

N° Ordre : 41603

UNIVERSITE LILLE I SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Thèse de Doctorat  
présentée pour l'obtention du grade de  
Docteur ès Sciences de l'Université de Lille I  
dans la spécialité :  
Ingénierie des Fonctions Biologiques

soutenue le 02 Décembre 2014

par

**Alexandre DEHAUT**

Evaluation de la qualité-fraîcheur du poisson par  
des approches biochimiques (SPME-GC/MS) et  
moléculaires (qPCR)

devant le jury composé de :

<b>Pascal DHULSTER</b>	<i>Professeur, Institut Charles Viollette, Villeneuve d'Ascq</i>	Président du Jury
<b>Françoise LEROI</b>	<i>Cadre de recherche, IFREMER, Nantes</i>	Rapporteur
<b>Santiago AUBOURG-MARTINEZ</b>	<i>Professeur, CSIC, Vigo</i>	Rapporteur
<b>Jean-Christophe AUGUSTIN</b>	<i>Chargé de recherche, ENVA, Maison-Alfort</i>	Examineur
<b>Philippe JACQUES</b>	<i>Professeur, Institut Charles Viollette, Villeneuve d'Ascq</i>	Co-directeur de thèse
<b>Guillaume DUFLOS</b>	<i>Ingénieur de recherche, Anses, Boulogne-sur-Mer</i>	Co-directeur de thèse



*« La seule chose promise d'avance à l'échec, c'est celle que l'on ne tente pas. »*

*Paul Emile Victor.*

---

## Avant-propos

Cette thèse a été réalisée d'octobre 2011 à octobre 2014 au sein du Laboratoire de Sécurité des Aliments de l'Anses dans le Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture de Boulogne-sur-Mer dirigé jusqu'en Décembre 2012 par Pierre MALLE et depuis le 1<sup>er</sup> Janvier 2013 par Anne BRISABOIS. C'est plus précisément dans l'unité Physico-Chimie des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, dirigée par Guillaume DUFLOS, que ces travaux ont été conduits.

Ce travail de thèse, sous la co-direction de Guillaume DUFLOS et Philippe JACQUES, Professeur à Polytech'Lille, a été suivi par un comité de pilotage composé d'Anne BRISABOIS, Ossarath KOL Professeur à l'Université des Sciences et Technologie de Lille I, Assi N'GUESSAN et Frédéric KRZEWINSKI Maîtres de conférence à Poltech'Lille, et Thierry GRARD responsable de l'unité de Biochimie des Produits Aquatiques et Maître de conférence à l'Université du Littoral Côte d'Opale.

Ce travail a été valorisé lors de plusieurs présentations, sous forme de communications orales : aux 1<sup>ère</sup> Doctoriales de la Mer (10 Octobre 2013), aux journées des Doctorants et Post-doctorants de l'Anses (28-29 Novembre 2013), aux journées de la Société Française d'Ichtyologie (8-9 Avril 2014), au 44<sup>ème</sup> congrès du WEFTA (9-11 Juin 2014). La valorisation des travaux de thèse a également été réalisée à travers la présentation de posters aux journées des Doctorants et Post-doctorants de l'Anses (28-29 Novembre 2013) et au congrès FoodMicro 2014 (1-4 Septembre 2014). Enfin, les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse ont fait l'objet de publications scientifiques qui seront présentées au sein de ce manuscrit.

Cette thèse a été cofinancée par l'Anses et la Région Nord Pas-de-Calais.

---

## Résumé

La fraîcheur est un paramètre important dans le cadre de l'évaluation de la qualité du poisson et ce d'autant plus qu'il s'agit d'une matrice rapidement périssable. De nombreuses méthodes d'évaluation de la fraîcheur ont pu être développées par le passé notamment par des approches sensorielles, chimiques et physiques. Néanmoins, celles-ci possèdent plusieurs limites comme le manque de précision, d'objectivité ou sont dépendantes du mode de transformation du produit.

Le but principal de ce travail de thèse a été de rechercher des indicateurs de la qualité/fraîcheur du poisson permettant de caractériser les premiers stades d'altération. Pour ce faire deux axes de recherches ont été envisagés. Premièrement, les causes de l'altération ont été étudiées en ciblant la flore d'altération par des techniques de microbiologie et de biologie moléculaire (qPCR). Ensuite, les conséquences de l'altération ont été évaluées en quantifiant la triméthylamine (TMA) et la diméthylamine (DMA) produites par des enzymes exogènes et endogènes par une technique biochimique couplant la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (SPME-GC-MS).

Un premier travail en microbiologie a permis de caractériser sur le plan phénotypique et génotypique différentes souches de *S. baltica* isolées d'un poisson altéré. Une de ces souches, H<sub>2</sub>S négative, laisse penser que les techniques traditionnelles de microbiologie ciblant la production d'H<sub>2</sub>S pourraient présenter des limites. Pour s'affranchir de celles-ci une méthode qPCR, ciblant le gène *torA* codant pour l'OTMA réductase, a été développée et testée lors d'un suivi d'altération. Les résultats de qPCR montrent une baisse linéaire du signal dès les premiers jours d'altération avec de bonnes anticorrélations avec les mesures de l'azote basique volatil total (ABVT) et de la TMA. Le séquençage des produits PCR montre des résultats identiques à la séquence du gène *torA* de *P. phosphoreum*.

En ce qui concerne les conséquences de l'altération, une méthode de SPME-GC-MS a permis de définir le concept d'azote basique volatil partiel consistant à quantifier spécifiquement la TMA et la DMA. La méthode de SPME a montré, pour la TMA, une excellente corrélation avec la technique de référence, aucune méthode n'existant pour la DMA. Les données de quantification de la TMA et de la DMA ont été combinées de façon à créer un nouvel indicateur, le ratio DMA sur TMA. Ce rapport évolue de façon significative lors des premiers jours d'altération de filets de cabillaud stockés sous glace fondante

Outre ces outils prometteurs, ce travail de thèse a également été l'occasion de travailler, dans le cadre de deux projets, sur la qualité du poisson au-delà de la simple notion de fraîcheur en étudiant le volatilome d'anchois transformés et de poissons cuits.

**Mots-clés :** Poisson, fraîcheur, qualité, flore d'altération, TMA, DMA, *torA*, qPCR, SPME-GC-MS.

---

## Abstract

Freshness is a key parameter for the quality assessment of fish, especially because this is a highly perishable matrix. By the past, numerous freshness assessment methods have been developed, particularly by sensory analysis, chemical and physical approaches. Nonetheless these techniques display several drawbacks as the lack of accuracy level, of objectivity or are dependant on the type of product transformation.

The main goal of this PhD work was to research quality/freshness indicators for fresh fish, allowing characterizing the early steps of freshness decay. To this end two lines of research have been planned. On the one hand, the work was based on a spoilage cause targeting specific spoilage flora thanks to a molecular biology technique (qPCR). On the other hand, a second part of the work was focused on the consequences of spoilage with quantification of trimethylamine (TMA) and dimethylamine (DMA), produced by exogenous and endogenous enzymes, by a biochemical technique coupling gas chromatography and mass spectrometry (SPME-GC-MS).

A first development in microbiology allowed characterizing the phenotype and genotype of different *Shewanella baltica* strains isolated from a spoiled fish. One of these strains is H<sub>2</sub>S negative. It suggests that in traditional techniques of microbiology, the screening of H<sub>2</sub>S production ability might have limits.

To overcome these limits, a qPCR approach, targeting *torA* gene coding TMAO reductase, was developed and tested during a monitoring study of fish spoilage. qPCR results showed a linear decreased of the signal in the early days of the study and displayed good anti-correlations with total volatile basic nitrogen and TMA measurements. PCR product sequencing displayed identical results to the *torA* sequence of *P. phosphoreum*.

Concerning the consequences of spoilage, a SPME-GC-MS method allowed defining the concept of partial volatile basic nitrogen consisting to the specific quantification of both TMA and DMA. SPME method displayed, for TMA, an excellent correlation with the reference method, no standard technique existing for DMA estimation. TMA and DMA data were combined in order to calculate a new indicator, DMA on TMA ratio. This ratio evolves significantly in the early days of spoilage for cod fillets conserved on melting ice.

Finally, this PhD was also an opportunity to work, as part of two projects, on fish quality beyond the simple notion of freshness, studying the volatilome of processed anchovies and cooked fish.

**Keywords :** *Fish, freshness, quality, spoilage flora, TMA, DMA, torA, qPCR, SPME-GC-MS*

---

## Remerciements

A l'heure d'achever ce manuscrit vient la rédaction d'une section particulière à mes yeux : celle des remerciements. J'espère n'y avoir oublié personne ; il y a eu tant de rencontres au cours de ces années, qui m'ont permis d'en arriver là.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Tout d'abord merci à Monsieur le Professeur Pascal Dhulster d'avoir accepté d'assurer la présidence de ce jury, à Madame le Docteur Françoise Leroi et à Monsieur le Professeur Santiago Aubourg-Martínez d'avoir été les rapporteurs de ces travaux. Enfin je remercie Monsieur le Docteur Jean-Christophe Augustin, Monsieur le Professeur Philippe Jacques et Monsieur le Docteur Guillaume Duflos d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Je tiens ensuite à remercier les membres du comité de pilotage de ma thèse en plus de Monsieur Guillaume Duflos et Monsieur Philippe Jacques, Madame le Docteur Anne Brisabois, Monsieur le Professeur Ossarath Kol et Messieurs les Docteurs Frédéric Krzewinski, Thierry Grard et Assi N'Guessan. Vos précieux conseils m'ont toujours permis d'avancer au cours de ces travaux.

Cette thèse aura été l'occasion pour moi de me déplacer afin d'aller étudier de nouvelles technologies en lien plus ou moins direct avec l'étude du poisson. Je tenais à remercier Messieurs Flemming Jessen, Bo Jørgensen, Henrik Nielsen et Madame Caroline Baron pour ce cours de PhD passionnant au DTU de Lyngby. Merci à Mme Marlène Chollet de m'avoir transmis le logiciel NRPS primer du Laboratoire ProbioGEM ainsi que de m'avoir convié aux réunions de travail en vue de l'amélioration de ce dernier. Je suis reconnaissant à Messieurs Benoît Gassilloud et Jean-Sébastien Py et Madame Emmanuelle Rion, de la Plateforme MALDI-TOF de l'Anses, pour m'avoir initié à cette technologie et son application pour l'identification de microorganismes. Merci à Messieurs Robin Bocquet, Gaël Mouret, Arnaud Cuisset et Frank Hindle du laboratoire de Physico-Chimie de l'Atmosphère pour le travail collaboratif entamé qui conduira, je l'espère, à de nouvelles avancées sur la détection de composés volatils. Enfin, je remercie également les personnes de la Plateforme PFI Nouvelles-Vagues : Bruno Le Fur, Jean-Charles Briand, Jalina Kaly, Mathieu Volz et Véronique Mulak, avec qui j'ai mené plusieurs projets. Votre professionnalisme ainsi que les échanges toujours intéressants que nous avons pu avoir m'ont énormément appris sur la transformation du poisson.

Je tiens enfin à remercier les institutions notamment l'Anses et la Région Nord-Pas-de-Calais de m'avoir permis de réaliser ce travail à travers le cofinancement de cette thèse.

Je tenais à remercier Messieurs Malle et Duflos de m'avoir fait confiance, il y a trois ans, à un moment où d'autres portes se sont fermées, pour porter ce projet. J'espère avoir été à la hauteur de cette confiance. Je tenais également à remercier Mme Brisabois, désor-

mais directrice du département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture pour sa disponibilité et ses conseils.

M. Duflos, merci pour votre écoute, la grande liberté que vous m'avez toujours donné tout au long de cette thèse et surtout votre disponibilité de tous les instants lors des derniers mois. M. Jacques, merci d'avoir accepté malgré votre emploi du temps chargé, la codirection de cette thèse.

Un grand merci à l'ensemble des collègues du laboratoire : Charlotte, Cindy, Clémence, Corinne, Fehade, Gaelle, Graziella, Guylaine, Karine, Marie-Ange, Mélanie, Odile, Régine, Sabine, Sophie, Stéphanie, Sylvie et Virginie. Vous avez participé de près ou de loin à l'élaboration de ces travaux, je vous en suis grandement reconnaissant.

Une pensée également pour mes collègues thésards ou ancien-thésards : Sylvain, Daline, Mamadou, Thomas et Yuwalee, pour tout ce que nous avons vécu « au et en dehors du » laboratoire.

Je tiens à remercier chaleureusement Paul Morieux et Simon Duthen, mes stagiaires de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> année pour leur travail. Vous encadrer a été un plaisir, d'autant plus que j'ai constamment eu des personnes à l'écoute et véritable force de propositions en face de moi. J'espère avoir modestement contribué à vos poursuites d'études respectives.

Un grand merci à Adeline Bonne et Eric Tavernier de l'IUT de Calais-Boulogne, ainsi qu'à Pierrette Ethuin et Thierry Grard du Master QPAH de l'ULCO pour m'avoir confié des enseignements au sein de vos formations respectives. J'associe à ces remerciements mes collègues de TP Irina Sadovskaya, Valérie Lencel et Marie Deblieck.

Je remercie également Jean-Marc de m'avoir permis, à travers l'association Loisirs à l'A-Fish, de découvrir encore un peu plus la région du Boulonnais que je n'aurai a priori pas été visitée et cela aurait constitué une belle erreur !

Sur un plan plus personnel, je tenais à remercier mes parents pour le soutien inconditionnel apporté depuis toujours : merci de m'avoir permis de faire toutes ces études. Je ne saurais également oublier ma sœur, Caroline, tu as été et restes une grande-sœur géniale! A tous les trois et même si parfois vous ne comprenez pas tout ce que je raconte, je vous dédie ce travail.

Je suis également plein de gratitude envers mes grands-parents parce que chacun d'eux a joué un rôle important dans ma vie. Papi de Brest te voir assis à ton bureau tôt le matin devant ta machine à écrire est une image qui m'a accompagné les quelques fois où l'insomnie m'a conduit à rédiger cette thèse aux aurores. Mamie de Brest, il se pourrait qu'inconsciemment les séances de pêches estivales de bigorneaux, crevettes, crabes verts et gobies de Porsmilin ne soient pas étrangères à cet intérêt pour la fraîcheur des produits de la pêche. Papi de Péronne, merci de m'avoir fait part de tes connaissances et surtout du temps passé avec toi dans le jardin. Mamie de Péronne, merci pour ta joie communicative,



tes confitures et les bons moments passés ensemble.

La recherche en biochimie et microbiologie n'était pas a priori ce à quoi je me destinais, c'est mon parcours d'étude dans le secondaire et surtout les nombreuses rencontres d'encadrants de stage et de projet qui m'ont transmis le virus. Je tenais à remercier Monsieur Steven Kildea et Mesdames Baliarda et Denayrolles pour m'avoir communiqué leur passion de la recherche et m'avoir confié des projets de recherche tout aussi captivants.

