

**MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ANALYSE GLOBALE DE LA FRAICHEUR DE FILETS DE POISSONS - TEST DE LA COMETE**

**Chef de file :**

**AQUIMER**

16 rue du commandant Charcot - 62200 BOULOGNE SUR MER  
Tel : 03.21.10.78.98, Fax : 03.21.30.33.22,  
Coordinateur : Mathilde Coquelle  
mathilde.coquelle@poleaquimer.com

**Partenaires :**

**AERIAL**

Rue Laurent Fries BP 40443 - 67412 Illkirch  
Tél 03.88.19.15.21  
Correspondant : Dalal Aoudé- Werner  
da.werner@aerial-crt.com

**CAMBA** (chimie analytique des molécules bioactives) - Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (UMR 7178, laboratoire du CNRS et de l'université de Strasbourg)  
74, route du Rhin – 67400 Illkirch  
Correspondant : Eric Marchioni

**HALIOMER**

15/17 rue Magenta – 62 200 Boulogne-sur-Mer  
Correspondant : Bruno Le Fur

**SYNDICAT GENERAL DES MAREYEURS**

22 Terrasse Bâtiment 1, Rue Huret Lagache - 62 200 Boulogne-sur-Mer

■ **Contexte et objectifs**

Dans un contexte de développement de la consommation des produits aquatiques en France, une part croissante de produits est importée. Cette augmentation des transactions de produits aquatiques impose de plus en plus d'exigences de loyauté commerciale et de sécurité.

Le projet visait à transposer sur les poissons, des développements en cours dans d'autres filières agro-alimentaires, en étudiant notamment la possibilité de différencier des filets de poissons frais et décongelés par la mise en évidence des altérations de leur ADN (par la technique de microélectrophorèse de cellules isolées également appelée « test de la comète »).

Les objectifs du projet étaient l'optimisation et la validation de la méthode de la comète pour :

- Détecter des filets ayant été congelés / décongelés et les différencier des filets frais.
- Détecter des filets ayant subi une double congélation.
- Etudier la faisabilité d'utiliser ce test pour l'appréciation de la fraîcheur des filets de poissons.

■ **Matériels et méthodes**

Le projet s'est déroulé en 4 phases :

**Etape 1 - Optimisation et standardisation des conditions expérimentales pour la mise en œuvre du test de la comète sur la matrice poisson**

- Conditions d'extraction de l'ADN (température, durée, pH, composition des tampons, enzymes ...)
- Choix des paramètres d'électrophorèse
- Optimisation du protocole d'analyse d'image spécifique à cette utilisation

**Etape 2 - Détermination de la durée minimale détectable de décongélation induisant une modification significative du profil électrophorétique des ADN et permettant ainsi de mettre en évidence une rupture de la chaîne du froid**

**Etape 3 - Détermination de la durée minimale de conservation sous glace permettant de mettre en évidence une modification significative du profil électrophorétique des ADN**

**Etape 4 - Etude de l'influence de différents facteurs sur la possibilité de différencier des filets frais et décongelés par le test de la comète**

- Etude de l'influence de la durée de stockage à l'état congelé
- Etude de la possibilité de détecter une double congélation du poisson
- Comparaison de l'évolution des profils électrophorétiques de filets de poissons décongelés et de filets de poissons réfrigérés.

Les tests ont été réalisés sur du merlan et du cabillaud (poissons maigres), du saumon et de la truite (poissons gras).

## ■ Conclusion

En premier lieu, il faut indiquer que le travail de mise au point qui a dû être mené pour adapter le test de la comète au poisson a été plus conséquent que prévu car le nombre de comètes diminuait rapidement après décongélation. Un nombre important d'essais d'optimisation a été réalisé par AERIAL et CAMBA pour obtenir des résultats satisfaisants. Ils ont pu montrer que le mode d'expression affectait les résultats.

Le projet poursuivait différents objectifs :

- Le premier objectif était de pouvoir détecter un produit décongelé (et le différencier d'un produit frais) et de déterminer la durée minimale de décongélation permettant une détection.  
Pour cela, des essais comparatifs ont été réalisés sur un échantillon congelé puis décongelé pendant différentes durées et à différentes températures. Ces essais ont permis de fixer une durée minimale de décongélation à partir de laquelle on observe une différence statistique avec le témoin Cette durée est fonction :
  - o de la température et de la durée de décongélation,
  - o du type du poisson (gras ou maigre),
  - o de la fraîcheur du poisson au moment de sa congélation,
  - o de la durée de stockage à l'état congelé.Dans la pratique, il apparaît difficile de réussir à utiliser le test de la comète pour différencier le frais du décongelé, parce que, dans les conditions habituelles de décongélation en réfrigération, les comètes ne sont dégradées qu'au bout de plusieurs jours.
- Le deuxième objectif poursuivi était la mise en évidence d'une double congélation.  
Les tests en aveugle sur du merlan, du cabillaud et du saumon ont donné de bons résultats qui doivent être validés à plus large échelle.
- Le troisième objectif visait à évaluer la possibilité d'utiliser le test pour apprécier la fraîcheur du poisson.  
L'étude de la conservation sous glace de merlan et de saumon a mis en évidence l'altération du poisson en fonction du temps. Mais à ce stade, la durée minimum pour observer une différence est trop longue (6-8j) pour avoir un intérêt pour les entreprises qui recherchent surtout un outil témoignant de l'altération des filets dès les premiers jours de conservation (1-3j).

## Perspectives

Ces premiers résultats sont encourageants et nécessitent d'être approfondis. Plusieurs enjeux ont été identifiés :

- Améliorer la sensibilité de la méthode grâce à la mise en œuvre du test en conditions alcalines et/ou avec l'enzyme de réparation fpg.
- Pour les différentes applications potentielles, approfondir l'étude des paramètres ayant une influence sur les résultats (durée de stockage à l'état congelé, méthode de décongélation, nature de l'espèce...).
- Réussir à s'affranchir de l'utilisation d'un témoin pour une mise en œuvre du test dans la pratique.

Les échanges prévus par la suite avec les professionnels permettront de prioriser les enjeux et de définir d'éventuels essais à poursuivre.