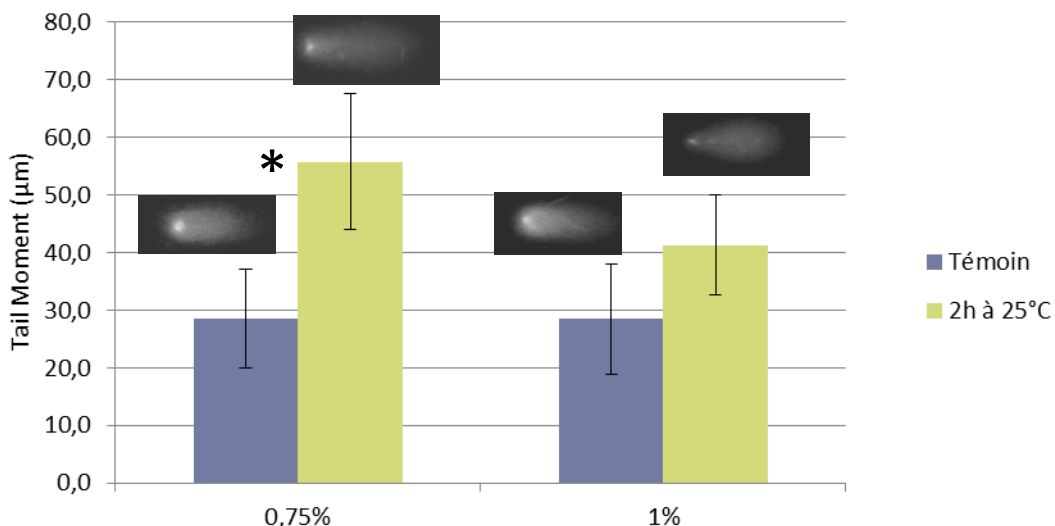


Figure 6: Comparaison des OTM du témoin et de l'échantillon (saumon décongelé 2h à 25°C) pour des pourcentages d'agarose variables (0,75 et 1%). La durée d'électrophorèse est fixée à 2min30 et le voltage est fixé à 50V, soit 2V/cm. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 6. On voit que pour la couche d'agarose à 0,75%, il existe une différence significative entre le décongelé et le témoin. La baisse du pourcentage d'agarose a donc permis d'abaisser la limite de détection de la dégradation à 2h.

b. Voltage de l'électrophorèse

Le deuxième paramètre étudié est le voltage utilisé pour l'électrophorèse. Les échantillons de saumon sont décongelés 2h à 25°C. Les autres paramètres ont été fixés : les lames sont recouvertes d'une première couche d'agarose à 0,5%, puis d'une seconde à 1%. La durée d'électrophorèse est fixée à 1min et les voltages testés sont 25V (1V/cm), 50V (2V/cm) et 75V (3V/cm). Pour chaque voltage testé, un témoin est réalisé afin de pouvoir comparer la moyenne des OTM du témoin à celles des essais.

On constate une augmentation des OTM avec l'augmentation du voltage, ce qui paraît normal puisque comme l'intensité du courant qui traverse la gélose est plus forte, plus de fragments d'ADN sont entraînés et migrent à travers les mailles de la gélose. Par contre, il n'existe, pour aucun des trois voltages testés, de différence significative entre l'échantillon de saumon décongelé pendant 2h à 25°C et le témoin.

A 25V, le voltage n'est pas assez puissant pour que les fragments d'ADN migrent au travers du gel, les comètes forment alors une boule (Figure 7), que ce soit pour le témoin ou le décongelé. Par contre, pour 75V, les comètes sont très longues. Dans ce cas, la puissance du voltage entraîne plus les fragments d'ADN même ceux de tailles plus élevées. On peut voir une légère différence de taille de la comète ainsi que de taille et d'intensité de la tête de l'échantillon décongelé par rapport au témoin, mais cela n'est pas significatif. En ce qui concerne le voltage intermédiaire, soit 50V, les comètes sont également de taille intermédiaire. C'est pour ce voltage qu'il existe la plus grande différence entre témoin et décongelé, bien que les résultats ne soient pas significativement différents.

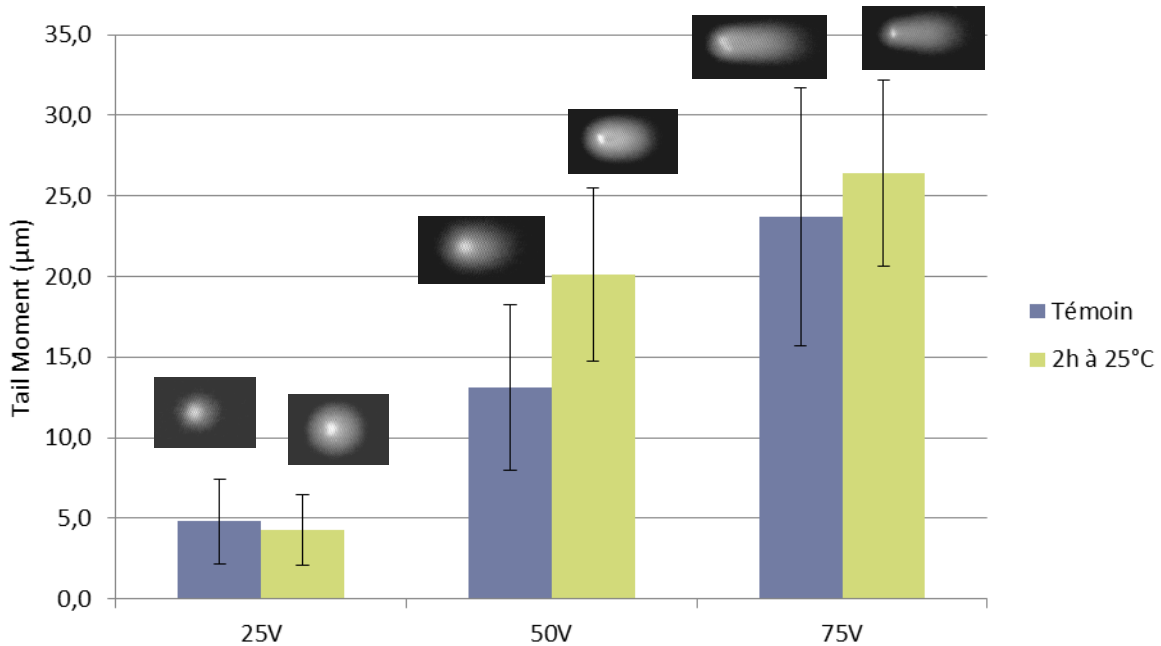


Figure 7: Comparaison des OTM du témoin et de l'échantillon (saumon décongelé 2h à 25°C) pour des voltages variables (25V, 50V et 75V). La durée d'électrophorèse est fixée à 1min et le pourcentage d'agarose est fixé à 1%. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin.

### c. Durée de l'électrophorèse

Le dernier paramètre testé est la durée d'électrophorèse, que nous avons fait varier en gardant fixes les autres paramètres. La tension utilisée est de 50V, le pourcentage d'agarose utilisé est de 1%. L'échantillon testé est du saumon décongelé 2h à 25°C. Différentes durées d'électrophorèse ont été testées soit 1min, 1min50 et 2min30. Pour chaque durée d'électrophorèse testée, un témoin est réalisé afin de le comparer à l'échantillon décongelé.

On constate, que plus le temps d'électrophorèse est long plus les OTM sont élevés, et que les comètes sont de plus en plus longues (Figure 8). En effet, plus la durée d'électrophorèse est longue plus les fragments d'ADN ont de temps pour migrer à travers les mailles de la gélose. Pour 1min d'électrophorèse, comme constaté lors de la cinétique à 25°C du saumon, il n'y a pas de différence significative entre le témoin et le décongelé. Par contre, pour une durée de 1min50, les OTM du témoin et de l'essai sont significativement différents. A 2min30 d'électrophorèse, les OTM et la longueur des comètes continuent d'augmenter mais les barres d'erreur du témoin et de l'essai se superposent, il n'y a donc pas de différence significative entre le témoin et l'essai. On déduit donc qu'une trop longue durée d'électrophorèse a pour conséquence d'entraîner durant la migration tous les fragments d'ADN qu'ils soient de tailles élevées ou faibles.