Mon arrivée en thèse est également le résultat de plusieurs années de formation de l'IUT de Laval à AgroParisTech en passant par l'ENITA de Bordeaux. Cela fut pour moi l'occasion de rencontrer de nombreuses personnes, binômes et amis. Je tenais donc à remercier particulièrement Angèle, Anne-Lise, Aurore, Dany, Charles et Mickael de l'IUT. Le passage en école d'ingénieur aura été l'occasion de travailler sur différents projets mais également de moments de détente, merci à tous pour ces instants : Bid, Pierrot, Dadoune, Gab's, Sami, Vince, Loïc, Théa, Bike, Nounou, Cécilia, Patricia et Cyrielle, les collègues de l'équipe de Foot, des Assos et de la promo SIBA à AgroParisTech.

Je terminerai ces remerciements par une aventure qui débutait il y a 10 ans, à Châto, elle m'a laissé une marque indélébile. J'y ai rencontré des personnes hors du commun au sein d'une promo extraordinaire. Même si pour beaucoup nos routes ont divergé, je n'ai cessé de me rappeler cette année de prépa formidable. Merci à 3.14, Baloo, Dédé, Fillau, Gigi, GroClo, Ienien, Jésus, Katell, Kermitt, Laëticia ma jumelle, Ludi, Manu, Marlène, Mathilde, les M&M's Marie et Mamie, Ninin, Paupiette, Valentine, Vince et Youki, pour tout ce que vous avez été, j'espère avoir pris un petit morceau de chacun d'entre vous. Et parce que la vie n'est pas toujours drôle, j'ai une pensée émue pour Tomtom, tu es parti depuis 4 ans déjà, mais ton abnégation et ta gentillesse sont toujours pour moi des modèles. Enfin, un grand merci à ceux sans qui cette année n'aurait pas eu la même saveur : Mme Lelay, M. Di Costanzo (Dico) et M. Poulizac (Poupou). M. Poulizac, je vous suis également reconnaissant de m'avoir remis le pied à l'étrier en me poussant vers la voie de l'IUT et du concours C2.

# Table des matières

AVANT-PROPOS .....	i
RESUME.....	ii
ABSTRACT .....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIERES.....	vii
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	xi
TABLE DES ABREVIATIONS .....	xvii
INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
<b>Chapitre 1. Spécificités du poisson et ressources halieutiques en lien avec la qualité.....</b>	<b>4</b>
<b>I. Systèmes de classification des poissons .....</b>	<b>4</b>
1. Utilisation des noms vernaculaires .....	4
2. Classification selon le lieu de vie .....	5
3. Classification selon des caractéristiques biologiques.....	5
<b>II. Spécificités biologiques du poisson pouvant influencer la qualité .....</b>	<b>5</b>
1. Des modes de vie distincts reflétés par des muscles différents .....	6
2. Importance de la croissance et reproduction.....	7
3. Composition chimique du poisson .....	7
a. Importance du régime alimentaire .....	7
b. Des lipides caractéristiques.....	8
c. Trois grandes classes de protéines .....	9
d. OTMA et autres composés azotés non-protéiques.....	10
e. Vitamines et sels minéraux du poisson .....	11
4. La flore bactérienne du poisson .....	12
a. Origine et localisation .....	12
b. Composition de la flore.....	13
<b>III. Ressources halieutiques et consommation du poisson .....</b>	<b>15</b>
1. Les ressources halieutiques mondiales .....	15
a. Une production halieutique mondiale soutenue par l'aquaculture .....	15
b. Données concernant la pêche marine mondiale .....	15
2. Etat de la consommation française de poissons .....	17
a. Une consommation importante et stable .....	17
b. Habitudes des consommateurs français .....	17
<b>Chapitre 2. Qualité et suivi de la fraîcheur du poisson : quels outils ? .....</b>	<b>19</b>
<b>I. Evolution post mortem de la chair du poisson.....</b>	<b>19</b>
1. L'étape de rigor mortis entre changements biochimiques et modifications de la texture .....	19
2. Deux voies d'altération conduisant à la dégradation des lipides .....	20
a. Dégradation des lipides par hydrolyse enzymatique .....	20
b. Autooxydation des acides gras libres .....	21
3. Catabolisme des nucléotides.....	21
4. Deux voies de réduction de l'OTMA .....	22
a. Décomposition par voie autolytique.....	22

b. Réduction via l'activité microbienne .....	23
<b>5. Evolutions microbiologiques .....</b>	<b>23</b>
a. Une évolution de la microflore soumise à de nombreux facteurs .....	24
b. Importance de la notion d'organisme spécifique d'altération .....	24
<b>II. Méthodes analytiques d'évaluation de la qualité/fraîcheur du poisson .....</b>	<b>25</b>
<b>1. Analyses sensorielles.....</b>	<b>25</b>
a. Une méthode d'évaluation issue de la réglementation européenne .....	25
b. Développement du Quality Index Method (QIM) .....	26
c. Avantages et inconvénients des méthodes sensorielles .....	26
<b>2. Analyses biochimiques .....</b>	<b>27</b>
a. Dosage de l'azote basique volatil total (ABVT).....	27
b. Dosage des dérivés nucléotidiques.....	27
c. Dosage des amines biogènes .....	28
d. Mesure de l'oxydation des lipides.....	29
<b>3. Analyses microbiologiques.....</b>	<b>29</b>
a. Un outil caractérisant essentiellement la sécurité sanitaire .....	30
b. Approches microbiologiques pour l'estimation de la fraîcheur .....	30
<b>4. Analyses physiques.....</b>	<b>31</b>
a. Mesure de la texture.....	31
b. Suivi des propriétés électriques du muscle .....	32
c. Analyse d'image et altération du poisson .....	32
<b>Chapitre 3. Etude du volatilome pour évaluer la qualité/fraîcheur du poisson frais ou transformé.....</b>	<b>35</b>
<b>I. Les outils de la caractérisation du volatilome .....</b>	<b>35</b>
<b>1. L'extraction des composés volatils : préalable à l'analyse.....</b>	<b>35</b>
a. L'espace de tête statique .....	35
b. L'espace de tête dynamique.....	37
<b>2. Séparation des composés volatils par chromatographie.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Méthodes de détection et d'identification des composés volatils.....</b>	<b>39</b>
a. La spectrométrie de masse : un code barre pour la molécule .....	39
b. L'olfactométrie : implication du nez humain dans l'analyse .....	40
c. Les nez électroniques : apprendre « l'odeur » à l'automate .....	40
<b>II. Le volatilome des matrices à base de poisson.....</b>	<b>42</b>
<b>1. Une famille de volatils au rôle prépondérant : les aldéhydes .....</b>	<b>42</b>
<b>2. Une seconde famille de volatils aux odeurs diverses : les cétones.....</b>	<b>43</b>
<b>3. Les alcools : essentiellement des marqueurs d'altération.....</b>	<b>44</b>
<b>4. Rôle des composés soufrés et azotés dans les mauvaises odeurs.....</b>	<b>45</b>
<b>5. Les composés volatils d'importance secondaire.....</b>	<b>46</b>
<b>6. Le processus de fumaison : synthèse de composés phénoliques .....</b>	<b>46</b>
<b>7. Des volatils issus du processus de cuisson .....</b>	<b>46</b>
<b>Chapitre 4. Détection du gène <i>torA</i>, potentiel marqueur d'altération du poisson ...</b>	<b>49</b>
<b>I. Le gène <i>torA</i>, un potentiel marqueur de l'altération du poisson ? .....</b>	<b>49</b>
<b>1. Présentation de l'opéron <i>tor</i> .....</b>	<b>49</b>
a. Quatre gènes de structure dans le système OTMA réductase .....	49
b. Trois gènes à l'origine de la régulation de l'opéron <i>tor</i> ECAD .....	52
c. Régulation « annexe » du système OTMA réductase .....	54
<b>2. Plusieurs flores du poisson impliquées dans la réduction de l'OTMA .....</b>	<b>55</b>

<b>II. Quantification de microorganismes dans les matrices alimentaires .....</b>	<b>56</b>
<b>1. Impacts de la matrice sur la méthode de détection et de quantification .....</b>	<b>56</b>
a. Inhibiteurs retrouvés au cours du processus analytique.....	56
b. L'extraction de l'ADN rempart potentiel à l'inhibition ? .....	58
<b>2. Quantification de flores pathogènes dans les aliments .....</b>	<b>58</b>
<b>3. Quantification de flores non-pathogènes dans les aliments.....</b>	<b>61</b>
<b>Chapitre 5. Différents outils au service de l'analyse de données .....</b>	<b>64</b>
<b>I. Apport des statistiques descriptives et inférentielles dans le cadre de l'analyse de données.....</b>	<b>64</b>
<b>1. Une quantité importante de données à traiter .....</b>	<b>64</b>
<b>2. L'ACP : Réduire la quantité de données, en conservant l'information .....</b>	<b>64</b>
a. Principe et signification mathématique de l'ACP .....	64
b. Les principaux résultats de l'ACP .....	65
<b>3. Apports des statistiques inférentielles et de l'ANOVA pour la comparaison de données. ....</b>	<b>65</b>
a. Prérequis pour la réalisation d'analyses de variance .....	65
b. Comparaison de populations par l'analyse de variance .....	66
c. Le test LSD de Fisher, approche complémentaire de l'ANOVA.....	66
d. Les tests non-paramétriques, alternative à l'ANOVA .....	67
<b>II. De l'outil bio-informatique à la biologie moléculaire .....</b>	<b>67</b>
<b>1. Consultation des banques de données en ligne .....</b>	<b>67</b>
a. Stockage et organisation des données du séquençage .....	67
b. Consultation des bases de données et requêtes.....	68
<b>2. Alignement des séquences d'intérêt.....</b>	<b>68</b>
<b>3. Recherche de zone consensus et dessin d'amorces : cas particulier des amorces dégénérées .....</b>	<b>70</b>
a. Les bases dégénérées : plus permissives pour l'appariement.....	70
b. La sélection d'amorces : un cahier des charges précis .....	70
<b>TRAVAUX DE RECHERCHE.....</b>	<b>72</b>
<b>Partie I : Investigations concernant des causes microbiologiques de l'altération du poisson, dans le cadre de l'évaluation de sa fraîcheur .....</b>	<b>74</b>
<b>Chapitre 1. Caractérisation de souches de <i>S. baltica</i> issues d'un poisson altéré .....</b>	<b>74</b>
<b>I. Résultats de caractérisations phénotypiques et génotypiques.....</b>	<b>74</b>
<b>II. Résultats de l'approche MALDI-TOF.....</b>	<b>81</b>
<b>1. Préparation et traitement des échantillons.....</b>	<b>81</b>
<b>2. Résultats .....</b>	<b>82</b>
<b>III. Contribution de l'approche et perspectives .....</b>	<b>83</b>
<b>Chapitre 2. Quantification du gène <i>torA</i> dans une matrice de poisson.....</b>	<b>84</b>
<b>I. Principaux résultats obtenus.....</b>	<b>84</b>
<b>1. Etude préliminaire.....</b>	<b>84</b>
<b>2. Développement de la méthode qPCR pour la quantification de <i>torA</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>II. Contribution de l'approche et perspectives .....</b>	<b>96</b>
<b>Partie II : Investigations concernant les conséquences de l'altération : mise en place d'une méthode de quantification de la TMA et la DMA en SPME-GC-MS.....</b>	<b>97</b>
<b>I. Présentation de l'approche .....</b>	<b>97</b>
<b>II. Principaux résultats obtenus.....</b>	<b>98</b>

---

III. Contribution de l'approche et perspectives.....	108
<b>Partie III : Qualité de poissons transformés au sens large – applications de méthodes SPME-GC-MS et HPLC pour évaluer la qualité d'anchois. ....</b>	<b>110</b>
I. Principaux résultats obtenus.....	110
II. Contribution de l'approche et perspectives.....	122
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>123</b>
<b>VALORISATION DES TRAVAUX.....</b>	<b>127</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>128</b>
<b>ANNEXES.....</b>	
<b>Annexe 1</b> : Algorithme d'extraction et classement des données issues des chromatogrammes	
<b>Annexe 2</b> : Algorithme permettant la réalisation d'une analyse de variance d'une variable de la vérification des conditions de normalité à la réalisation d'un test <i>post-hoc</i>	
<b>Annexe 3</b> : Exemple d'une fiche Genbank sur la séquence partielle du gène <i>gyrB</i> d'une souche de <i>S. baltica</i>	
<b>Annexe 4</b> : Algorithme de recherche de séquences ADN au sein de banques	
<b>Annexe 5</b> : Algorithme permettant le screening haut-débit de listes de potentiels oligonucléotides dans le cadre de la mise en place d'une méthode PCR	
<b>Annexe 6</b> : Poster présenté au congrès FoodMicro 2014	
<b>Annexe 7</b> : Poster présenté aux Journées des Doctorants - Post-Doctorants de l'Anses 2013	