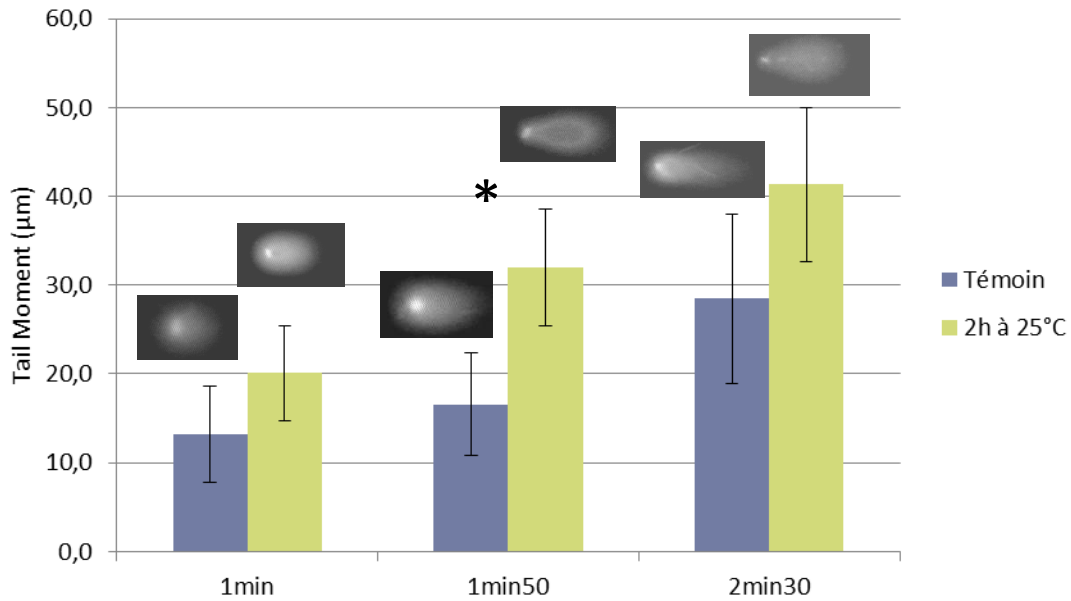


Figure 8: Comparaison des OTM du témoin et de l'échantillon (saumon décongelé 2h à 25°C) pour des durées d'électrophorèse variables (1min, 1min50 et 2min30). Le voltage est fixé à 50V (2V/cm) et le pourcentage d'agarose est fixé à 1%. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin.

La modification de la durée d'électrophorèse a permis, comme pour la modification du pourcentage d'agarose, de mettre en évidence une différence significative entre le témoin et l'essai pour 2h de décongélation grâce à une électrophorèse de 50V durant 1min50.

Les résultats obtenus dans cette partie ont été intégrés par CAMBA pour la mise en place du protocole final. Dans ce travail préliminaire, il a été démontré que parmi les 3 voltages testés (25, 50 et 75V), 50V est la valeur optimale. En affinant ces résultats, CAMBA a pu montrer que 45V, qui est une valeur très proche de celle déterminée par Aérial, est la valeur optimale. En ce qui concerne la durée de l'électrophorèse, Aérial avait situé la durée optimale entre 1 min et 1 min 50. CAMBA a pu démontrer que 1 min 30 est la durée optimale, ce qui est encore une fois en accord avec les résultats précédents. La seule différence notable est le pourcentage d'agarose utilisé pour la deuxième couche. Aérial avait conclu qu'une couche d'agar à 0,75% était la plus efficace, mais CAMBA a choisi de conserver une couche à 1%, du fait du risque moins élevé de décollement du gel.

## II. DETERMINATION DE LA DUREE MINIMALE DE DECONGELATION DETECTABLE A 2, 5 ET 10°C

Dans cette partie, il s'agissait de déterminer à partir de quelle durée de décongélation à 10°C, 5°C et enfin 2°C une dégradation d'ADN est significative pour affirmer que l'échantillon a été décongelé. Le protocole utilisé est celui utilisé dans la partie précédente. Aucune modification n'a été apportée.

### A. CINETIQUE DE DEGRADATION DU SAUMON A 10°C

Les échantillons sont placés dans une étuve thermostatée à 10°C pour des durées variables allant de 2 à 48h. Chaque échantillon est analysé en triplicat et pour chaque lame, 100 comètes sont mesurées. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 9.

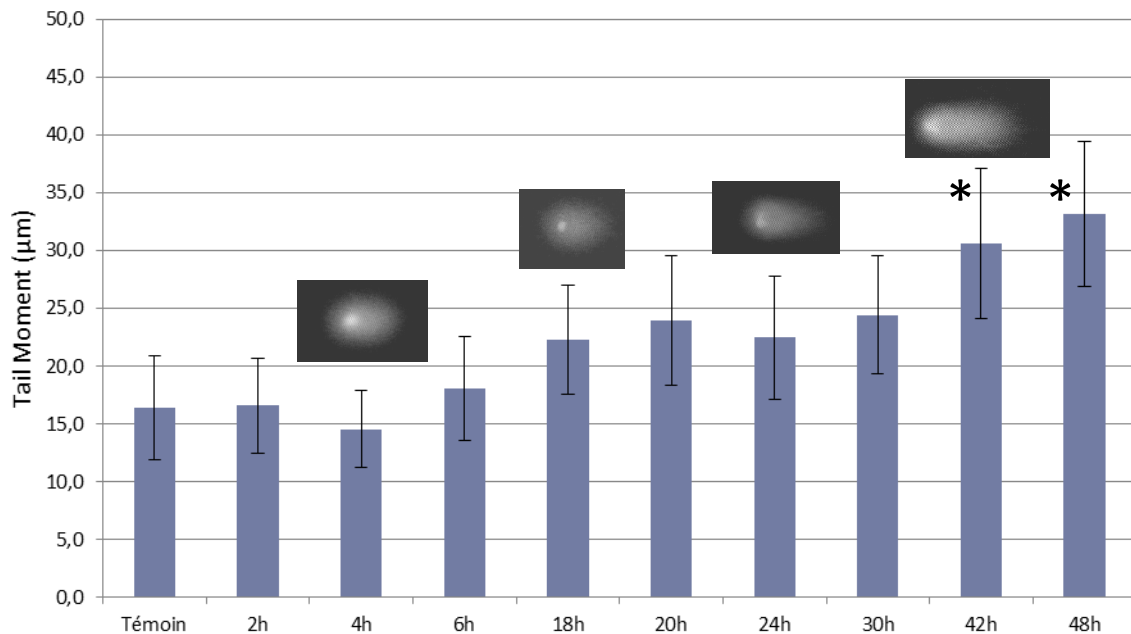


Figure 9: Evolution de l'OTM pour des échantillons de saumon décongelés à 10°C pendant des durées variables allant de 2 à 48h. Pour chaque échantillon, 3×100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus ± écart-type. Les échantillons sont considérés significativement différents du témoin lorsque les écart-types correspondants ne se superposent pas. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin.

Au vu des résultats présentés (Figure 9), il apparaît que l'on peut différencier significativement un échantillon de saumon décongelé à 10°C du témoin, à partir de 42h de décongélation. Comme précédemment pour la cinétique à 25°C, des différences sont visibles à l'œil, sans pour autant que les résultats (OTM) ne soient significativement différents entre l'échantillon et

le témoin. C'est le cas notamment pour 24h de décongélation où l'on voit que la comète est plus étirée que celle du témoin et que sa tête a perdu en intensité.

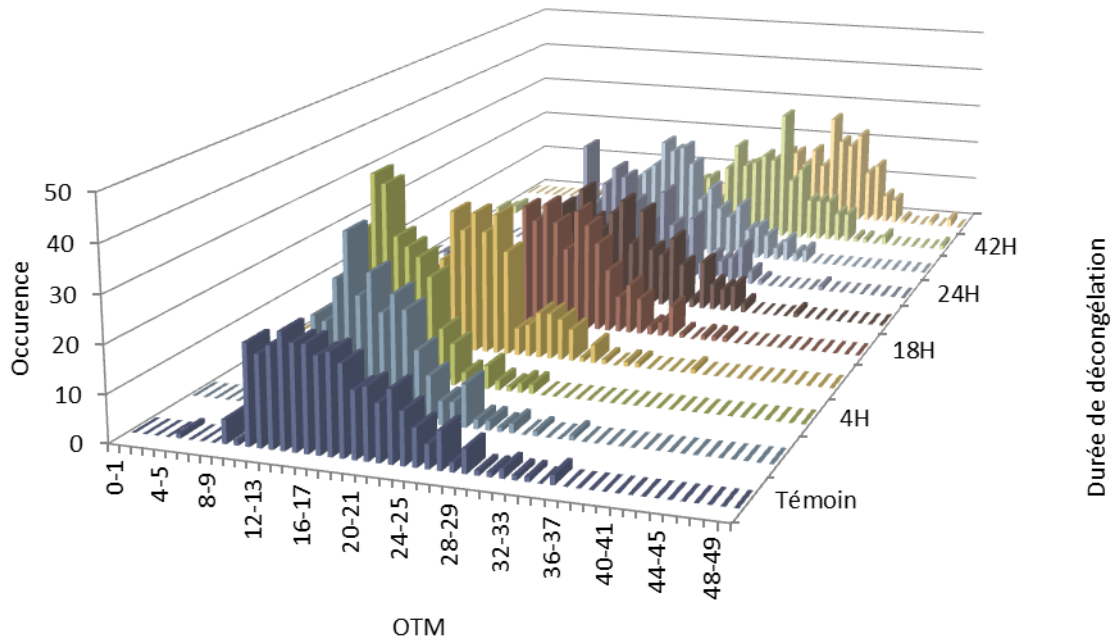


Figure 10: Répartition des OTM obtenus à partir des comètes issues d'échantillons de saumon décongelés à 10°C (300 comètes pour chaque point)

La répartition des OTM (Figure 10) montre que la dégradation d'ADN est plus prononcée pour les durées de décongélation longues. On remarque également qu'au plus la durée de décongélation augmente, au plus la répartition des OTM est dispersée, ce qui conduit à un étirement des profils. Ces remarques avaient déjà été formulées pour la cinétique à 25°C présentée dans le paragraphe précédent.

## B. CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DU SAUMON À 5°C

Pour étudier la cinétique de dégradation à 5°C, les échantillons de saumon sont placés dans une étuve thermostatée à 5°C. Les durées de décongélation testées sont comprises entre 6 et 96h.

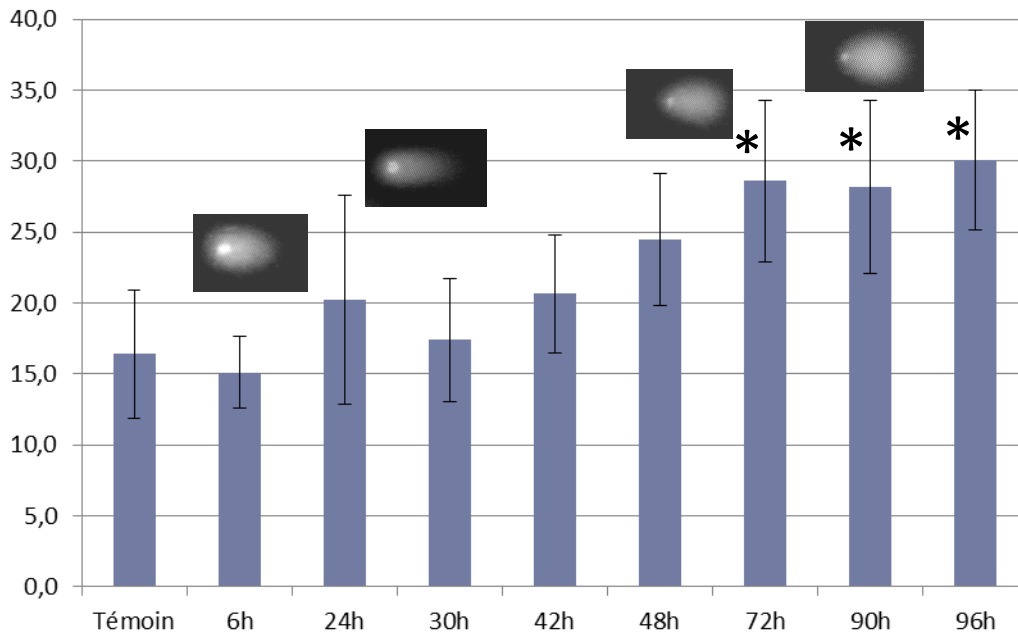


Figure 11: Evolution de l'OTM pour des échantillons de saumon décongelés à 5°C pendant des durées variables allant de 6 à 96h. Pour chaque échantillon, 3×100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus ± écart-type. Les échantillons sont considérés significativement différents du témoin lorsque les écart-types correspondants ne se superposent pas. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin.

Les résultats obtenus montrent une différence significative entre le témoin et un échantillon décongelé au bout de 72h (Figure 11). De nouveau, si l'on regarde les comètes sans tenir compte des OTM, des différences sont clairement visibles à l'œil sans que les calculs ne donnent des résultats significativement différents.

Comme pour les deux exemples précédents, on voit clairement (Figure 12) que la dégradation d'ADN est plus prononcée pour les durées de décongélation les plus longues. Dans cet histogramme, un point critique semble apparaître à 48h de décongélation à 5°C. Ce point indique clairement la transition entre la population de faibles OTM majoritaire jusqu'à 42h de décongélation et la population de OTM plus élevés, majoritaires dès 72h de décongélation.

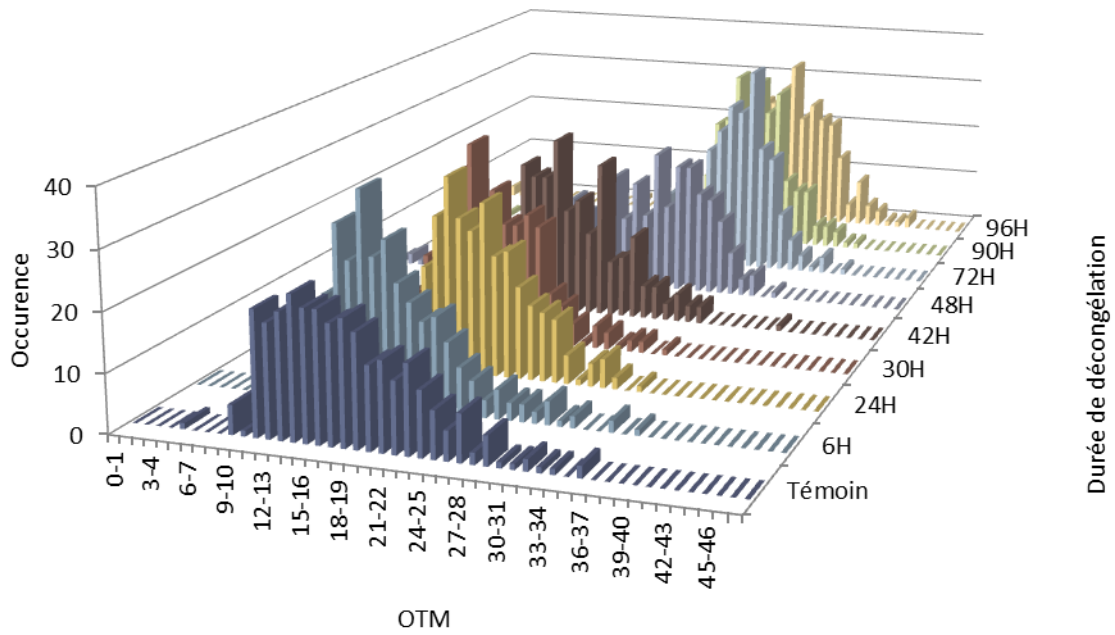


Figure 12: Répartition des OTM obtenus à partir des comètes issues d'échantillons de saumon décongelés à 5°C (300 comètes pour chaque point)

### C. CINETIQUE DE DEGRADATION DU SAUMON A 2°C

Pour étudier la cinétique de dégradation à 2°C, les échantillons de saumon sont placés dans une étuve thermostatée à 2°C. Les durées de décongélation testées sont comprises entre 1 et 7 jours.

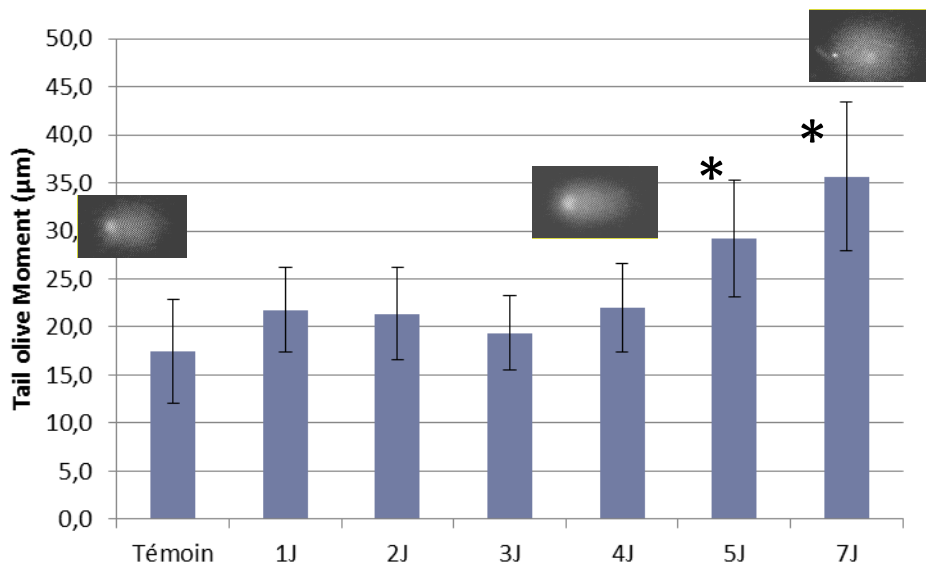


Figure 13: Evolution de l'OTM pour des échantillons de saumon décongelés à 2°C pendant des durées variables allant de 18h à 7 jours. Pour chaque échantillon, 3×100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus ± écart-type. Les échantillons sont considérés significativement différents du témoin lorsque les écart-types correspondants ne se superposent pas. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin.