---

# Table des illustrations

## Figures

<b>Figure 1-1</b> : Classification des espèces de poissons selon les profondeurs dans lesquelles elles évoluent. (Ifremer 2011) .....	<b>5</b>
<b>Figure 1-2</b> : Proportion de six molécules appartenant à l'azote non-protéique dans les muscles de deux poissons téléostéens marins (A et B), d'un sélacien (C) et d'un poisson téléostéen d'eau douce (D). (Suyama <i>et al.</i> 1977; Konosu & Yamaguchi 1982) .....	<b>18</b>
<b>Figure 1-3</b> : Equation chimique de l'oxydation de la triméthylamine par action d'une monooxydase NADPH dépendante (Agustsson & Strøm 1981). .....	<b>180</b>
<b>Figure 1-4</b> : Classes de microorganismes déterminées par les plages optimales de croissance en fonction de la température. ....	<b>14</b>
<b>Figure 1-5</b> : Evolution de la pêche mondiale sur la période 1950-2010. L'aire totale sous la courbe correspond à la pêche totale (en millions de tonnes), l'aire sous la courbe bleu clair à celle de la pêche de capture et celle sous la courbe bleu foncé à celle de l'aquaculture (FAO, 2012). ....	<b>15</b>
<b>Figure 1-6</b> : Evolution des captures marines classées par groupes d'espèces les plus prisées par le marché mondial. Les données présentent l'évolution des captures sur les quarante dernières années (FAO, 2010). ....	<b>16</b>
<b>Figure 1-7</b> : Principaux groupes d'espèces compris au sein de la production aquacole mondiale. Les données correspondent à des pourcentages issus de volumes de production en millions de tonnes (FAO, 2010). ....	<b>16</b>
<b>Figure 1-8</b> : Evolution de la production aquacole mondiale sur la période 1970-2008. Les données sont classées par principaux groupes d'espèces. NIA signifie non inclus ailleurs (FAO, 2010). ....	<b>16</b>
<b>Figure 1-9</b> : Part de l'aquaculture dans la production mondiale selon les principaux groupes d'espèces. Les données sont présentées sur la période 1950-2008 (FAO, 2010). ....	<b>17</b>
<b>Figure 1-10</b> : Evolution de la consommation en poisson appartenant aux espèces pélagiques et démersales et autres types de poissons marins sur la période 1960-2010. Les données sont communiquées pour le monde, les grands continents, la Chine et la France. ....	<b>17</b>
<b>Figure 1-11</b> : Evolution des quantités de produits de la mer achetées (en tonnes de produits finis) en fonction des années. Quatre types de produits sont présentés : frais, traiteur, surgelés et appertisés. La période étudiée va de 2007 à 2012 (FranceAgriMer 2013). ....	<b>17</b>
<b>Figure 2-1</b> : Diagramme illustrant le terme de qualité et les notions sous-jacentes qui lui sont liées. .	<b>19</b>
<b>Figure 2-2</b> : Sites d'action potentiels des lipases A1, A2, B, C et D sur une molécule de phospholipide (Lopez-Amaya & Marangoni 2000b). ....	<b>20</b>
<b>Figure 2-3</b> : Réactions chimiques intervenant dans le processus d'autooxydation. Le processus est divisé en trois étapes d'initiation (1), propagation (2) et terminaison de la réaction (3). (Frankel 2005) .....	<b>21</b>
<b>Figure 2-4</b> : Représentation schématique des réactions de dégradation de l'ATP et de ses métabolites. Avec 1 : ATPase, 2 : Myokinase, 3 : AMP désaminase, 4 : IMP phosphohydrolase, 5 : Nucléoside phosphorylase ou lonsine nucléosidase, 6 et 7 : Xanthine oxydase (Henehan <i>et al.</i> 1997; Huss 1999). ....	<b>21</b>
<b>Figure 2-5</b> : Equation chimique de la réduction de l'OTMA en DMA et formaldéhyde par l'action de l'OTMA déméthylase. ....	<b>22</b>
<b>Figure 2-6</b> : Equation chimique de la réduction de l'OTMA en TMA et en eau par l'action de l'OTMA réductase. ....	<b>23</b>
<b>Figure 2-7</b> : Diminution de l'indice de qualité de cabillaud conservé à 0°C. Les causes majeures de l'altération sont données pour les phases considérées (Huss 1999). ....	<b>24</b>
<b>Figure 2-8</b> : Représentation schématique de la cinétique de la microflore présente au sein de la chair du poisson, de celle d'un microorganisme spécifique d'altération et d'un catabolite servant d'indicateur d'altération (Gram & Huss 1996). ....	<b>24</b>

<b>Figure 2-9</b> : Evolution visuelle de l'apparence globale de bars communs, de la transparence de leurs rétines et de l'aspect des branchies. ....	<b>25</b>
<b>Figure 2-10</b> : Représentation schématique illustrant le lien entre la note QIM et le temps de conservation sous glace de plie et de saumon (Martinsdóttir <i>et al.</i> 2003). ....	<b>26</b>
<b>Figure 2-11</b> : Représentation schématique du processus analytique conduisant au dosage de l'ABVT (Ifremer 2008a). ....	<b>27</b>
<b>Figure 2-12</b> : Représentation schématique de la cellule à microdiffusion de Conway (vue de dessus et coupe transversale). (Ifremer 2008a) ....	<b>27</b>
<b>Figure 2-13</b> : Formules établissant la valeur du facteur K (a) permettant d'estimer la fraîcheur d'un poisson et celle du facteur K' (b), forme simplifiée du facteur K. ....	<b>28</b>
<b>Figure 2-14</b> : Profil chromatographique obtenu lors de la séparation de l'ATP et de ses catabolites par HPLC. Avec : Hx, l'hypoxanthine et HxR l'inosine. (Ryder 1985) ....	<b>28</b>
<b>Figure 2-15</b> : Formule permettant de définir l'amine index (AI) en fonction des concentrations en histamine (Hist), putrescine (Put), cadavérine (Cad), spermidine (Spd), spermine (Spm), tyramine (Tyra), tryptamine (Trp) et en méthylamine (Meth) (Duflos <i>et al.</i> 1999). La formule de l'indice de qualité valable pour des canettes de thon, défini par Mietz & Karmas (1977), est donnée ensuite. ....	<b>29</b>
<b>Figure 2-16</b> : Texturomètre équipé d'un dispositif permettant de réaliser le test de Warner-Bratzler sur un échantillon de saumon. ....	<b>31</b>
<b>Figure 2-17</b> : Illustration de l'utilisation d'un Torry meter pour mesurer l'état d'altération d'un poisson entier. ....	<b>32</b>
<b>Figure 2-18</b> : Corrélations enregistrées entre les valeurs issues de mesures réalisées sur du cabillaud entier stocké sous glace fondante par le Fischtester VI et le nombre de jours de conservation (a) ou les notes QIM obtenues (b). (Oehlschlager <i>et al.</i> 2003) ....	<b>32</b>
<b>Figure 2-19</b> : Séries d'images de peau de poissons obtenues à des longueurs d'ondes de 400 nm (a), 660 nm (b) et 940 nm (c). La série I correspond aux images brutes et la série II aux images à l'issue du processus de calibration. (Kröger 2003) ....	<b>33</b>
<b>Figure 2-20</b> : Extrait du brevet européen EP 2 189 789 A1 illustrant une copie d'écran du système permettant l'analyse de l'œil de poissons par approche biométrique. (Autheman & Widmann 2010)..	<b>33</b>
<b>Figure 2-21</b> : Représentation schématique des équivalences entre méthodes sensorielles et méthodes instrumentales pour l'évaluation de la fraîcheur du poisson et le développement de l'AQI. (Olafsdottir <i>et al.</i> 2004) ....	<b>34</b>
<b>Figure 3-1</b> : Occurrence du mot volatilome au sein d'articles scientifiques en fonction de l'année de publication. Suivi réalisé à l'aide de Google Scholar (Juillet 2014) ....	<b>35</b>
<b>Figure 3-2</b> : Représentations schématiques des deux utilisations possibles d'une fibre de SPME. (a) collection des composés par immersion et (b) collection des composés volatils dans l'espace de tête ....	<b>35</b>
<b>Figure 3-3</b> : Représentation schématique des deux étapes de partition enregistrées lors d'une extraction par une fibre SPME, avec $K_1$ le coefficient de partition entre l'échantillon et l'headspace et $K_2$ celui entre l'headspace et la fibre. ....	<b>36</b>
<b>Figure 3-4</b> : Graphiques illustrant l'impact de la concentration en sel et du pH sur la valeur d'aire de différents composés volatils. (Li <i>et al.</i> 2004). Avec * la tri-n-butylamine,   la di-n-butylamine, $\Delta$ la triéthylamine, $\blacktriangledown$ la tri-n-propylamine, $\square$ la n-butylamine et $\blacksquare$ la TMA. ....	<b>36</b>
<b>Figure 3-5</b> : Illustrations d'un montage de "purge and trap" utilisé pour l'extraction de composés volatils (a) et d'un système d'espace de tête dynamique en fiole (b). L'illustration (b) est reproduite avec l'autorisation de la société Gerstel. ....	<b>37</b>
<b>Figure 3-6</b> : Spectre de masse de la triméthylamine, issu de la base de données NIST08, obtenu avec une énergie d'ionisation de 70 eV. ....	<b>39</b>
<b>Figure 3-7</b> : Aromagrammes proposant les signaux olfactifs, classifiés et représentés par intensité, obtenus pour un bar commun altéré. (Leduc, Tournayre, <i>et al.</i> 2012) ....	<b>40</b>
<b>Figure 3-8</b> : Exemples de motifs enregistrés par les capteurs d'un système de nez électronique miniaturisé après l'analyse d'une huile essentielle de cannelle. (Che Harun, Taylor, <i>et al.</i> 2009) .....	<b>41</b>

- Figure 3-9** : Schéma fonctionnel de l'appareil e-mucosa (a) avec une représentation du boîtier de l'appareil (b), du canal de transfert (c) et d'une plaque de capteurs électrochimiques (d). (Che Harun, Covington, *et al.* 2009; Che Harun, Taylor, *et al.* 2009)..... 41
- Figure 3-10** : Réaction de formation d'une base de Schiff en présence d'un groupement carbonyle et d'une amine. .... 47
- Figure 3-11** : Réactions chimiques ayant lieu lors de la dégradation de Strecker (Bouquelet 2008) .. 47
- Figure 4-1** : Représentation schématique de l'organisation génétique du système TMAO réductase de *Shewanella oneidensis* MR-1 (a), *E.coli* (b), *Salmonella enterica* (c) et *Rhodobacter sphaeroides* (d). En bleu sont représentés les gènes de structure et en vert les gènes de régulation. (Dos Santos 1999; Oberto 2008)..... 49
- Figure 4-2** : Profil d'hydrophobicité de la protéine TorC de *S. baltica* obtenu à l'aide de l'outil Protscale (ExpASy) et séquence d'acides aminés de cette même protéine. Les zones surlignées en vert correspondent aux motifs C-X-X-C-H caractéristiques des sites de liaison à l'hème. .... 49
- Figure 4-3** : Représentation schématique de la chaîne de transfert d'électrons des quinones vers TorA (en vert) en passant par TorC (en bleu). (Gon, Giudici-Ortoni, *et al.* 2001) ..... 50
- Figure 4-4** : Représentation Ribbon de la protéine TorA de *S. baltica* réalisée à l'aide de l'outil Swiss-Model (ExpASy). Le cofacteur de l'enzyme est visible dans la zone centrale de la représentation. .... 50
- Figure 4-5** : Représentation des interactions entre les MGD du moco et l'atome de molybdène ainsi que les possibles liaisons faibles permettant de lier la protéine au moco. (Czjzek *et al.* 1998) ..... 50
- Figure 4-6** : Modèle TorD-dépendant de la synthèse, de la maturation cytoplasmique et de translocation de la molybdoenzyme TorA. (Iobbi-Nivol & Leimkühler 2013) ..... 51
- Figure 4-7** : Séquence des 120 premiers acides aminés de la protéine TorA de *S. baltica*. .... 51
- Figure 4-8** : Profil d'hydrophobicité de la protéine TorS de *S. baltica* obtenu à l'aide de l'outil Protscale (ExpASy). .... 52
- Figure 4-9** : Alignements de séquences contenant les boîtes *tor* réalisés avec ClustalW2, provenant de différents organismes. (a) Alignement réalisé pour les séquences contenant les boîtes 1, 2, 3 et 4 en amont du gène *torE* pour *S.oneidiensis* MR-1 et *S. baltica* OS155 et dans l'espace intergénique *torR/torC* de *E.coli*. (b) Alignement réalisé pour les séquences contenant les boîtes 1' et 2' en amont du gène *torR* pour *S.oneidiensis* MR-1, *S. baltica* OS155 et *S.frigidimarina* NCIMB 400. .... 53
- Figure 4-10** : Contexte génétique du gène *torA* pour *Vibrio vulnificus* CMCP-6 obtenu avec le serveur BADGET (Oberto 2008). Les numéros des gènes concernés sont indiqués au centre de chacune des flèches. .... 53
- Figure 4-11** : Identification d'hypothétiques zones de fixation de TorR contenant le motif TTCAT (surligné en vert) au voisinage des gènes structuraux et de régulation du système OTMA réductase pour *V.vulnificus* CMCP-6 (a) et *P.profunda* SS9 (b). La séquence codante du gène en aval est figurée en rouge et celle du gène en amont est figurée en vert le cas échéant. .... 54
- Figure 4-12** : Contexte génétique du gène *torA* pour *Photobacterium profunda* SS9 obtenu avec le serveur BADGET (Oberto 2008). Les numéros des gènes concernés sont indiqués au centre de chacune des flèches. .... 54
- Figure 4-13** : Alignement de 2290 nucléotides provenant de 62 séquences du gène *torA* issues de trois genres bactériens, par la méthode du maximum de vraisemblance en utilisant le modèle de Kimura à deux paramètres. Le pourcentage indiqué représentant la vraisemblance des groupes formés après un test de bootstrap. Avec ■ représentant les *Photobacterium*, ◆ les *Vibrio*, ▲ les *Shewanella* et ○ la souche de *E.coli* servant de groupe externe. La distance indiquée par la barre illustre 10% de différence entre deux séquences.exponentielle, alors que les niveaux en fin de phase de latence et en début de phase stationnaire sont nettement plus faibles. .... 56
- Figure 4-14** : Répartition en fonction des aliments vecteurs, des foyers d'intoxications alimentaires étayés par des preuves tangibles en 2012 au sein de l'union européenne. (EFSA 2014) ..... 58
- Figure 5-1** : Illustration des différents niveaux de données obtenus lors du tracé d'un chromatogramme par une GC/MS. .... 64
- Figure 5-2** : Expression mathématique de la corrélation linéaire entre deux variables x et y mesurées pour n individus. .... 64