Les résultats obtenus montrent une différence significative entre le témoin et un échantillon décongelé pendant 5 et 7 jours (Figure 13). On voit clairement que l'échantillon décongelé pendant 5 jours à 2°C possède des OTM plus proches des faibles valeurs que l'échantillon décongelé pendant 7 jours à 2°C (Figure 14). Pour 7 jours de décongélation, la répartition des OTM s'élargit, notamment vers les valeurs les plus élevées (Figure 14).

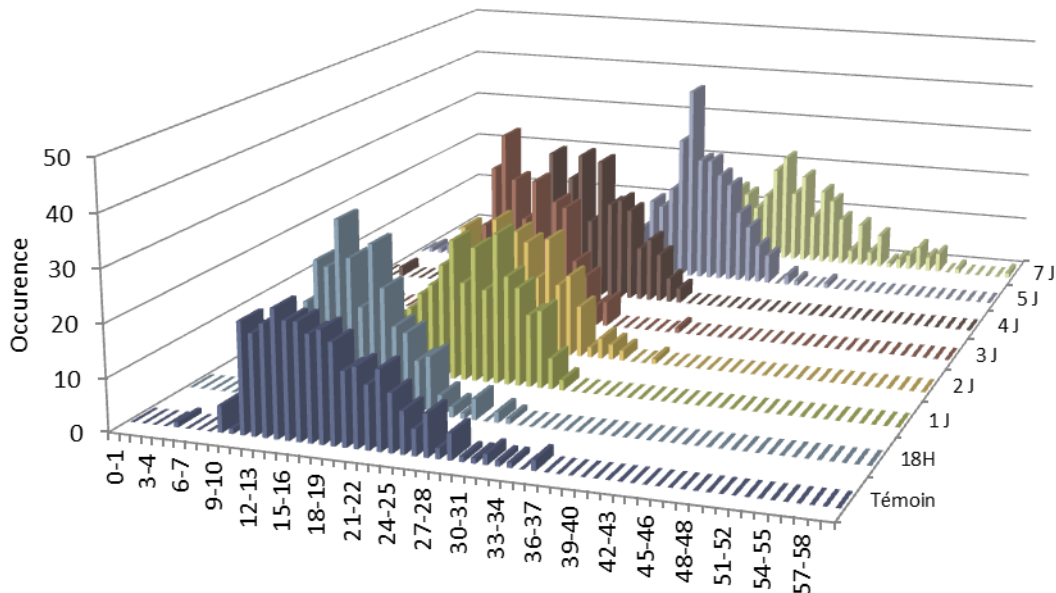


Figure 14: Répartition des OTM obtenus à partir des comètes issues d'échantillons de saumon décongelés à 2°C (300 comètes pour chaque point)

L'étude des cinétiques de dégradation à 2, 5, 10 et 25°C a permis de tirer diverses conclusions. L'utilisation de la moyenne et de l'écart-type ne reflète pas l'apparition d'OTM élevés, mais peu présents. Il semble donc important de mettre en évidence les deux populations d'OTM (OTM faibles mais d'occurrence élevée ainsi que les OTM élevés mais de faible occurrence). L'utilisation des histogrammes peut ainsi contribuer à une exploitation plus juste des résultats.

Les résultats obtenus dans cette partie ont également permis de mettre en évidence l'importance de différents facteurs que sont la température de décongélation, intimement liée à la durée de décongélation. En effet, une corrélation inverse entre ces deux paramètres a été identifiée. Il faut également noter que le type de poisson influe sur la limite de détection de la méthode.

### III. INFLUENCE DE LA DUREE DE CONGELATION SUR LA QUALITE DU TEMOIN

Les témoins utilisés sont des poissons qui ont été fraîchement pêchés et congelés immédiatement (ou le plus rapidement possible) après la pêche. Ils sont ensuite conservés au congélateur à -22°C et sont utilisés au besoin.

L'objectif de cette partie est de savoir si la durée de congélation de ces témoins entraîne une dégradation de l'ADN et de ce fait, entraîne une augmentation de l'OTM au cours du temps. Plusieurs durées de congélation ont été testées pour des échantillons de saumon et de merlan. Les échantillons analysés ont été congelés pour des durées allant de 15 jours à 27 mois.

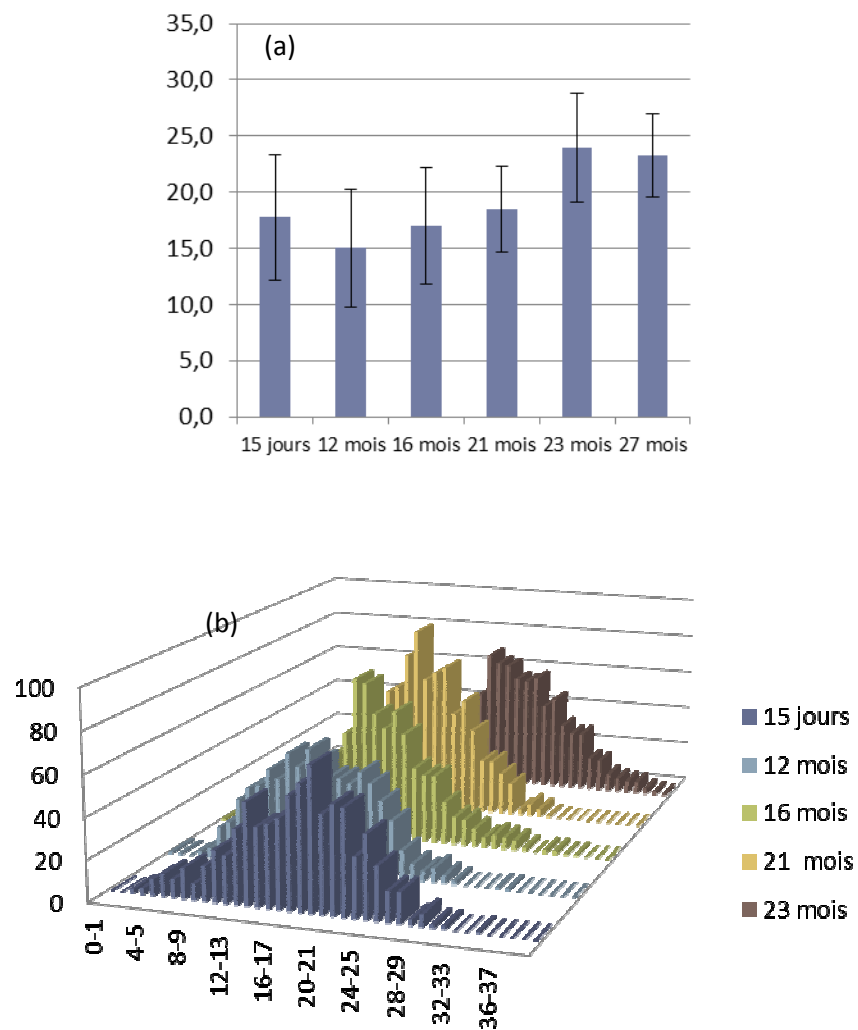


Figure 15: (a) Evolution de l'OTM pour des échantillons de merlan stockés à -22°C pendant des durées variables allant de 15 jours à 27 mois. Pour chaque échantillon, 3x100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus ± écart-type. Les échantillons sont considérés significativement différents du témoin lorsque les écart-

types correspondants ne se superposent pas. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin ; (b) Répartition des OTM de merlan conservé à -22°C pendant des durées variables.

La Figure 15 a représente les OTM obtenus après analyse des comètes pour chaque échantillon de merlan. Il apparaît clairement que la durée de congélation a une influence sur la qualité du témoin pour les échantillons de merlan. On observe une augmentation importante de la valeur de l'OTM entre 21 et 23 mois de congélation, bien que les résultats obtenus ne soient pas significativement différents les uns des autres. Cette augmentation de l'OTM, signe d'une dégradation de l'ADN est tout à fait intéressante puisqu'elle a lieu aux alentours de la date limite de congélation des poissons maigres. A partir de 27 mois de stockage à -22°C, on observe une stagnation dans la valeur du Tail Olive Moment.

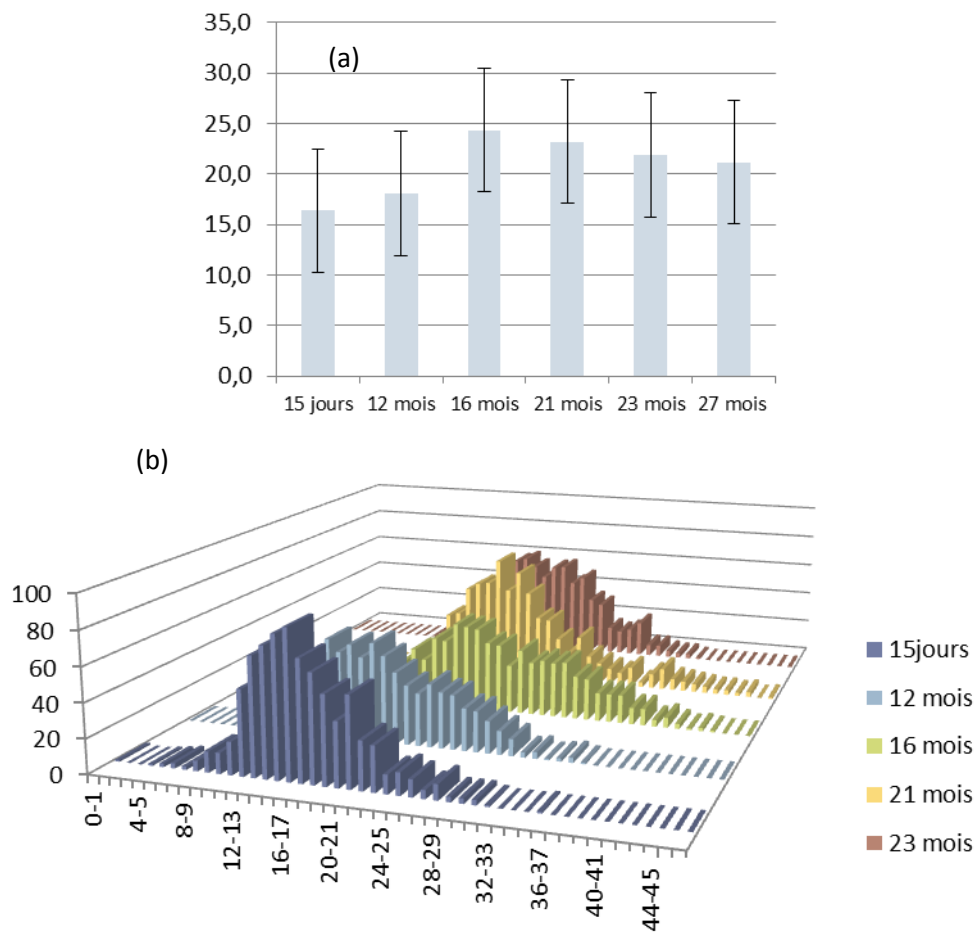


Figure 16: (a) Evolution de l'OTM pour des échantillons de saumon stockés à -22°C pendant des durées variables allant de 15 jours à 27 mois. Pour chaque échantillon, 3x100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus ± écart-type. Les échantillons sont considérés significativement différents du témoin lorsque les écart-types correspondants ne se superposent pas. \* indique quels échantillons sont significativement différents du témoin ; (b) Répartition des OTM de saumon conservé à -22°C pendant des durées variables.

La Figure 16 a représente la répartition des OTM pour les témoins de saumon stockés à -22°C entre 15 jours et 27 mois. Bien qu'aucune différence significative ne soit mise en évidence par les calculs, il

apparaît clairement pour le saumon (Figure 16 a) que les témoins analysés après 12 et 16 mois de stockage à -22°C sont plus altérés que celui analysé après 15 jours de stockage à -22°C. On observe un étalement du profil vers les OTM plus élevés, comme constaté précédemment pour les cinétiques de décongélation. L'augmentation est particulièrement visible à partir de 12 mois (Figure 16 b). Ces résultats sont donc en accord avec la durée maximale de congélation des poissons gras, à savoir 12 mois.

Si l'on observe la répartition des profils d'OTM pour le merlan, les différences dans la répartition sont beaucoup moins prononcées, voire absentes (Figure 15 b) que celles observées pour le saumon (Figure 16 b). Ces résultats sont en accord avec la durée maximale de congélation des poissons maigres, à savoir 24 mois.

Les valeurs « de référence » du témoin pour chacun des types de poisson ont été déterminées. Les échantillons utilisés étaient extra frais et ont été stockés moins de 15 jours à -22°C avant analyse. Ces valeurs sont rassemblées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Valeurs des témoins obtenues pour chaque poisson

		Olive Tail Moment	Tail Extent Moment
CAMBA (n=9000 comètes)	Cabillaud	18,8 ± 3,4	56,2 ± 14,1
	Merlan	19,2 ± 3,3	59,9 ± 14,9
	Saumon	25,3 ± 6,2	76,8 ± 12,2
Aérial (n=800 comètes)	Merlan	17,8 ± 4,5	
	Saumon	16,4 ± 4,5	

Pour conclure cette partie, il semble important de rappeler que la durée de congélation est très importante pour la qualité du témoin. La mise au point de la méthode, la détermination des limites de détection et l'étude des cinétiques de décongélation doivent donc être entreprises de façon précise sur des échantillons fraîchement congelés.

#### IV. DETECTION D'UNE DOUBLE CONGELATION

Afin de mettre en évidence un éventuel effet d'une double congélation sur la dégradation de l'ADN, nous avons effectué un test sur des échantillons de saumon (Figure 17). Deux échantillons de saumon ont été décongelés dans des conditions très drastiques, pendant 24h à 25°C, puis l'un d'eux a été recongelé pendant 3 jours avant d'être analysé alors que l'autre a été analysé immédiatement. Les deux échantillons ont été analysés dans les conditions standards mises en place. Trois lames distinctes ont été préparées pour chaque condition testée.

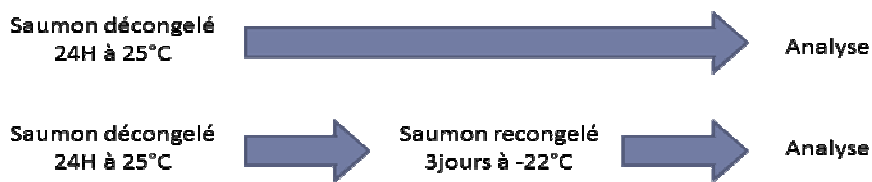


Figure 17: Test mis en œuvre pour la détection d'une double congélation

Les résultats obtenus n'ont pas montré de différences au niveau de la valeur des OTM. En revanche, une différence importante est à noter au niveau du nombre de comètes par lame : l'échantillon qui a été simplement décongelé présentait un nombre important de comètes (100 comètes par lame ont pu à chaque fois être mesurées), alors que l'échantillon ayant subi une double congélation présentait un nombre très restreint de comètes (sur 3 lames, à peine 30 comètes ont pu être mesurées). Ce constat avait déjà pu être fait précédemment lors de la détermination des cinétiques de décongélation à 25°C. En effet, pour les durées de décongélation (très) longues à température relativement élevée, une diminution du nombre de comètes avait déjà pu être observée, aussi bien pour le saumon que pour le merlan et le cabillaud. Les résultats observés ici sont donc en concordance avec les observations précédentes. Ce phénomène peut être lié à la dégradation importante engendrée par les conditions de stockage, qui entraînent une telle dégradation que les comètes ne sont plus visibles car trop étirées.

Les échantillons de cabillaud et de merlan doublement décongelés dans les conditions industrielles ont été fournis par Haliomer. Le test mis en œuvre a permis de mettre en évidence une différence significative entre le témoin et les échantillons doublement congelés pour le cabillaud (Figure 18 a) et le merlan (Figure 18 b).