<b>Figure 5-3</b> : Expression mathématique de calcul d'une distance euclidienne classique entre deux individus $i$ et $j$ définis par $p$ variables.....	<b>64</b>
<b>Figure 5-4</b> : Représentation schématique de l'établissement des axes $\Delta_1$ et $\Delta_2$ représentatifs de la variabilité d'un nuage de points représenté sur un plan bidimensionnel. ....	<b>65</b>
<b>Figure 5-5</b> : Représentation schématique d'un cercle de corrélation de quatre variables obtenues par une ACP. ....	<b>65</b>
<b>Figure 5-6</b> : Transformations mathématiques permettant de normaliser des données. L'expression (A) peut être utilisée dans le cas de populations agrégatives et l'expression (B) dans le cas de données homogènes à des pourcentages. ....	<b>66</b>
<b>Figure 5-7</b> : Structuration d'un jeu de données $X$ composé de $p$ traitements (ligne verte) pour lesquels $n$ mesures (lignes noires) ont été réalisées. La ligne rouge figure les moyennes par modalités. La valeur $y$ barre correspond à la moyenne générale : la moyenne des moyennes obtenues par modalités. ....	<b>66</b>
<b>Figure 5-8</b> : Composition de la variable à expliquer en fonction du modèle théorique. Avec $\mu$ la moyenne de la population, $\alpha_i$ l'estimateur de l'effet et $\epsilon_{ij}$ l'erreur résiduelle.....	<b>66</b>
<b>Figure 5-9</b> : Décomposition de la variance totale du jeu de données $X$ .....	<b>66</b>
<b>Figure 5-10</b> : Evolution du nombre de séquences présentes dans les banques ADN Genbank(◆) et EMBL(■) en fonction du temps. Les données ont été obtenues en utilisant les fonctions <code>choosebank()</code> et <code>query()</code> du package <code>{seqinr}</code> du logiciel R.....	<b>68</b>
<b>Figure 5-11</b> : Illustration permettant la visualisation des trois opérateurs logiques majeurs. « AND », la partie orangée, « OR », la somme des cercles rouge et jaune et « NOT » la partie bleue. ....	<b>68</b>
<b>Figure 5-12</b> : Alignement de séquences du gène <i>pgsS</i> de différentes souches du genre <i>Bacillus</i> . L'alignement a été réalisé à l'aide de l'algorithme CULSTALW. Les nucléotides marqués d'un signe * sont identiques pour toutes les séquences. ....	<b>69</b>
<b>Figure 5-13</b> : Exemple de résultat obtenu avec le logiciel NRPS primer sur un alignement de séquences du gène <i>torA</i> de <i>Shewanella</i> . ....	<b>69</b>
<b>Figure 6-1</b> : Diagramme illustrant les composantes de la qualité évaluée lors de ce travail de thèse. <b>74</b>	<b>74</b>
<b>Figure 6-2</b> : Formule de calcul de l'écart-type relatif également appelé coefficient de variation (%CV). .....	<b>82</b>
<b>Figure 7-1</b> : Produits PCR obtenus après amplification à des températures d'hybridation allant de 50°C à 64°C d'ADN provenant de quatre souches bactériennes à une concentration finale de 3,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Le cycle d'amplification correspond à une étape initiale de dénaturation de 30s à 95°C, puis 30 cycles composés de trois sous étapes : 30s à 95°C, 30s à la température d'hybridation définie et 30s à 72°C. ....	<b>85</b>
<b>Figure 7-2</b> : Produits PCR obtenus après amplification par le couple de la publication de Duflos, Theraulaz, <i>et al.</i> (2010), d'ADN provenant de cinq souches bactériennes à une concentration finale de 3,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Le cycle d'amplification correspond à une étape initiale de dénaturation de 30s à 94°C, puis 40 cycles composés de trois sous étapes : 30s à 94°C, 30s à 55°C et 45s à 72°C. ....	<b>85</b>
<b>Figure 8-1</b> : Analyses en composantes principales issus d'une étude menée à l'aide d'un nez électronique, lors d'un suivi d'altération de bar commun. (a) ACP issue des données comprenant l'ensemble des composés volatils détectés. (b) ACP issue des données après sélection des composés les plus discriminants .....	<b>98</b>
<b>Tableaux</b>	
<b>Tableau I-I</b> : Système hiérarchique utilisé pour la classification des espèces (exemple du Cabillaud). <b>4</b>	<b>4</b>
<b>Tableau I-II</b> : Différence de dénominations usuelles des poissons en fonction de la zone géographique considérée ou des processus de transformation subis par le poisson (Quéro <i>et al.</i> 1997). ....	<b>5</b>
<b>Tableau I-III</b> : Principaux composants (en pourcentage) des muscles de poisson. (Stansby 1962; Murray & Burt 1969; Love 1980) .....	<b>8</b>
<b>Tableau I-IV</b> : Compositions en eau, lipides et protéines de la chair des principaux poissons retrouvés sur les étals français. Les valeurs correspondent à la part de l'élément par rapport au poids de chair. (Murray & Burt 1969) .....	<b>8</b>

<b>Tableau I-V</b> : Composition moyenne en acides aminés essentiels (en pourcentage) de différentes protéines animales (Huss 1999).....	<b>9</b>
<b>Tableau I-VI</b> : Composition en acides aminés libres des muscles de plusieurs espèces de poissons. Les valeurs affichées correspondent à des milligrammes pour 100 g de chair. Ces données sont issues de plusieurs références : [1] Suyama & Suzuki 1975, [2] Suyama & Yoshizawa 1973 et [3] Konosu <i>et al.</i> 1974.....	<b>11</b>
<b>Tableau I-VII</b> : Teneurs en urée de muscles de plusieurs espèces de poissons appartenant aux élasmobranches et aux téléostéens. Ces données sont issues de plusieurs références : [1] Suyama & Tokuhiro 1954, [2] Suyama & Suzuki 1975 et [3] (Shewan 1951). .....	<b>11</b>
<b>Tableau I-VIII</b> : Principales vitamines liposolubles contenues dans la chair et le foie de plusieurs genres de poisson (Murray & Burt 1969). .....	<b>22</b>
<b>Tableau I-IX</b> : Principales vitamines hydrosolubles contenues dans la chair, les rogues et le foie d'espèces de poissons. Les valeurs donnent des plages de teneurs exprimées en µg/g (Murray & Burt 1969).....	<b>22</b>
<b>Tableau I-X</b> : Teneurs moyennes de quatorze minéraux (en mg/100g) issues de mesures sur plusieurs espèces de poissons. Pour chaque élément, une plage avec les valeurs extrêmes mesurées est proposée (Murray & Burt 1969). .....	<b>22</b>
<b>Tableau I-XI</b> : Flore bactérienne (Gram négatifs et positifs) retrouvée sur du poisson capturé dans des eaux propres et non-polluées (Huss 1999). .....	<b>13</b>
<b>Tableau I-XII</b> : Volumes de production (en millions de tonnes) des pêches mondiales de 2006 à 2011 (FAO, 2012). .....	<b>15</b>
<b>Tableau I-XIII</b> : Dix principaux pays exportateurs et importateurs de poissons en 2010. Les données sont communiquées en valeurs (millions de dollars USD) (FAO, 2012). .....	<b>15</b>
<b>Tableau I-XIV</b> : Evolution du volume de poissons frais produits (en tonnes) sur la période 2007-2012 pour les espèces les plus consommées en France (FranceAgriMer 2013). .....	<b>18</b>
<b>Tableau II-I</b> : Principaux facteurs ayant une influence sur la période écoulée entre la mort du poisson et l'apparition de la rigor mortis (Roth <i>et al.</i> 2006; Iwamoto <i>et al.</i> 1987; Abe & Okuma 1991; Poli <i>et al.</i> 2005; Bjørlykke <i>et al.</i> 2011; Amlacher 1961). .....	<b>20</b>
<b>Tableau II-II</b> : Exemple de molécules jouant le rôle d'inhibiteur ou de cofacteurs pour l'OTMA déméthylase (Sotelo & Rehbein 2000).....	<b>23</b>
<b>Tableau II-III</b> : Récapitulatif des principales activités de la flore microbienne du poisson et de leurs conséquences d'un point de vue sensoriel (Gram & Huss 1996). .....	<b>24</b>
<b>Tableau II-IV</b> : Exemples d'organismes spécifiques d'altération rencontrés pour différentes conditions de conservation de poisson marins des eaux froides ou tempérées (Gram & Huss 1996; Koutsoumanis <i>et al.</i> 1997; Gram & Dalgaard 2002). .....	<b>24</b>
<b>Tableau II-V</b> : Valeurs de l'ABVT (en mg d'azote pour 100g de chair) et du pourcentage P correspondant à la part de TMA dans l'ABVT pour les espèces de poissons à chair blanche telles que le bar commun, la dorade royale ou le sébaste émis par le CNERNA-CNRS (Ifremer 2008a). .....	<b>27</b>
<b>Tableau II-VI</b> : Critères microbiologiques applicables aux produits de la pêche d'après les règlements CE 2073/2005 et CE 1441/2007. .....	<b>30</b>
<b>Tableau II-VII</b> : Critères microbiologiques recommandés par la fédération des entreprises du commerce et de la distribution (FCD) pour les produits à base de poissons frais ou transformés.....	<b>30</b>
<b>Tableau III-I</b> : Exemples de phases stationnaires de colonnes capillaires avec le type de polarité correspondant et des applications suggérées par des catalogues commerciaux.....	<b>39</b>
<b>Tableau III-II</b> : Exemples de seuils olfactifs humains pour certaines molécules retrouvées lors de l'altération du poisson ainsi que leurs valeurs limites d'exposition respectives dans l'atmosphère des lieux de travail.(Falcy & Malard 2005) .....	<b>40</b>
<b>Tableau III-III</b> : Exemples d'aldéhydes retrouvés dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Pour chacuns des aldéhydes les odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que les voies de synthèse supposées.....	<b>82</b>

<b>Tableau III-IV</b> : Exemples de cétones retrouvées dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Pour chacune des cétones les odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que les voies de synthèse supposées.....	<b>43</b>
<b>Tableau III-V</b> : Exemples d'alcools retrouvés dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Pour chacun des alcools, les odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que les voies de synthèse supposées.....	<b>44</b>
<b>Tableau III-VI</b> : Exemples de composés soufrés et azotés retrouvés dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Pour chacun des composés, les odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que les voies de synthèse supposées. ....	<b>45</b>
<b>Tableau III-VII</b> : Exemples de composés secondaires retrouvés dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Les composés sont classés par familles chimiques, leurs odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que leurs voies de synthèse supposées. ....	<b>46</b>
<b>Tableau III-VIII</b> : Douzes composés phénoliques issus de la fumée participant à l'odeur global de fumé dans du saumon fumé au bois de hêtre (Varlet <i>et al.</i> 2006). Les odeurs caractéristiques et l'origine supposée de ces composés sont également renseignées .....	<b>46</b>
<b>Tableau IV-I</b> : Similarités observées entre les séquences du gène <i>torA</i> de trois genres bactériens après alignement à l'aide de ClustalW2. ....	<b>55</b>
<b>Tableau IV-II</b> : Liste recensant quelques constituants pouvant jouer le rôle d'inhibiteurs pour la réaction PCR d'après le travail de Rossen <i>et al.</i> (1992). Les données sont communiquées dans le cadre d'une PCR réalisée pour un volume final de 100 µL.....	<b>57</b>
<b>Tableau IV-III</b> : Nombre de foyers d'intoxications alimentaires et de cas reportés au sein de l'union européenne en 2012. Le tableau recense uniquement les foyers étayés par des preuves tangibles. (EFSA 2014).....	<b>58</b>
<b>Tableau IV-IV</b> : Exemples d'applications, non-exhaustives, de méthodes de PCR quantitative pour la détection/quantification de microorganismes pathogènes issus de diverses matrices alimentaires. ...	<b>59</b>
<b>Tableau IV-V</b> : Exemples d'applications, non-exhaustives, de méthodes de PCR quantitative pour la détection/quantification de <i>Vibrio</i> pathogènes et de flores histaminogènes issus de produits de la pêche.....	<b>61</b>
<b>Tableau IV-VI</b> : Exemples d'application, non-exhaustives, de méthodes de PCR quantitative pour l'évaluation de flores spécifiques d'altération de diverses matrices alimentaires .....	<b>62</b>
<b>Tableau V-I</b> : Tableau de résultats concernant les valeurs propres obtenues lors de la réalisation d'une ACP à l'aide du logiciel Tanagra (Rakotomalala 2005). ....	<b>65</b>
<b>Tableau V-II</b> : Nombre d'items retrouvés en fonction de quatre requêtes formulées dans Genbank. Les valeurs de champs entrées par l'opérateur sont affichées en bleu et les champs consultés en rouge.	<b>68</b>
<b>Tableau V-III</b> : Codes des bases dégénérées au sens de l'IUPAC .....	<b>70</b>
<b>Tableau V-IV</b> : Exemples de structures secondaires formées par un ou deux oligonucléotides .....	<b>72</b>
<b>Tableau VI-I</b> : Résultats d'identification des quatre souches de <i>S. baltica</i> par analyse en MALDI-TOF .....	<b>83</b>
<b>Tableau VI-II</b> : Résultats de validation croisée d'identification des souches. ....	<b>83</b>
<b>Tableau VII-I</b> : Amorces sens et anti-sens sélectionnées à l'issue de la première approche de dessin d'amorces amplifiant le gène <i>torA</i> chez <i>Shewanella</i> , <i>Vibrio</i> et <i>Photobacterium</i> . ....	<b>85</b>
<b>Tableau VIII-I</b> : Résultats de l'estimation du score QIM de poissons fournis en aveugle .....	<b>98</b>

---

## Table des Abréviations

### A

**A** : Adénine  
**ABVP** : d'Azote basique volatil partiel  
**ABVT** : Azote basique volatil total  
**AGL** : Acides gras libres  
**AGMI** : Acides gras monoinsaturés  
**AGPI** : Acides gras polyinsaturés  
**AJR** : Apports journaliers recommandés  
**AMP** : Adénosine monophosphate  
**ANP** : Azote non protéique  
**AQI** : Artificial quality index  
**ARN** : Acide ribonucléique

### B

**BADGET** : Bacterial and archeal gene exploration tool  
**BLAST** : Basic local alignment search tool  
**BTEX** : Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylène

### C

**C** : Cytosine  
**Cad** : Cadavérine  
**CAR** : Carboxène  
**CM<sub>M</sub>** : Carré moyen du modèle  
**CM<sub>R</sub>** : Carré moyen résiduel  
**Cq** : Cycle quantification  
**CTAB** : Cetyltriméthylammoniumbromide

### D

**DMA** : Diméthylamine  
**DMSO** : Dimethyl sulfoxide  
**DTR** : DMA on TMA ratio  
**DVB** : Divinylbenzène

### E

**EMA** : Ethidium bromide monoazide

### G

**G** : Guanine  
**GC** : Gaz chromatography  
**GTP** : Guanosine triphosphate

### H

**hab** : habitant  
**Hist** : Histamine  
**Hx** : Hypoxanthine  
**HxR** : Inosine  
**HyC** : Coefficient of hybridization

### I

**IAC** : Internal amplification control  
**IMP** : Inosine monophosphate  
**INSDC** : International nucleotide sequence database collaboration  
**IUPAC** : International union of pure and applied chemistry

### L

**LRI** : Linear retention indices  
**LSD** : Leastsignificant difference

### M

**m/z** : rapport masse sur charge  
**MAP** : Modified-atmosphere packed  
**Meth** : Méthylamine  
**MGD** : Molybdopterin guanine dinucleotide  
**moco** : Molybdenum cofactor  
**Mo-MPT** : Molybdenum-molybdopterin  
**MOS** : Metal oxide sensors  
**MPN** : Most probable number  
**MS** : Mass spectrometry  
**mV** : Millivolt

### N

**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide  
**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**NIA** : Non inclus ailleurs

### O

**OTMA** : Oxyde de triméthylamine

### P

**PC** : Phosphatidyl-choline  
**PDMS** : Polydiméthylsiloxane  
**PE** : Phosphatidyl-éthanolamine  
**PI** : Phosphatidyl-inositol  
**PLS** : Partial least square  
**ppm** : Partie par million (mg/kg)  
**Put** : Putrésine  
**PVB-N** : Partial volatile basic nitrogen

### Q

**QIM** : Quality index method  
**q-PCR** : Quantitative polymerase chain reaction

### R

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

### S

**SDS** : Sodium dodecyl sulfate  
**SIM** : Single ion monitoring  
**Spd** : Spermidine  
**Spm** : Spermine  
**SPME** : Solid phase microextraction  
**SSOs** : Specific spoilage organisms

### T

**T** : Thymine  
**Tat** : Twin-arginine translocation  
**TCA** : Trichloroacetic-acid  
**TIC** : Total ion chromatogram  
**TMA** : Triméthylamine  
**TMAO** : Triméthylamine N-oxide  
**Trp** : Tryptamine  
**TSA-YE** : Tryptone soya agar - yeast extract  
**TVB-N** : Total basic volatile nitrogen  
**TVC** : Total viable count  
**Tyra** : Tyramine

### U

**UFC** : Unité formant colonie  
**USD** : Dollar des États-Unis

---

## Introduction

La consommation de poisson n'a cessé d'augmenter à travers le monde et les projections actuelles planifient une augmentation moyenne de 16% d'ici à l'horizon 2020, soit une consommation moyenne de 20 kg par habitant et par an.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cet attrait pour l'aliment poisson, une première cause est le développement de l'aquaculture qui contribuera à hauteur de 50% de la production totale en 2018. L'aquaculture est un pilier de la sécurité alimentaire, via l'assurance de l'accès à une ressource disponible et relativement stable, quand la pêche de capture est de plus en plus soumise à la diminution des ressources remettant en cause la stabilité des approvisionnements et la disponibilité de certaines espèces.

Un second facteur fait l'attrait du consommateur pour cet aliment, il s'agit de la notion de qualité inhérente à ce produit. Le poisson véhicule l'image d'un aliment bon pour la santé, de par sa valeur nutritionnelle : riche en acides gras polyinsaturés, faibles teneurs en matières grasses pour certains poissons ou présence de protéines riches en acides aminés essentiels. Ces propriétés sont tout de même à relativiser compte tenu de risques attendant à la consommation de poisson. A ce sujet l'Anses a émis une recommandation de limiter sa consommation à deux repas par semaine dont un à base de poisson gras. Les risques attendants sont principalement dus à la présence de dioxines, de PCB et de métaux lourds au sein de la chair des poissons. A l'heure de la rédaction de ce manuscrit, un dernier risque émergent est décrit : celui de la présence de microplastiques dans les organismes marins.

La qualité du poisson est avant tout évaluée par le consommateur en se basant sur sa fraîcheur. En effet un poisson frais, en opposition à un poisson altéré, est un produit généralement « bon et sain ». L'altération du poisson, dès la mort de l'individu, est le résultat de plusieurs mécanismes chimiques et biologiques ; comprenant une première phase d'autolyse fruit de l'action d'enzymes endogènes et de l'autoxydation des lipides et une seconde phase de dégradation des tissus par l'action de la flore d'altération. Les différents processus de dégradations de la chair ont fait l'objet de développements méthodologiques pour l'évaluation de l'altération, grâce notamment à des méthodes physiques, chimiques, microbiologiques et sensorielles.

L'évaluation de la fraîcheur, rapide et objective de surcroît, est donc un enjeu majeur dans le domaine de la pêche de façon à fournir au consommateur un produit attrayant, pourvu de bonnes propriétés nutritionnelles et proposant une qualité sanitaire irréprochable. C'est dans ce cadre que s'est inscrit ce travail de thèse dont le but était l'évaluation de la qualité-fraîcheur du poisson par des approches biochimiques (SPME-GC-MS) et moléculaires (qPCR).

Un premier volet de ce mémoire proposera une synthèse bibliographique. Celle-ci servira de support à la présentation de données concernant la biologie du poisson et ses

spécificités, ainsi qu'un état des lieux des ressources halieutiques et de la consommation du poisson ([Chapitre 1](#)). Un second chapitre s'intéressera à l'évolution post-mortem de la chair du poisson et aux différents outils développés pour l'évaluation de l'altération ([Chapitre 2](#)). Un troisième développement se focalisera particulièrement sur l'étude des composés volatils notamment ceux issus du poisson ([Chapitre 3](#)). Le chapitre suivant présentera le gène *torA* porté par la flore d'altération du poisson et s'intéressera à l'utilisation de la PCR pour la détection de microorganismes dans les aliments ([Chapitre 4](#)). Enfin un dernier développement sera consacré à l'apport de l'outil informatique et de la statistique dans l'analyse et le traitement des données ([Chapitre 5](#)).

Dans un second volet, ce mémoire présentera les principaux résultats issus de ce travail de thèse. Une première partie présentera les principales investigations menées concernant les causes microbiologiques de l'altération du poisson. Une première approche a permis d'isoler des souches de *Shewanella baltica* au sein d'un poisson altéré ([Partie I - Chapitre 1](#)), un travail de caractérisation et d'identification des souches a été mené conduisant à se poser des questions sur la pertinence de certains outils de microbiologie existants pour l'étude de la flore d'altération. Une seconde approche s'est intéressée au développement d'un outil d'évaluation du risque d'altération d'un poisson en ciblant le gène *torA* porté par la flore spécifique d'altération ([Partie I - Chapitre 2](#)). Cette méthode a fait l'objet d'une application lors d'un suivi d'altération de filets de merlan qui sera également présenté. Une seconde partie des travaux s'est intéressée aux conséquences de l'autolyse et de l'activité de la flore spécifique d'altération, conduisant à la production de composés volatils. Pour ce faire, une méthode de quantification de l'azote basique volatil partiel, composé de la triméthylamine et de la diméthylamine, par SPME-GC-MS a été développée ([Partie II](#)). Cette méthodologie a également fait l'objet d'une application lors d'un suivi d'altération de filets de cabillaud. Une troisième partie, essentiellement applicative, sera consacrée à la caractérisation de la qualité du poisson *lato sensu*. Au sein de ce développement, sera présentée une étude portant sur l'évolution d'amines biogènes et de composés volatils lors de la conservation d'anchois transformés dans le but d'estimer la durée de vie de tels produits ([Partie III](#)). A l'issue des conclusions et perspectives de ces travaux de thèse, une dernière partie présentera succinctement les différentes valorisations des travaux.

---

## **Synthèse bibliographique**

Tableau I-I : Système hiérarchique utilisé pour la classification des espèces (exemple du Cabillaud).

<b>Nom des classes</b>	<b>Exemple</b>
Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Chordata</i>
Sous-embranchement	<i>Vertebrata</i>
Super-classe	<i>Osteichthyes</i>
Classe	<i>Actinopterygii</i>
Sous-classe	<i>Neopterygii</i>
Infra-classe	<i>Teleostei</i>
Super-ordre	<i>Paracanthopterygii</i>
Ordre	<i>Gadiformes</i>
Famille	<i>Gadidae</i>
Sous-famille	<i>Gadinae</i>
Genre	<i>Gadus</i>
Espèce	<i>morhua</i>



---

## Chapitre 1. Spécificités du poisson et ressources halieutiques en lien avec la qualité

Du point de vue étymologique, le mot poisson tire son origine du latin *piscis* et des termes de vieux français *peis* et *pois*. Comme indiqué par l'Académie Française (2013a), un poisson est défini comme un « *Vertébré aquatique à respiration branchiale qui possède des nageoires paires et une bouche pourvue de mâchoire* ». De cette définition, se dessine une première imprécision : un poisson n'est pas forcément pourvu de mâchoire et de nageoires paires, en effet parmi les poissons, sont retrouvées les lamproies qui ne possèdent ni mâchoire, ni nageoires paires. Il convient tout de même de noter qu'aujourd'hui encore, l'appartenance de la super-classe des *Agnatha* aux poissons est contestée.

Avant d'aborder l'aspect halieutique à proprement parler, il convient dans un premier temps de revenir à l'essence des sciences de la vie et de bien décrire et identifier la matrice qui sera le fondement de ce travail.

### I. Systèmes de classification des poissons

Les premiers poissons sont apparus vers la fin du Cambrien, début de l'Ordovicien, il y a près de 500 millions d'années (Bockelie & Fortey 1976; Smith *et al.* 1996). De nos jours, les derniers recensements font état de près de 28 000 espèces de poissons soit près de la moitié des espèces de vertébrés (Eastman 2005; Nelson 2006). Parmi l'ensemble de ces espèces de poissons, 57% sont des espèces marines (Nelson 2006). Plusieurs méthodes de classification peuvent être utilisées.

Une première approche de classification se base sur l'évolution et l'approche développée par la taxonomie qui «  *vise à nommer et classifier les êtres vivants* » en définissant et décrivant leurs caractéristiques (Campbell & Reece 2004). En ichtyologie, outre le reflet de l'extrême diversité des super-ordres au sein des poissons (Huss 1999), la taxonomie permet avant tout la discrimination en deux infra-classes : les poissons osseux (*Osteichthyes*) et les poissons cartilagineux (*Chondrichthyes*). En second lieu, la taxonomie permet de classer les différents poissons sur dix niveaux successifs (Tableau I-I) de la super-classe à l'espèce. C'est généralement les deux derniers niveaux, genre et espèce, qui sont utilisés pour décrire les organismes, formant leurs noms binomiaux, celui du cabillaud est ainsi *Gadus morhua*.

La taxonomie est la référence pour toute classification scientifique, elle est peu utilisée par les professionnels du monde de la pêche, qui lui ont substitué des noms d'usage. Les différents systèmes de classifications communément utilisés dans le monde halieutique seront détaillés ci-dessous.

#### 1. Utilisation des noms vernaculaires

Le nom vernaculaire est défini par le Larousse comme le «  *nom usuel d'une espèce animale ou végétale dans son pays d'origine* », il s'agit donc du nom commun. Cette dénomi-

Tableau I-II : Différence de dénominations usuelles des poissons en fonction de la zone géographique considérée ou des processus de transformation subis par le poisson (Quéro *et al.* 1997).

<b>Différence en fonction du pays d'origine</b>	
Lieu noir (France)	Goberge (Canada)
<b>Différence en fonction de la région d'origine</b>	
Lieu noir	Colin (Bretagne, Normandie)
Bar commun	Loup (Méditerranée)
Lingue franche	Morue lingue (Manche) Julienne (Atlantique)
<b>Différence en fonction du processus de transformation</b>	
Cabillaud (Frais)	Morue (Salé)
Eglefin (Frais)	Haddock (Fumé)
Baudroie (Poisson entier)	Lotte (Poisson étêté)

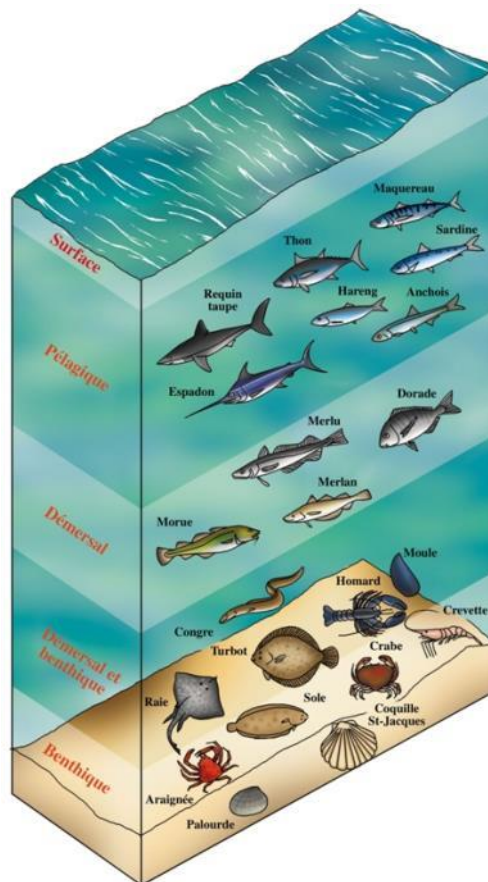


Figure 1-1 : Classification des espèces de poissons selon les profondeurs dans lesquelles elles évoluent. (Ifremer 2011)

nation concerne plus qu'une simple différenciation entre pays, puisque des différences sont également observées entre les régions d'un pays, ou encore, en fonction du procédé de transformation utilisé comme le prouvent les exemples du [Tableau I-II](#). Très vite se dessinent donc les limites de l'utilisation des noms vernaculaires dans le domaine halieutique.

## **2. Classification selon le lieu de vie**

Un type de classification utilisé consiste à séparer les espèces de poissons en se basant selon leurs lieux de vie ([figure 1-1](#)). Trois types de classes sont alors définis : poissons démersaux, pélagiques et amphihalins ([Ifremer 2011](#)).

Les poissons démersaux sont définis comme évoluant en profondeur, ils sont séparés en deux sous-classes : les espèces benthiques, comme la sole commune (*Solea solea*) ou la plie (*Pleuronectes platessa*) et les espèces d'eau profonde comme le cabillaud ou le rouget grondin (*Lepidotrigla cadmani*).

Les poissons pélagiques sont des espèces évoluant généralement en bancs, en surface ou dans des eaux peu profondes. Certains individus solitaires peuvent tout de même être observés. Parmi les espèces pélagiques, sont notamment retrouvés les thons blancs (*Thunnus alalunga*), les sardines (*Sardina pilchardus*) ou encore les harengs (*Clupea harengus*).

Le terme amphihalin, adjectif composé des racines grecques *amphi* « à la fois » et *halos* « mer / salé », désigne les espèces évoluant à la fois en eau de mer et en eau douce. Cette classe regroupe les espèces migratrices qui changent d'environnement pour aller frayer, c'est le cas pour le saumon atlantique (*Salmo salar*) retournant frayer dans les cours d'eau douce et pour les anguilles (*Anguilla anguilla*) partant frayer en mer.

## **3. Classification selon des caractéristiques biologiques**

Un dernier type de classification existant consiste à différencier les poissons maigres et gras. Cette différenciation se fait principalement sur des différences physiologiques de stockage des graisses. Les poissons maigres sont caractérisés par un stockage des lipides au sein du foie, quand les poissons gras stockent les graisses dans leurs tissus. Cette classification est reliée à celle décrite dans le paragraphe précédent, en effet, les espèces pélagiques sont en grande majorité des poissons gras quand les espèces démersales sont plutôt classées comme des poissons maigres.

Ce dernier paragraphe permet de faire le lien avec le développement suivant. En effet, la biologie du poisson possède plusieurs caractéristiques permettant de mieux comprendre la spécificité du poisson au sein du règne animal.

## **II. Spécificités biologiques du poisson pouvant influencer la qualité**

Cette partie s'attachera à rappeler des données générales de la biologie du poisson en soulignant les particularités et en indiquant le cas échéant les impacts directs sur l'industrie de la transformation du poisson.

### **1. Des modes de vie distincts reflétés par des muscles différents**

La structure anatomique du muscle de poisson est différente de celle rencontrée chez les mammifères. En effet, il n'existe pas de tendons chez les poissons, qui assurent chez les mammifères un lien mécanique entre les fibres musculaires et le squelette. Cette liaison est assurée par des assises de collagène chez le poisson (Helfman *et al.* 1997). Le muscle de poisson, ou filet, est composé d'un réseau de cellules musculaires, les myotomes ou myomères, disposées de façon parallèle et reliées les unes aux autres par un tissu conjonctif appelé myocomme ou myosepte (Collignon *et al.* 1984). Les cellules musculaires s'étendent sur toute la partie située entre deux myocommes, et ce, parallèlement à l'axe antéropostérieur du poisson (Huss 1999). La structuration des fibres musculaires et du tissu conjonctif revêt un intérêt dans la qualité du poisson, car durant la phase d'altération, les fibres musculaires vont se désolidariser de l'assise conjonctive et créer des phénomènes de « gaping » ou « bâillement » (Borderias & Sanchez-Alonso 2011; Roth *et al.* 2006).