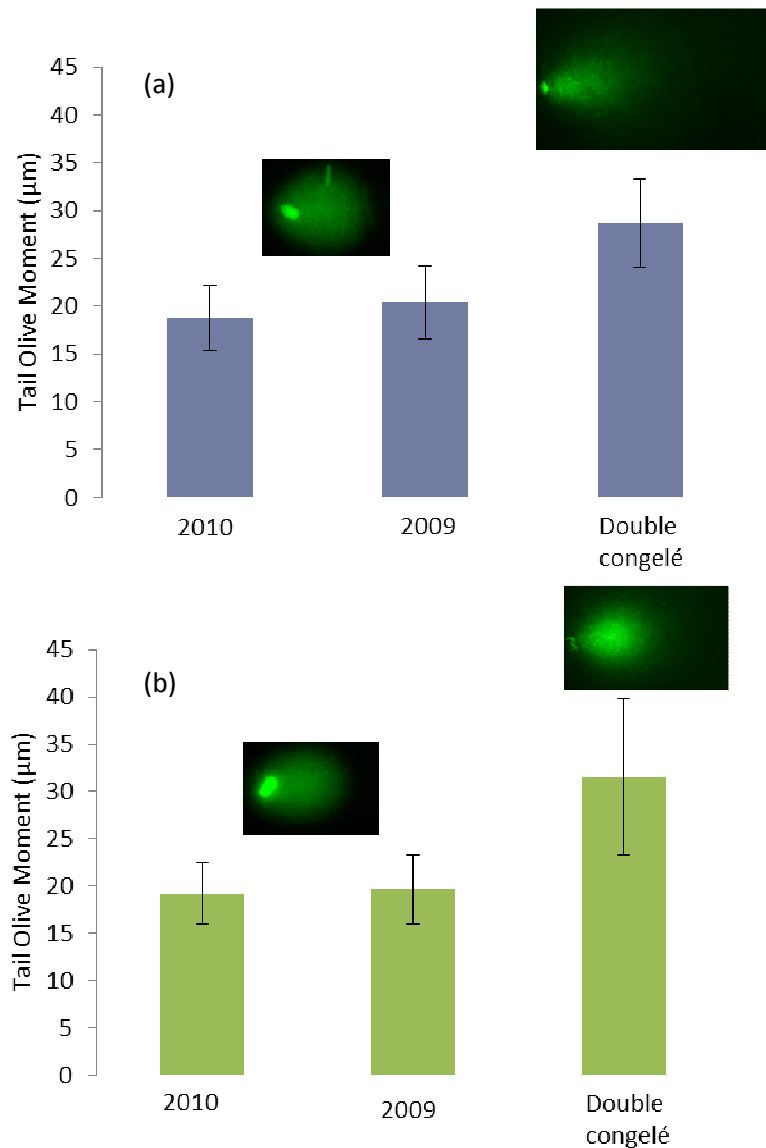


Figure 18: Evolution de l'OTM pour des échantillons (a) de cabillaud et (b) de merlan ayant subi une double congélation par rapport à des échantillons témoin stockés à -22°C. Pour chaque échantillon, 3×100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus ± écart-type.

Pour voir s'il est possible de détecter des échantillons doublement congelés de façon fiable, un test en aveugle a été organisé. Trois types d'échantillons ont été préparés par Haliomer de façon anonyme pour chaque type de poisson (cabillaud, merlan et saumon). Les échantillons étaient soit des témoins congelés extra frais, soit des poissons entiers congelés, décongelés, filetés puis recongelés ou encore des filets congelés, décongelés puis recongelés. Chacun des échantillons a été analysé trois fois dans les deux laboratoires. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2: OTM obtenus après analyses des comètes issues des échantillons anonymés par Haliomer.

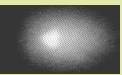
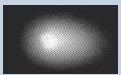
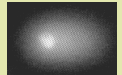
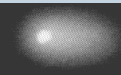
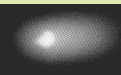
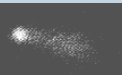
	CAMBA	1	2	3	Aérial	1	2	3
Merlan	Moyenne	19,6*	29,7	34,1	Moyenne	15,7*	-	-
	Ecart-type	5,3	6,8	6,2	Ecart-type	4,3	-	-
Cabillaud	Moyenne	25,7	33,1	19,5*	Moyenne	-	-	15,5*
	Ecart-type	9,9	8,6	7,2	Ecart-type	-	-	4,0
Saumon	Moyenne	33,2	32,5*	13,5	Moyenne	23,5	23,5*	15,9
	Ecart-type	7,2	5,8	3,7	Ecart-type	4,4	5,1	4,9

« - » Signifie que peu ou pas de comètes sont visibles sur les lames, les échantillons notés \* sont les témoins congelés extra frais et les échantillons en jaune sont ceux que les deux laboratoires ont identifiés comme des témoins.

L'identification est correcte pour les échantillons de merlan et de cabillaud, pour lesquels l'échantillon témoin a été correctement identifié dans les deux laboratoires. En revanche, pour le saumon, l'identification (identique dans les deux laboratoires où l'échantillon n°3 apparaissait comme un témoin) ne portait *a priori* pas à confusion. Cependant, à la révélation de la nature des échantillons par Haliomer, il s'avère que l'identification est erronée, et ce pour les deux laboratoires. Il est donc probable qu'un problème soit survenu au niveau de l'échantillon ou qu'il n'ait pas été aussi frais qu'annoncé lors de sa congélation.

Pour vérifier cette hypothèse, des échantillons de saumon ont été congelés à différents états de fraîcheur (après 0, 5 et 9 jours de stockage sous glace à 0°C), avant d'être décongelés et enfin recongelés. Chaque échantillon a été analysé et les résultats obtenus ont été comparés avec ceux des échantillons frais conservés sous glace pour les mêmes durées de stockage. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3: Comparaison entre des échantillons de saumon fraîchement congelés et congelés/décongelés/recongelés à différents stades de conservation (0, 5 et 9 jours).

	J0	J0 double congelé	J5	J5 double congelé	J9	J9 double congelé
<i>Tail Olive</i> Moment ± Ecart-type	15,2 ± 4,9	17,3 ± 4,9	15,6 ± 4,4	20,2 ± 4,7	17,6 ± 4,9	22,9 ± 5,4
Aspect des comètes						

Premièrement, si l'on s'intéresse à l'échantillon double congelé après 0 jours de stockage à 0°C, on constate que l'écart entre l'échantillon frais et l'échantillon doublement congelé n'est pas très important, bien que visible au niveau de la valeur du Tail Olive Moment. En ce qui concerne, les échantillons stockés 5 et 9 jours avant double congélation, on remarque que cet écart augmente. En effet, au plus l'échantillon est décongelé/congelé à un stade avancé, au plus les comètes sont étirées et au plus le Tail Olive Moment augmente. Les résultats obtenus ici vont donc dans le sens de l'hypothèse formulée plus haut qui concernait le mauvais état de fraîcheur du saumon utilisé dans le test en aveugle.

## V. TEST DE FRAICHEUR

Au cours de ce projet, la possibilité d'utiliser le test de la comète comme indicateur de la fraîcheur du poisson a été étudiée. Pour ce faire, des échantillons de merlan et de saumon frais (non congelés) ont été mis sous glace à 0°C (cf. échantillonnage) pendant des durées variables allant de 0 à 14 jours et analysés à l'aide du protocole établi.

### A. EVALUATION DE L'ETAT DE FRAICHEUR DU MERLAN

Les valeurs des Tail Olive Moment obtenues pour les comètes observées à partir des échantillons de merlan stockés sous glace à 0°C sont présentées dans la Figure 19. On remarque que les valeurs des Tail Olive Moments restent relativement stables, malgré une très légère augmentation de la valeur du Tail Olive Moment pour 7 jours de conservation sous glace. A partir de 9 jours, très peu de comètes, voire aucune n'étaient visibles sur les lames préparées. Cette remarque concernant l'absence de comètes avait déjà été formulée dans le paragraphe concernant la double congélation.

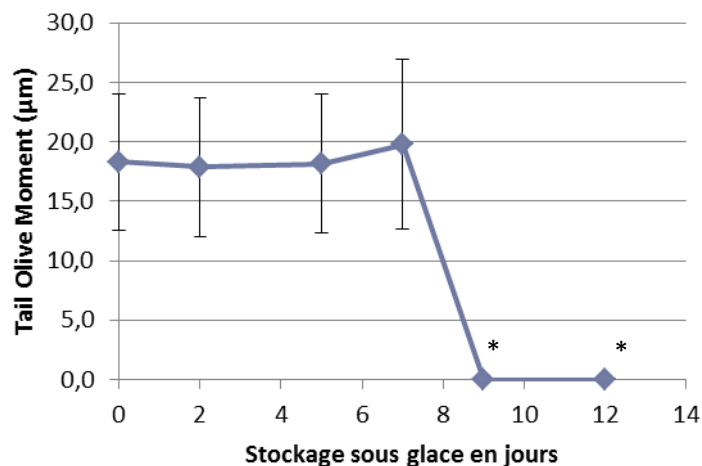


Figure 19: Evolution des Tail Olive Moment (µm) pour des échantillons de merlan stockés entre 0 et 12 jours sous glace à 0°C. Pour chaque échantillon, 3×100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus ± écart-type. \* indique que les échantillons analysés ne contiennent plus de comètes.

La Figure 20 présente les photographies de comètes observées pour les échantillons de merlan conservés de 0 à 7 jours. On voit clairement l'étirement qui survient à partir du 5<sup>ème</sup> jour et qui se poursuit au 7<sup>ème</sup> jour. Après 7 jours de stockage à 0°C, on peut donc dire que l'ADN du merlan est déjà dégradé, mais l'amorce de cette dégradation est déjà visible après 5 jours.

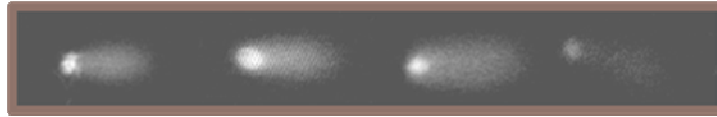


Figure 20: Exemples de comètes observées pour les échantillons de merlan stockés 0, 2, 5 et 7 jours sous glace à 0°C.

Des tests classiques d'évaluation de la fraîcheur (ABVT, azote basique volatil total, TMA, triméthylamine et dénombrement de la flore totale) ont également été mis en œuvre pour situer le test de la comète par rapport aux tests classiques utilisés dans l'évaluation de la fraîcheur du poisson. Les différents résultats obtenus sont présentés dans la Figure 21. D'après l'ensemble des paramètres étudiés, la dégradation est visible après 7 jours de stockage sous glace à 0°C.

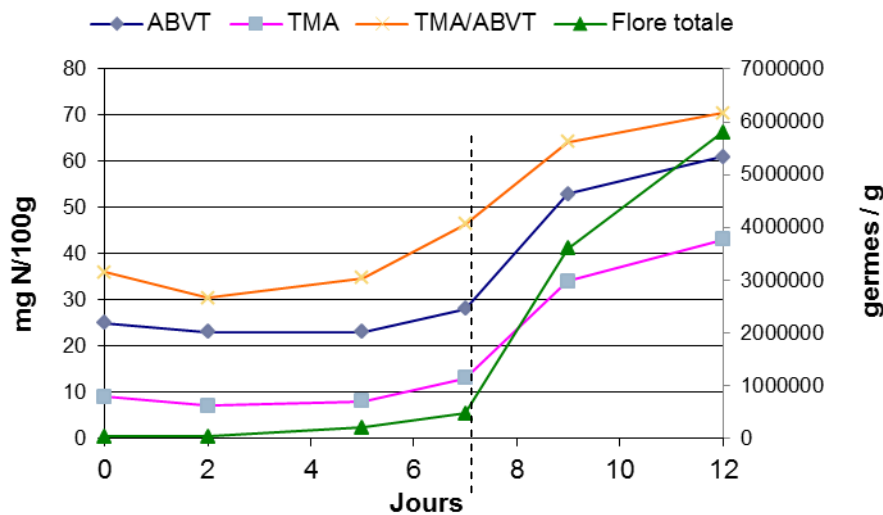


Figure 21: Evolution des paramètres classiques (ABVT, TMA et flore totale) utilisés pour l'évaluation de la fraîcheur des échantillons de merlan stockés sous glace à 0°C entre 0 et 12 jours (données Haliomer).

En évaluant la fraîcheur des filets de merlan stockés sous glace à 0°C avec d'une part les méthodes classiques (TMA, ABVT, flore totale) et d'autre part le test de la comète, on constate que les résultats obtenus sont tout à fait comparables. Les résultats obtenus pour les différents tests permettent de dire qu'après 7 jours de stockage à 0°C, les échantillons ont amorcé leur dégradation. Mais, en observant les comètes après 5 jours de stockage (Figure 20), un étirement est déjà visible, même si la valeur de l'Olive Tail Moment ne reflète pas encore cette dégradation.

## B. EVALUATION DE L'ETAT DE FRAICHEUR DU SAUMON

L'évaluation de la fraîcheur de filets de saumon à l'aide du test de la comète a été effectuée en aveugle. Des échantillons ont été stockés sous glace à 0°C et anonymés par Haliomer. Les échantillons ont été analysés, et au vu des résultats obtenus (valeurs de Tail Olive Moment et aspect

des comètes), un classement a été effectué (Figure 22). Les échantillons situés dans la zone bleue sont considérés comme peu ou pas dégradés, ceux situés dans la zone jaune comme moyennement dégradés et ceux situés dans la zone verte comme très dégradés. A noter que l'échantillon E a été placé dans la catégorie des échantillons peu dégradés, mais les paramètres étudiés permettent de dire qu'il est de qualité moins bonne que les quatre autres échantillons de cette catégorie.

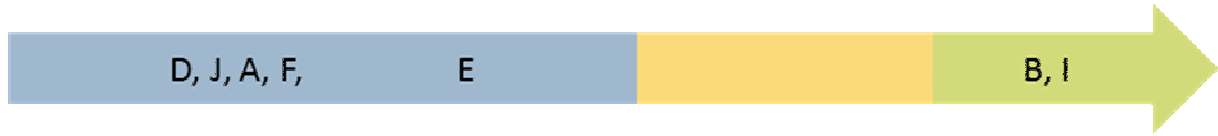


Figure 22: Classement des échantillons de saumon analysés en fonction des paramètres Tail Olive Moment et aspect des comètes. Les échantillons situés dans la zone bleue sont peu ou pas dégradés, ceux situés dans la zone jaune sont moyennement dégradés et ceux situés dans la zone verte sont très dégradés.

La Figure 23 présente l'évolution des Olive Tail Moment obtenus après l'analyse des comètes des différents échantillons anonymés. On peut facilement voir que les 4 premiers échantillons (D, F, J et A) correspondant à 0, 2, 5 et 7 jours de stockage à 0°C sont ceux que nous avons correctement placés dans le groupe des échantillons peu dégradés (zone bleue de la Figure 22). L'échantillon E correspond à l'échantillon stocké 9 jours. Bien que peu dégradé, il se détachait du reste du groupe comme précisé précédemment. Enfin, les échantillons I et B qui correspondent en réalité à des échantillons stockés 12 et 14 jours respectivement avaient également été correctement attribués au groupe des échantillons très dégradés (Figure 22).

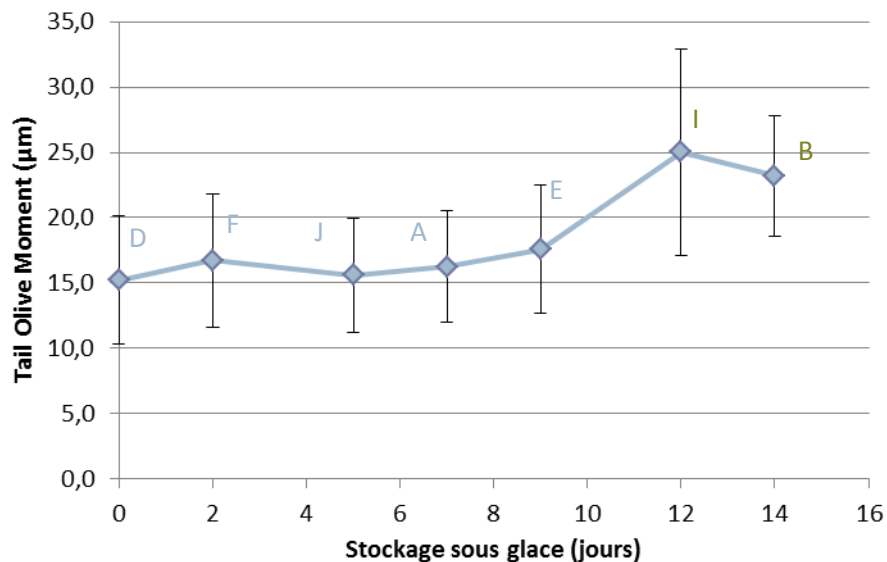


Figure 23: Evolution des Tail Olive Moment ( $\mu\text{m}$ ) pour des échantillons de saumon stockés entre 0 et 14 jours sous glace à 0°C. Pour chaque échantillon, 3×100 comètes ont été mesurées. Les résultats sont exprimés par la moyenne des 300 OTM obtenus  $\pm$  écart-type. Les lettres annotées sur le graphique correspondent aux identifications données aux échantillons anonymes.

Au vu des résultats exposés ci-dessus, la dégradation des échantillons de saumon stockés sur glace à 0°C s’amorce entre 9 et 12 jours de stockage. Ces résultats sont tout à fait en concordance avec les comètes visibles lors de l’observation microscopique des lames (Figure 24). La différence d’aspect entre les comètes issues de l’échantillon stocké 9 jours et celles de l’échantillon stocké 12 jours est très importante, ce qui laisse penser que la dégradation intervient probablement très rapidement après 9 jours de stockage.