En observant les filets des poissons, il est remarqué qu'une part importante est constituée d'un muscle blanc, translucide. Cependant selon les espèces étudiées un second type de tissu musculaire peut être observé. Cet autre muscle, d'aspect foncé, est communément appelé « muscle rouge ». Ce tissu est en position sous-cutanée sur la longueur du flanc du poisson. La proportion muscle rouge sur muscle blanc varie en fonction des espèces et de l'activité des poissons. Ainsi, pour les espèces pélagiques comme le hareng qui se meuvent de façon quasi constante, la part de muscle rouge peut atteindre 48% du poids total de l'individu (Love 1980). En revanche, pour les espèces démersales ayant des déplacements périodiques, la part de muscle rouge est très faible. Muscles rouges et blancs sont très différents d'un point de vue biochimique et métabolique, les premiers sont notamment plus riches en lipides et en myoglobine en regard des seconds.

Ces différences biochimiques ne sont d'ailleurs pas sans conséquence sur l'évolution du muscle en phase post-mortem. La forte teneur en lipides entraîne des phénomènes d'oxydation et un problème de rancissement (Medina *et al.* 2009). Les muscles blancs et rouges ne font pas appel aux mêmes sources de régénération d'ATP pour la production d'énergie. Le muscle blanc tire majoritairement son énergie du glycogène, produisant par anaérobiose des quantités importantes d'acide lactique qui sont métabolisées en phase ultime au niveau du foie. Pour le muscle rouge, ce sont les lipides qui servent de réserves d'énergie. En outre, la présence d'un nombre important de mitochondries dans ces tissus va favoriser un métabolisme aérobie à l'origine de la production d'eau et de dioxyde de carbone. Ainsi, le muscle blanc est plutôt approprié à un effort bref et intense des espèces démersales, quand le muscle rouge est lui adapté aux efforts continus et de faible intensité des espèces pélagiques.

## **2. Importance de la croissance et reproduction**

Chez les poissons les notions de croissance et de reproduction ne peuvent être dissociées puisque la maturité sexuelle est directement liée au franchissement d'une taille caractéristique.

D'un point de vue physiologique, la croissance du muscle du poisson est le résultat d'une augmentation de la taille des cellules (Huss 1999) et du recrutement de nouvelles fibres musculaires (Johnston 1999). La croissance du poisson est réalisée sous le contrôle de facteurs endogènes : régulation par les systèmes nerveux et endocriniens puis exogènes comme la température, la photopériode ou encore la salinité de l'eau (Bœuf & Payan 2001).

L'avènement de la maturité sexuelle marque l'amorce d'une chute importante de la croissance du poisson, l'activité du métabolisme basculant vers la production des gonades. Ce paramètre, couplé à l'existence d'un dimorphisme sexuel chez de nombreuses espèces de poissons, va avoir un impact important notamment en pisciculture. Par exemple chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), un sexage est réalisé afin d'obtenir des populations de poissons femelles, qui atteignent la maturité sexuelle plus tardivement que les mâles (Kause *et al.* 2003). D'autres élevages privilégient les poissons femelles pour des raisons économiques, autres que la taille des animaux, comme la valorisation des œufs dans le cas des esturgeons (*Acipenser sturio*). Enfin, pour d'autres espèces, il est plus intéressant de privilégier l'élevage de mâles ; c'est le cas du tilapia (*Tilapia* sp.) pour lequel la croissance des mâles est beaucoup plus rapide que celle des femelles (Kestemont *et al.* 1989). De nombreuses pratiques aquacoles visent à optimiser la croissance des poissons comme l'utilisation d'animaux triploïdes et de dispositifs de lumière artificielle influant sur les taux de maturation sexuelle (Glebe 2012).

De façon générale la période de frai ainsi que les saisons influent sur les teneurs en lipides, protéines et la composition en eau du muscle. Ces périodes sont éprouvantes pour les organismes et influencent la qualité des poissons.

## **3. Composition chimique du poisson**

La composition chimique est un paramètre qui varie fortement chez les poissons, aucune donnée fixe ne pourra être fournie dans ce développement. Outre l'espèce, de nombreux facteurs peuvent influencer cette composition comme l'âge, l'environnement, la saison, le sexe de l'individu, ou encore l'alimentation qui sera abordée dans un premier paragraphe.

### **a. Importance du régime alimentaire**

La classification retient quatre grands régimes alimentaires chez les poissons : herbivores, détritivores, omnivores et carnivores.

Les herbivores, comme la carpe chinoise (*Ctenopharyngodon idella*) ou certaines espèces de tilapia, se nourrissent exclusivement de végétaux et débris végétaux. Les détritivores mangent des organismes en décomposition s'est notamment le cas du silure (*Silurus glanis*). Les poissons omnivores, comme la carpe commune (*Cyprinus carpio*) et les cheves-

Tableau I-III : Principaux composants (en pourcentage) des muscles de poisson. (Stansby 1962; Murray & Burt 1969; Love 1980)

Constituants	Poisson (filets)		
	Minimum	Intervalle moyen	Maximum
Protéines	6	16-21	28
Lipides	0,2	0,2-25	64
Hydrates de carbone		< 0,5	2
Cendres	0,4	1,2-1,5	1,5
Eau	28	66-81	90

Tableau I-IV : Compositions en eau, lipides et protéines de la chair des principaux poissons retrouvés sur les états français. Les valeurs correspondent à la part de l'élément par rapport au poids de chair. (Murray & Burt 1969)

Espèces	Noms scientifiques	Eau (%)	Lipides (%)	Protéines (%)
Merlan	<i>Gadus merlangus</i>	80	0,2 - 0,6	16,4 - 19,0
Cabillaud	<i>Gadus morhua</i>	78 - 83	0,1 - 0,9	15,0 - 19,0
Limande	<i>Limanda limanda</i>	79	0,5 - 1,2	12,8 - 18,2
Eglefin	<i>Gadus aeglefinus</i>	79 - 84	0,1 - 0,6	14,6 - 20,3
Colin	<i>Merluccius merluccius</i>	80	0,4 - 1,0	17,8 - 18,6
Lingue	<i>Molva molva</i>	78	0,1 - 0,4	19,5 - 22,2
Sole	<i>Solea solea</i>	78	1,8	18,8
Plie	<i>Pleuronectes platessa</i>	81	1,1 - 3,6	15,7 - 17,8
Thon	<i>Thunnus sp.</i>	71	1 - 4	25,2
Bar	<i>Morone labrax</i>	77	2,5	19,3
Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>	78	2,1 - 3,9	16,8 - 20,6
Truite	<i>Salmo trutta</i>	70 - 79	1,2 - 10,8	18,8 - 19,1
Saumon	<i>Salmo salar</i>	67 - 77	0,3 - 14,0	21,5
Hareng	<i>Clupea harengus</i>	60 - 80	0,4 - 22,0	16,0 - 19,0
Maquereau	<i>Scomber scombrus</i>	60 - 74	1,0 - 23,5	16 - 20

nes (*Squalius salar*), possèdent une alimentation mixte d'origine animale et végétale. Enfin, le régime carnivore est retrouvé chez de nombreux de poissons marins, ils se nourrissent d'autres poissons ou d'invertébrés. Bar commun (*Dicentrarchus labrax*) et saumon sont des exemples d'espèces carnivores.

La classification présentée précédemment est à relativiser, en effet il n'existe pas de réel cloisonnement du régime alimentaire, une majorité d'espèces a un régime omnivore selon le principe que « le poisson mange ce qu'il trouve ». De même, le type d'alimentation peut varier au cours de la vie de certains poissons entre les stades larvaires et adultes.

La majorité des espèces issues de l'aquaculture sont herbivores, plus de 50% du tonnage de l'aquaculture mondiale correspondaient aux carpes en 2010 (FAO 2012). De façon générale, l'aquaculture traditionnelle s'est orientée vers des espèces herbivores ou détritivores généralement d'eau douce. L'aquaculture occidentale s'intéresse plutôt aux espèces carnivores comme le saumon, le bar, la dorade (*Sparus aurata*) ou le turbot (*Scophthalmus maximus*). Cette aquaculture fait face à plusieurs défis concernant les apports protéiques adéquats pour les poissons (Hardy 1996; Nordgarden *et al.* 2003). Des études ont permis de répondre à ces défis en modifiant le régime alimentaire de truites arc-en-ciel devenues herbivores en élevage (Le Boucher *et al.* 2012).

Les modes de productions de poisson qui viennent d'être décrits vont directement influencer la composition chimique des poissons et donc l'évolution de sa qualité à plus long terme comme cela a pu être montré sur la dorade d'élevage (Alasalvar *et al.* 2005; Grigorakis *et al.* 2003). La question peut également être posée suite à la modification du régime alimentaire des poissons.

#### **b. Des lipides caractéristiques**

Comme le montre le [Tableau I-III](#), les lipides comptent parmi les molécules les plus présentes dans la chair du poisson. Il existe des disparités importantes, avec des quantités moyennes généralement comprises entre 1 et 25% ([Tableau I-IV](#)) et des extrêmes allant de 0,1 à 64% (Stansby 1962). Outre l'alimentation, ces fluctuations sont notamment soumises à des paramètres comme la taille de l'individu, son âge, la saison ou encore la zone géographique de la capture. Néanmoins, les poissons sont habituellement répartis en trois classes en fonction de la part de lipides dans le poids total :

- Poissons gras : taux de lipides supérieur à 5% (hareng, sardine, saumon).
- Poissons semi-gras : taux de lipides compris entre 1 et 5% (bar, plie, turbot).
- Poissons maigres : taux de lipides inférieur à 1% (cabillaud, sole, tacaud).

La chair de poisson est caractérisée par des teneurs en acides gras polyinsaturés (AGPI) et monoinsaturés (AGMI) plus importantes au regard de la chair des animaux terrestres. Les AGPI des poissons présentent un nombre d'insaturations élevé, de quatre à six pour plus de 80% des AGPI, contre deux insaturations en moyenne chez les mammifères. Ainsi en alimentation humaine, les acides gras de la série des omégas 3 (n-3) sont apportés

Tableau I-V : Composition moyenne en acides aminés essentiels (en pourcentage) de différentes protéines animales (Huss 1999).

Acides Aminés	Poisson	Lait	Bœuf	Œuf
Lysine	8,8	8,1	9,3	6,8
Tryptophane	1,0	1,6	1,1	1,9
Histidine	2,0	2,6	3,8	2,2
Phénylalanine	3,9	5,3	4,5	5,4
Leucine	8,4	10,2	8,2	8,4
Isoleucine	6,0	7,2	5,2	7,1
Thréonine	4,6	4,4	4,2	5,5
Méthionine-Cystéine	4,0	4,3	2,9	3,3
Valine	6,0	7,6	5,0	8,1



en grande partie par la consommation de poissons (Tocher 2003). Les acides gras principaux dans la chair de poisson sont, pour les omégas 3, l'acide éicosapentaénoïque et l'acide  $\alpha$ -linoléique. Concernant les omégas 6 (n-6), il s'agit de l'acide arachidonique (C20 : 4 n-6) ainsi que de son précurseur l'acide linoléique. Les acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique sont qualifiés d'essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés *de novo*, ils proviennent uniquement de l'alimentation des poissons. Les lipides jouent donc un rôle double en ce qui concerne la qualité des poissons : qualité nutritionnelles et organoleptiques via les produits de dégradation.

Les acides gras sont retrouvés sous diverses formes au sein du poisson. Les acides gras libres (AGL) issus de la digestion circulent dans le système lymphatique (Sheridan *et al.* 1985) et le système sanguin pour être acheminés au foie. Les acides gras peuvent également être sous forme de triglycérides, des molécules de réserves. Ceux-ci sont surtout présents au niveau des tissus adipeux, comme le foie, de la région sous-cutanée et de la paroi abdominale des poissons. C'est sous cette forme qu'est stockée l'énergie des muscles rouges (Huss 1999). Les AGL participent également à l'élaboration de molécules de structure, les phosphoglycérides. Il s'agit de molécules amphiphiles composées d'un noyau glycérol estérifié à deux AGL et d'un résidu phosphate comprenant la choline, l'éthanolamine, la sérine ou l'inositol. DHA et EPA sont les AGPI majeurs retrouvés au sein des phosphoglycérides du poisson (Tocher & Harvie 1988). Pour les poissons maigres, les phospholipides majoritaires sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) représentant respectivement 69% et 19% des phospholipides (Huss 1999). D'autres lipides sont rencontrés au sein de la chair de poissons comme les cériques dans les huiles de poisson et provenant de l'alimentation des poissons, les sphingolipides qui jouent un rôle de communication et reconnaissance cellulaire et enfin le cholestérol impliqué dans la fluidité membranaire (Tocher 2003; Voet & Voet 2005; Weinman & Méhul 2004).

Des variations saisonnières importantes des teneurs en lipides des muscles, de la peau et de la tête sont enregistrées (Lohne 1976). Ces changements sont susceptibles d'impacter directement les qualités organoleptiques des filets.

### c. Trois grandes classes de protéines

Représentant en moyenne 15% de la masse totale du filet (Tableau I-III), les protéines constituent la troisième famille de molécules après l'eau et les lipides au sein du muscle des poissons. Les protéines du poisson renferment la totalité des acides aminés essentiels (Tableau I-V) qui possèdent une haute valeur nutritionnelle.

Les protéines sont regroupées en trois grandes classes (Mackie 1997), avec par ordre d'importance : les protéines structurelles, sarcoplasmiques et du tissu conjonctif.

Les protéines structurelles sont celles intervenant dans les mécanismes de contraction cellulaire comme l'actine ou la myosine. Elles représentent jusqu'à 80% de la fraction protéique totale. Les industriels, en maîtrisant ces conditions, ont su tirer profit de ces pro-

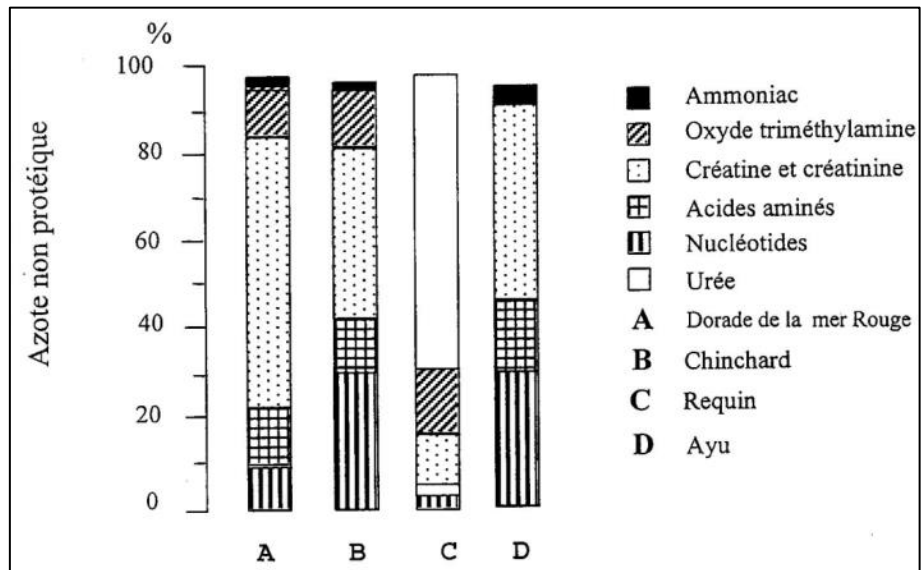


Figure 1-2 : Proportion de six molécules appartenant à l'azote non-protéique dans les muscles de deux poissons téléostéens marins (A et B), d'un sélacien (C) et d'un poisson téléostéen d'eau douce (D). (Suyama *et al.* 1977; Konosu & Yamaguchi 1982)

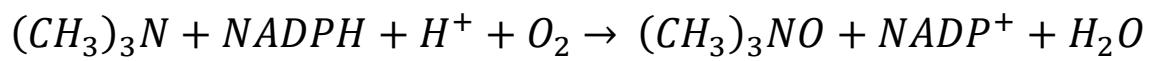


Figure 1-3 : Equation chimique de l'oxydation de la triméthylamine par action d'une monooxydase NADPH dépendante (Agustsson & Strøm 1981).

propriétés texturantes des protéines structurelles à des fins technologiques, comme pour l'élaboration de bâtonnets de surimi (Kanda *et al.* 1993).