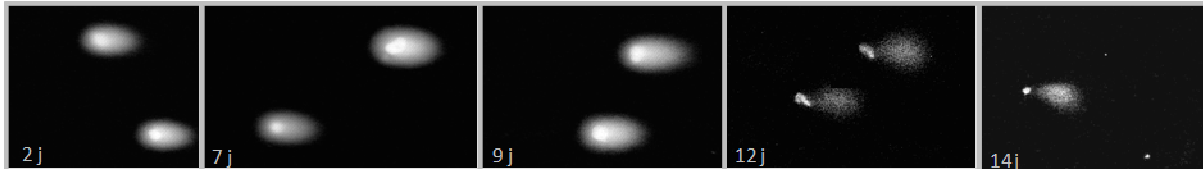


Figure 24: Exemples de comètes observées pour les échantillons de saumon stockés 2, 7, 9, 12 et 14 jours sous glace à 0°C.

L’étude de la répartition des Tail Olive Moment confirme également ces résultats (Figure 25). L’écart dans la répartition entre 9 et 12 jours de stockage à 0°C sous glace est très important comme déjà mentionné grâce à l’aspect visuel des comètes comme présenté dans la Figure 24.

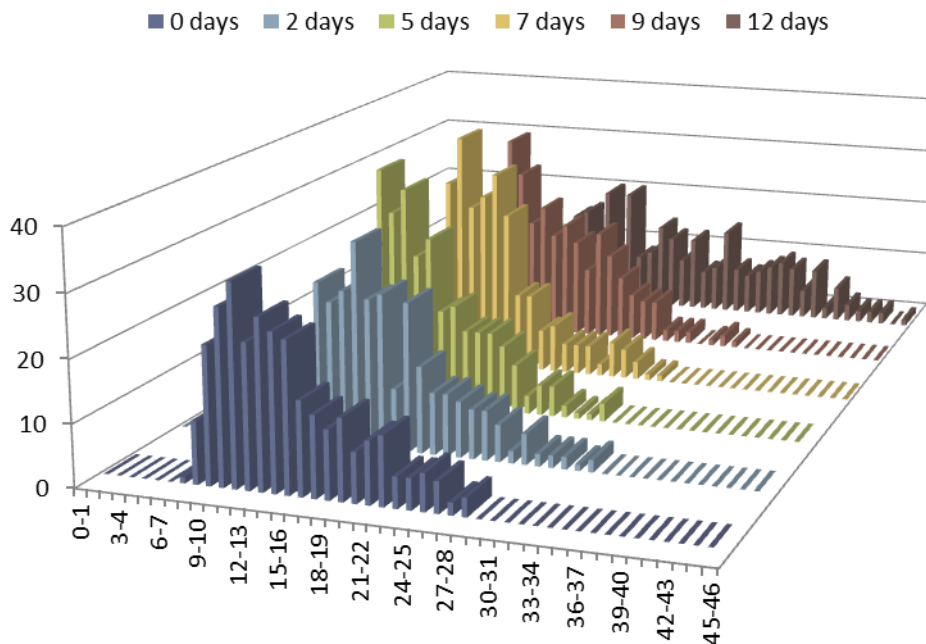


Figure 25: Répartition des OTM de saumon conservé sous glace pendant 0 à 14 jours.

## VI. AMELIORATION DE LA SENSIBILITE DU TEST

Le projet prévoyait une phase d'amélioration de la sensibilité du test par l'utilisation de la protéine fpg. Celle-ci, en conditions alcalines, met en évidence les sites potentiels de rupture simple et double brin ainsi que les lésions oxydatives au niveau des bases de l'ADN, et donc d'améliorer la sensibilité de détection.

La mise au point du protocole ayant été plus complexe que prévue (une cinquantaine de tests ont été menés pour le merlan, une vingtaine pour le cabillaud et une vingtaine pour le saumon), l'amélioration de la sensibilité du test par l'utilisation de protéine fpg n'a pu être réalisée.

Toutefois, le travail de paramétrage réalisé a permis de disposer de conditions de lecture suffisantes.

## CONCLUSION

Ce projet était dédié à l'optimisation et à la validation de la méthode de la comète pour d'une part, détecter des produits ayant été congelés / décongelés et les différencier des produits frais et d'autre part, détecter des produits ayant subi une double congélation (surgélation de poisson entier - décongélation - filetage - surgélation des filets). Dans un deuxième temps, il s'agissait d'étudier la faisabilité d'utiliser cette méthode comme test de l'appréciation de la fraîcheur des poissons, ce qui permettrait par exemple de détecter, en plus des ruptures de la chaîne du froid, les conservations prolongées. La méthode a été testée sur trois types de poissons, à savoir le merlan, le cabillaud et le saumon. Après une longue étape de mise au point et d'optimisation, un protocole commun aux poissons maigres et gras a pu être mis en place.

Pour ce qui concerne les ruptures de la chaîne du froid, l'étude de la cinétique de décongélation du saumon à 2, 5 et 10°C a permis de montrer des différences entre un témoin et un échantillon décongelé, même à des températures faibles comme 2°C. Cependant, les durées de décongélation minimales détectables sont relativement longues. La double congélation d'échantillons de poissons a également pu être mise en évidence par l'utilisation du protocole développé. Des échantillons doublement congelés au laboratoire ont servi pour les premiers tests. Par la suite, des échantillons ont été préparés par Haliomer, dont une série a été anonymée. Le test a été concluant puisque les échantillons doublement congelés de poissons maigres (cabillaud et merlan) ont pu être identifiés parmi d'autres échantillons simplement congelés. Le seul bémol est venu des échantillons de saumon doublement congelés pour lesquels l'identification a été erronée. Pourtant, les résultats ont été concordants entre CAMBA et Aérial en ce qui concerne cette identification, ce qui a permis de confirmer que l'échantillon doublement congelé était effectivement plus frais que le témoin. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un autre facteur très important : l'état de fraîcheur de l'échantillon au moment de sa congélation.

Ce dernier résultat constituait en effet une bonne illustration du fait qu'au-delà de la détection d'une différence de traitement entre deux échantillons, la méthode de la comète est en définitive une méthode d'évaluation de l'état global de fraîcheur des poissons. Le projet s'est ainsi également intéressé à l'étude de l'impact de la durée de conservation (pendant la congélation ou le stockage sur glace) sur la qualité des poissons. En ce qui concerne la congélation, des filets de saumon, de merlan et de cabillaud congelés à des dates différentes (de 15 jours de congélation à 27 mois) ont été analysés et on a pu montrer qu'au bout d'un an à -22°C, le saumon avait subi des modifications au niveau de son ADN. Des différences ont également été visibles pour le merlan, bien qu'elles n'aient été notées qu'à partir de 23 mois. Ces résultats sont particulièrement intéressants, puisque les durées à partir desquelles une dégradation de l'ADN est visible se situent aux alentours des DLUO de ces deux types de poissons (12 mois pour le saumon et 24 mois pour le merlan).

Pour ce qui est de la conservation sur glace, des échantillons de merlan et de saumon ont été stockés sous glace (0°C) pendant plusieurs jours. Pour le merlan, les résultats obtenus ont été comparés avec des tests classiques utilisés pour déterminer la fraîcheur, à savoir l'ABVT, la TMA et la flore totale. Nous avons pu montrer que le test de la comète est au moins aussi sensible que les tests classiques, puisqu'un début de dégradation au niveau de l'aspect des comètes était visible à partir de 5 jours, alors qu'avec les autres méthodes il ne le serait qu'à partir de 7 jours. Les échantillons de saumon ont montré une très faible dégradation de leur ADN jusqu'à 9 jours de stockage à 0°C. Cependant, après 12 jours de stockage, les comètes présentent un aspect très dégradé. Il semble donc également possible de mettre en évidence l'altération de l'état de fraîcheur pour les poissons gras. Cependant, cette altération n'est visible qu'à des durées relativement longues.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont permis de faire un état des lieux concernant les possibilités d'application du test de la comète au contrôle de la chaîne du froid du poisson. Ils montrent que le test de la comète est un bon candidat parmi méthodes rapides et objectives de caractérisation de la fraîcheur des filets de poissons, de différenciation du frais et du décongelé, mais aussi de mise en évidence de doubles congélations. Toutefois, cette étude conclut au fait que le test de la comète est d'abord un test de fraîcheur et qu'une rupture de la chaîne du froid (décongélation, double congélation), dans la mesure où elle affecte la fraîcheur, est détectable. Toutefois, l'identification du type de traitement subi par le poisson paraît être beaucoup plus difficile à réaliser. Cela fait partie des points qui devront être approfondis, en plus de l'abaissement de la limite de détection, par l'utilisation des conditions alcalines combinée ou non à celle de la protéine fpg.