Les protéines sarcoplasmiques comprennent l'ensemble des protéines retrouvées au sein du cytoplasme des cellules et des fluides physiologiques, elles représentent 20 à 30% de la composition totale en protéines. Pendant longtemps, les profils électrophorétiques des protéines solubles dans l'eau ont permis d'identifier les espèces de poisson (Mackie 1980), désormais les techniques moléculaires, plus rapides, sont plébiscitées (Teletchea 2009).

Les protéines du tissu conjonctif constituent la dernière classe de protéines, il s'agit de molécules de collagènes et correspondent à 3% de la part protéique totale chez les téléostéens et 10% chez les sélaciens (Huss 1999). Ces protéines sont organisées en réseaux de microfibrilles et très résistantes à la torsion, propriétés conférées par une conformation en triple hélice décrite par Bella *et al.* (1994).

Les protéines isolées de co-produits de la pêche et *a fortiori* de poissons sont de plus en plus valorisées suite aux orientations tracées par le parlement européen en matière de non-rejet des poissons capturés accidentellement (Wisdorff & Chaal 2013). Ces protéines trouvent ainsi des débouchés dans différents domaines de l'agroalimentaire (agents texturants, arômes) mais également de l'industrie pharmaceutique (antithrombotiques) (Nagai & Suzuki 2000; Kurtovic & Marshall 2013; Jaques 1973)

#### d. OTMA et autres composés azotés non-protéiques des poissons

Les composés azotés non-protéiques regroupent toutes les molécules composées d'azote qui sont solubles dans l'eau, de faible poids moléculaire et qui ne sont pas des protéines. Cette fraction d'azote non-protéique (ANP) représente 9 à 18% de l'azote total chez les téléostéens (Huss 1999). L'azote non-protéique correspond à des molécules endogènes du poisson ou de molécules issues de la dégradation des tissus (figure 1-2). Parmi les molécules endogènes sont notamment retrouvées : l'OTMA (oxyde de triméthylamine), la créatine, les acides aminés libres, l'ammoniac et l'urée.

L'OTMA est présente dans de nombreuses espèces marines (Hebard *et al.* 1982) à des teneurs allant de 75 à 250 mg pour 100g de chair chez les sélaciens et de 60 à 120 mg pour 100g de chair dans le cabillaud (Huss 1999). Elle a aussi été retrouvée dans quelques espèces d'eau douce comme la perche du Nil (*Lates niloticus*) et de tilapia provenant du lac Victoria (Anthoni *et al.* 1990). L'OTMA est de fait reconnue comme une molécule spécifique des espèces marines, comme l'illustre la figure 1-2. La présence de cette molécule dans la chair de poisson aurait deux origines selon la littérature : une voie exogène majeure et une voie endogène mineure. La voie exogène correspondrait à la bioaccumulation de la molécule lors de la consommation de zooplancton par le poisson. En effet, le zooplancton oxyderait la triméthylamine (TMA) présent dans les plantes marines, grâce à une TMA monoxydase (Huss 1999) selon la réaction décrite sur la figure 1-3. Une synthèse endogène d'OTMA existe, elle a été observée en conditions aseptiques dans le muscle rouge d'espèces pélagi-

Tableau I-VI : Composition en acides aminés libres des muscles de plusieurs espèces de poissons. Les valeurs affichées correspondent à des milligrammes pour 100 g de chair. Ces données sont issues de plusieurs références : [1] Suyama & Suzuki 1975, [2] Suyama & Yoshizawa 1973 et [3] Konosu *et al.* 1974.

Espèces de poissons	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Try	Lys	His	Arg	Tau
Requin ( <i>Mustelus kanekonis</i> ) [1]	6	10	9	12	7	28	21	5	5	5	8	2	4	-	4	11	7	35
Requin taupe ( <i>Lamna cornubica</i> ) [1]	7	7	10	12	7	21	19	7	6	5	8	5	4	-	3	8	6	44
Thon albacore ( <i>Neothunnus albacora</i> ) [2]	1	3	2	3	2	3	7	7	3	3	7	2	2	-	35	1220	1	26
Sérieole du Japon ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ) [2]	1	9	9	12	2	11	24	4	3	3	5	5	3	-	42	1160	1	
Maquereau commun ( <i>Scomber scombrus</i> ) [3]	-	11	6	18	26	7	26	16	2	7	14	7	4	-	93	676	11	84
Dorade japonaise ( <i>Chrysophrys major</i> ) [3]	-	3	3	5	2	12	-	3	-	3	4	2	2	-	11	4	2	138
Cardeau ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) [3]	-	4	3	6	1	5	13	1	1	1	1	1	1	-	17	1	3	171
Poisson globe ( <i>Fugu vermiculare</i> ) [3]	1	10	4	4	13	2	22	2	-	2	3	2	1	-	128	1	20	123

Tableau I-VII : Teneurs en urée de muscles de plusieurs espèces de poissons appartenant aux élasmo-branches et aux téléostéens. Ces données sont issues de plusieurs références : [1] Suyama & Tokuhira (1954), [2] Suyama & Suzuki (1975) et [3] Shewan (1951).

Espèces de poissons	Teneur en urée (mg/100g)	Références
<b>Elasmobranches</b>		
Raie ( <i>Raja hollandi</i> )	2167	[1]
Requin ( <i>Mustelus kanekonis</i> )	1820	[2]
Requin ( <i>Mustelus griseus</i> )	1740	[2]
Emissole étoilée ( <i>Mustelus manazo</i> )	1718	[1]
Requi bleu ( <i>Prionace glauca</i> )	1600	[2]
Requin ( <i>Squalus mutsukurii</i> )	1530	[2]
Requin taupe ( <i>Lamna cornubica</i> )	1520	[2]
Requin ( <i>Isuropsis glauca</i> )	1410	[2]
<b>Téléostéens</b>		
Limande ( <i>Limanda</i> sp.)	9,91	[3]
Hareng ( <i>Clupea harengus</i> )	2,9	[3]
Dorade ( <i>Sparus</i> sp.)	2,6	[3]
Cabillaud ( <i>Gadus callarias</i> )	2,3	[3]
Thon ( <i>Germo germo</i> )	2,3	[3]
Eglefin ( <i>Melanogrammus aeglefinus</i> )	1,98	[3]
Saumon ( <i>Salmo salar</i> )	1,3	[3]
Sardine ( <i>Sardina melanosticta</i> )	0,45	[3]

ques (Kawabata 1953), cependant sur d'autres espèces comme le cabillaud la voie de synthèse est décrite comme mineure (Agustsson & Strøm 1981). Cela est dû notamment à une faible spécificité de la mono-oxygénase du foie pour la TMA et une concentration en OTMA stable dans le muscle grâce à l'apport constant de la molécule par l'alimentation. Si l'origine de l'OTMA dans le muscle de poisson est relativement connue, sa fonction au sein du muscle n'est pas réellement comprise, pour cela plusieurs hypothèses ont été formulées (Sotelo & Rehbein 2000) :

- l'OTMA aurait un rôle d'osmorégulation comme cela a été montré sur des téléostéens.
- elle servirait de cryoprotecteur.
- elle n'aurait pas de rôle particulier et serait le fruit de la bioaccumulation.
- elle serait un déchet issu du phénomène de détoxification de la TMA.

Cette dernière hypothèse est peu probable dans le cas du cabillaud, compte tenu des quantités d'OTMA retrouvées dans la chair de cabillaud, alors qu'une très faible activité anabolique endogène a été décrite pour cette molécule (Agustsson & Strøm 1981).

Au sein de la fraction ANP, d'autres molécules sont retrouvées, comme indiqué ci-dessous.

La créatine est le constituant majoritaire de l'ANP (figure 1-2). Elle provient de la dégradation des acides aminés et assure une fonction de réserve en phosphate pour la régénération des molécules d'ATP (Voet & Voet 2005), sa teneur est associée à celle en créatine. Leurs teneurs varient en fonction des espèces (Ikeda 1980; Larsen *et al.* 2007).

Les acides aminés libres ont également des teneurs variables en fonction des espèces, des tissus et plus particulièrement du type de muscle (Huss 1999; Suyama & Yoshizawa 1973; Suzuki *et al.* 1987; Antoine *et al.* 2001). La chair des poissons possède des teneurs importantes en histidine, taurine, lysine, glycine et alanine libres (Tableau I-VI). La richesse en histidine des tissus est à l'origine du risque d'intoxication à l'histamine.

L'ammoniac et l'urée, son métabolite, sont retrouvées en quantités différentes selon le type de poisson, généralement plus importantes chez les poissons cartilagineux (Tableau I-VII). L'urée possède des propriétés osmorégulatrices (Ip & Chew 2010).

La présence de bétaines a aussi été décrite, il s'agit de dérivés d'acides aminés, leurs teneurs sont généralement supérieures dans la chair des sélaciens (Ikeda 1980).

En outre d'autres molécules appartenant à la fraction ANP sont retrouvées dans la chair de poisson en cours d'altération : TMA, bases nucléotidiques, amines biogènes. Ces molécules issues de l'ANP auront des conséquences sur la qualité des poissons notamment sur les propriétés organoleptiques et sur la sécurité sanitaire des poissons.

#### e. Vitamines et sels minéraux du poisson

Les vitamines sont essentielles pour les organismes vivants, car elles ne peuvent pas être synthétisées *de novo*. Il existe deux « classes », les vitamines liposolubles comprenant

Tableau I-VIII : Principales vitamines liposolubles contenues dans la chair et le foie de plusieurs genres de poisson (Murray & Burt 1969).

Espèces	Vitamine A (UI/g)	Vitamine D (UI/g)
<b>Chair</b>		
Cabillaud ( <i>Gadus morhua</i> )	0-50	0
Anguille ( <i>Anguilla anguilla</i> )	300-4,500	1-500
Eglefin ( <i>Melanogrammus aeglefinus</i> )	0-50	0
Flétan ( <i>Hippoglossinae</i> )	400	40
Hareng ( <i>Culpea harengus</i> )	20-400	300-1,000
Maquereau ( <i>Scomber scombrus</i> )	50-200	100-1,000
Saumon pacifique ( <i>Oncorhynchus keta</i> )	70-500	200-800
Sprat ( <i>Sprattus sprattus</i> )	400-1,000	300-1,000
<b>Foie</b>		
Cabillaud ( <i>Gadus morhua</i> )	200-10,000	20-300
Flétan ( <i>Hippoglossinae</i> )	2,800-360,000	550-20,000
Hareng ( <i>Culpea harengus</i> )	3,600-10,000	
Maquereau ( <i>Scomber scombrus</i> )	2,500-130,000	750-1,000
Saumon ( <i>Salmonidae</i> )	5,000-20,000	
Thon ( <i>Scombridae</i> )	40,000-800,000	16,000-30,000

Tableau I-IX : Principales vitamines hydrosolubles contenues dans la chair, les rogues et le foie d'espèces de poissons. Les valeurs donnent des plages de teneurs exprimées en µg/g (Murray & Burt 1969).

Espèces	B1	B2	B3	B6	B12	B5	B5
<b>Chair</b>							
Cabillaud ( <i>G.morhua</i> )	0,5-1,8	0,2-1,6	15-23	1,7	0,002-0,011	1,7	0,03
Hareng ( <i>C.harengus</i> )	0,1-1,3	0,9-3,3	20-63	0,08-0,14	0,08-0,14	9,3-9,7	0,09-0,16
Maquereau ( <i>S.scombrus</i> )	0,2-2,0	1,6-6,6	41-114	5,0-8,9	0,02-0,13	9,7-10,9	0,06-0,08
Anguille ( <i>A.anguilla</i> )	1,3-2,0	0,4-4,6	33-41	3,0	0,006-0,03	0,9-2,4	
Eglefin ( <i>M.aeglefinus</i> )	0,3-1,0	0,2-1,6	31-44	1,2	0,005-0,02	0,4-2,9	0,05
Flétan ( <i>Hippoglossinae</i> )	0,3-1,2	0,4-1,8	30-110	1,1-5,5	0,007-0,009	1,5-3,6	0,03-0,08
Saumon ( <i>Salmonidae</i> )	1,4-2,4	0,6-2,2	54-88	6,0-9,8		20	0,05
<b>Rogues</b>							
Cabillaud ( <i>G.morhua</i> )	2,5	5,5	8	1,4	0,15	19,7	0,17
Hareng ( <i>C.harengus</i> )		3,2	14		0,1	17,3	
<b>Foie</b>							
Cabillaud ( <i>G.morhua</i> )		3,4	15		0,11	4,3	

Tableau I-X : Teneurs moyennes de quatorze minéraux (en mg/100g) issues de mesures sur plusieurs espèces de poissons. Pour chaque élément, une plage avec les valeurs extrêmes mesurées est proposée (Murray & Burt 1969).

Eléments	Teneur moyenne	Extrema	Eléments	Teneur moyenne	Extrema
Calcium	792	19 – 881	Silicium	4	
Potassium	278	19 – 502	Fer	1,55	1 – 5,6
Chlore	197	3 – 761	Zinc	0,96	0,23 – 2,1
Soufre	191	130 – 257	Manganèse	0,82	0,0003 – 25,2
Phosphore	190	68 – 550	Arsenic	0,37	0,24 – 0,6
Sodium	72	30 – 134	Cuivre	0,20	0,001 – 3,7
Magnésium	38	4,5 – 452	Iode	0,15	0,0001 – 2,73

les vitamines A, D, E et K et les vitamines hydrosolubles majoritairement composées des vitamines B et de la vitamine C. La totalité des vitamines est retrouvée dans la chair de poisson ([Tableau I-VIII](#) et [Tableau I-IX](#)), cependant les teneurs varient en fonction des espèces de poisson, de la saison de capture ([Murray & Burt 1969](#)) ou du type de tissu. Ainsi, en règle générale, les muscles des poissons gras possèdent des teneurs en vitamines liposolubles plus importantes que celles des muscles du poisson maigre. Comme le montre le [Tableau I-IX](#), des teneurs en vitamines supérieures sont enregistrées dans le foie ou les rogues des poissons maigres en comparaison avec celles des muscles ; le foie possédant notamment des teneurs plus importantes en vitamine A et D. Cette forte teneur en vitamines lipophiles est expliquée par le fait que le foie est un lieu de réserves lipidiques pour ces espèces. D'un point de vue réglementaire ([The European Parliament & The European Council 2011](#)), la chair des poissons, gras notamment, satisfait une grande partie des apports journaliers recommandés (AJR).

La chair de poisson est également composée de minéraux, le [Tableau I-X](#) présente les teneurs moyennes en minéraux issues de mesures sur plusieurs espèces de poissons. Ainsi, les cinq minéraux les plus importants au sein de la chair de poisson sont : le calcium, le potassium, le chlore, le soufre et le phosphore. D'autres minéraux comme le zinc, le cuivre ou l'iode sont présents à l'état de traces. En outre, une portion de 100g de poisson couvre les AJR en calcium ou en iode en suivant la réglementation ([The European Parliament & The European Council 2011](#)).

Vitamines et minéraux participent donc à la qualité nutritionnelle de la chair de poisson couvrant, notamment dans le cas des poissons gras à une part importante des AJR.

#### **4. La flore bactérienne du poisson**

Ce dernier paragraphe sur les aspects biologiques liés aux poissons va s'attacher à étudier la flore bactérienne du poisson vivant. Le premier point à souligner est que, comme tout tissu vivant, le muscle de poisson est complètement stérile grâce à l'action du système immunitaire du tissu musculaire ([Huss 1999](#); [Apun et al. 1999](#)). Cependant quelques exceptions sont à noter comme les observations de *Vibrio* sp. réalisées dans les reins et les foies de turbot ([Toranzo et al. 1993](#)) ou de bactéries du genre *Flavobacterium* dans la rate, les reins et le cerveau de saumon ([Ekman et al. 1999](#)).

##### **a. Origine et localisation**

La flore bactérienne du poisson vivant est avant tout issue de son environnement. La qualité de l'eau de mer a été décrite comme étant un élément influençant la charge microbienne du poisson notamment à la surface de sa peau ([Austin 2002](#)) ou au sein de l'œuf et de la larve ([Hansen & Olafsen 1999](#)). Ainsi la qualité microbiologique de l'eau de mer entourant le poisson aura un impact sur la charge bactérienne sur un plan qualitatif et quantitatif.

La flore bactérienne du poisson vivant a fait l'objet d'une revue par [Austin \(2002\)](#) . La région de l'organisme possédant le plus de microorganismes est l'intestin où la charge bac-

Tableau I-XI : Flore bactérienne (Gram négatifs et positifs) retrouvée sur du poisson capturé dans des eaux propres et non-polluées (Huss 1999).

<b>Bactéries à Gram négatif</b>	<b>Bactéries à Gram positif</b>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Flavobacterium</i>	Coryneformes
<i>Cytophaga</i>	
<i>Vibrio</i>	
<i>Photobacterium</i>	
<i>Aeromonas</i>	



térienne moyenne est d'environ  $10^8$  UFC/g pour la flore aérobie et  $10^5$  UFC/g pour les anaérobies. Le second tissu le plus colonisé est les branchies ou une charge allant jusqu'à  $10^6$  UFC/g a été décrite chez les salmonidés (Trust 1975). Le dernier type de tissus, dans lequel est recensée une flore importante, est la peau des poissons où la charge bactérienne moyenne est de  $10^2$  à  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> (Austin 2002). En outre, des bactéries sont également retrouvées au niveau des yeux, des œufs et des larves de poisson. La colonisation des œufs par les bactéries dès les premiers stades larvaires aurait une influence sur la colonisation et l'établissement d'une flore bactérienne dans l'intestin des poissons (Ringo & Birkbeck 1999).

Différents paramètres de l'environnement du poisson vont influencer sur la charge microbienne qualitativement et quantitativement.

- La température et la qualité de l'eau : un poisson pêché dans une eau propre et froide aura une charge bactérienne plus faible que dans une eau chaude et polluée (Shewan 1977). Ainsi, des charges bactériennes pouvant atteindre  $10^7$  UFC.cm<sup>-2</sup> ont été mesurées sur la peau de poissons provenant d'eaux chaudes polluées (Huss 1999). Shewan a formulé une hypothèse découlant de ces travaux, la charge bactérienne d'un poisson dépendrait plus de la qualité de l'eau environnante que de l'espèce de poisson considérée.

- La profondeur à laquelle le poisson évolue : la composition de la flore intestinale de grenadier (*Coryphaenoides*) a montré l'existence d'une flore essentiellement barophile, tolérant les fortes pressions régnant à plus de 3000 m de profondeur (Yano et al. 1995).

- La proximité de la côte : Celle-ci induit la présence, au sein de l'eau de mer, de rejets issus de l'activité humaine (domestiques, ruraux et industriels) véhiculés par les eaux fluviales. Ces déchets sont vecteurs d'*Enterobacteriaceae* qui sont généralement rapidement dissipés (Huss 1999). Pour les eaux tropicales, *Escherichia* et *Salmonella* peuvent cependant persister dans l'environnement.

- La saison de pêche : la saison de pêche va influencer sur la charge bactérienne du poisson puisque la température de l'eau et l'état physiologique du poisson en dépendent.

#### b. Composition de la flore

Après avoir décrit l'origine et la localisation de la flore bactérienne du poisson, il convient de décrire sa composition. L'étude se focalisera sur la flore bactérienne des poissons issus des mers froides et tempérées. Shewan (1977) a montré que la moitié des poissons étudiés, provenant de mers froides, avaient une flore composée à plus de 80% de bacilles Gram négatifs sur leurs peaux. Comme le montre le Tableau I-XI, un consensus existe au sein de la communauté scientifique pour dire que les poissons sont porteurs de bacilles Gram négatifs en grande majorité. Parmi les genres bactériens retrouvés, il y a notamment des *Pseudomonas*, *Moraxella* et *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Shewanella putrefaciens*, ou encore *Aeromonas*.

En outre, des bactéries des genres *Vibrio* et *Photobacterium* typiquement marines

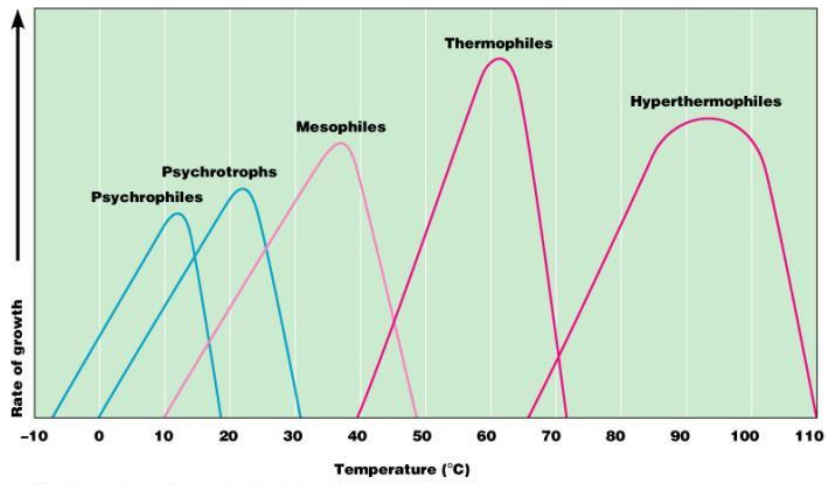


Figure 1-4 : Classes de microorganismes déterminées par les plages optimales de croissance en fonction de la température.

sont également retrouvées. Avec *S.putrefaciens*, *Vibrio* et *Photobacterium* sont deux genres bactériens nécessitant la présence de sodium pour pouvoir se développer. De façon plus variable des Grams positifs sont également dénombrés sur ces poissons parmi lesquels des *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus* ou des Corynéformes. La présence de ces organismes semble être le fruit de la pollution de l'eau environnante. Les branchies présentent une flore microbienne sensiblement proche de celle de la peau des poissons, parmi les Grams négatifs et positifs retrouvés (Austin 2002).

La microflore intestinale est soumise à des variations de sa composition au cours du temps. Ainsi les premiers organismes à coloniser l'intestin des larves de turbot, de dorade et de bar sont majoritairement des membres des genres *Aeromonas* et *Vibrio* (Munro *et al.* 1994 ; Grisez *et al.* 1997). Le développement d'une flore intestinale coïncide avec le début de la consommation d'aliments (Munro *et al.* 1994). Il a été montré que la flore intestinale est influencée par le type d'alimentation : la consommation de rotifères et d'artémies ont été respectivement corrélées à *V. anguillarum* et *V. alginolyticus* (Grisez *et al.* 1997). Austin (2002) a recensé au sein du tube digestif des poissons adultes plusieurs genres parmi lesquels *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Falvobacterium*, *Micrococcus*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Vibrio*. Dans l'intestin du poisson des souches probiotiques peuvent également être retrouvées de façon naturelle ou, dans le cas de l'aquaculture, artificielle. Ainsi une souche de *Carnobacterium inhibens* isolée de saumon a montré une activité antimicrobienne vis-à-vis de *A. salmonicida* et *V. anguillarum* (Jöborn *et al.* 1999). D'autres souches notamment de *L. rhamnosus* ont également montré des propriétés probiotiques permettant d'augmenter les taux sériques d'immunoglobuline chez la truite arc-en-ciel (Nikoskelainen *et al.* 2003). Le mode de vie du poisson et notamment la migration des poissons peut conduire à une évolution la flore intestinale (Yoshimizu & Kimura 1976). Enfin, comme le montre la figure 1-4, trois grands types de bactéries sont définis psychrophiles, psychrotrophes et mésophiles, en fonction de leur habilité à croître à des températures plus ou moins faibles. Les psychrophiles sont des organismes adaptés au froid, leur optimum de croissance est proche de 15°C (figure 1-4), avec une inhibition au-delà de 20°C. Le genre *Photobacterium*, psychrophile, est retrouvé parmi la microflore du poisson. Les psychrotrophes sont des organismes supportant le froid, *i.e* capables de se développer à 0°C mais avec un optimum de croissance proche de 25°C (figure 1-4). La flore des poissons d'eau de mer froide est composée en majorité de psychrotrophes (Huss 1999) notamment de *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Vibrio*. Les mésophiles possèdent un optimum de croissance à 37°C avec des extrema de croissances allant de 10°C à 50°C (figure 1-4). La flore mésophile est généralement présente en proportion plus importante dans les poissons d'eau chaudes (Huss 1999) où elle trouve des conditions thermiques adéquates.

La composition de la flore mais aussi les conditions thermiques favorables à son développement vont influencer sur l'altération des poissons lors de leur conservation. L'action de la

Tableau I-XII : Volumes de production (en millions de tonnes) des pêches mondiales de 2006 à 2011 (FAO, 2012).

Types de pêche	2006	2007	2008	2009	2010	2011*
<b>Capture</b>						
Continentale	9,8	10,0	10,2	10,4	11,2	11,5
Marine	80,2	80,4	79,5	79,2	77,4	78,9
<i>Total Capture</i>	<i>90,0</i>	<i>90,3</i>	<i>89,7</i>	<i>89,6</i>	<i>88,6</i>	<i>90,4</i>
<b>Aquaculture</b>						
Continentale	31,3	33,4	36,0	38,1	41,7	44,3
Marine	16,0	16,6	16,9	17,6	18,1	19,3
<i>Total Aquaculture</i>	<i>47,3</i>	<i>49,9</i>	<i>52,9</i>	<i>55,7</i>	<i>59,9</i>	<i>63,6</i>
<b>Total pêche mondiale</b>	<b>137,3</b>	<b>140,2</b>	<b>142,6</b>	<b>145,3</b>	<b>148,5</b>	<b>154,0</b>

\* Les données de 2011 correspondent à des estimations

Millions de tonnes

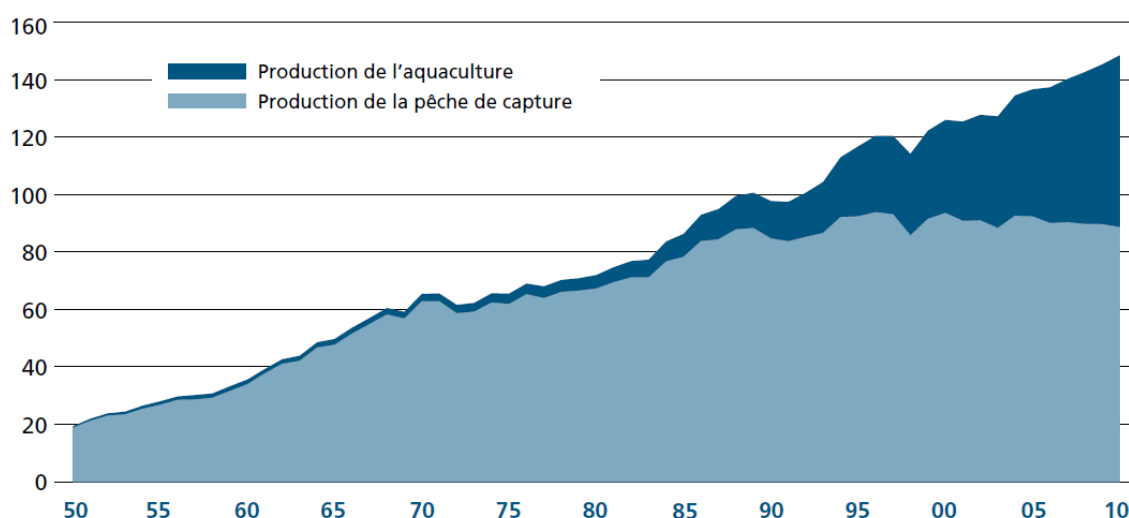


Figure 1-5 : Evolution de la pêche mondiale sur la période 1950-2010. L'aire totale sous la courbe correspond à la pêche totale (en millions de tonnes), l'aire sous la courbe bleu clair à celle de la pêche de capture et celle sous la courbe bleu foncé à celle de l'aquaculture (FAO, 2012).

Tableau I-XIII : Dix principaux pays exportateurs et importateurs de poissons en 2010. Les données sont communiquées en valeurs (millions de dollars USD) (FAO, 2012).

Exportateurs	2000	2010	Importateurs	2000	2010
Chine	3603	13268	États-Unis	10451	15496
Norvège	3533	8817	Japon	15513	14973
Thaïlande	4367	7128	Espagne	3352	6637
Vietnam	1481	5109	Chine	1796	6162
États-Unis	3055	4661	France	2984	5983
Danemark	2756	4147	Italie	2535	5449
Canada	2818	3843	Allemagne	2262	5037
Pays-Bas	1344	3558	Royaume-Uni	2184	3702
Espagne	1597	3396	Suède	709	3316
Chili	1794	3394	Rép. de Corée	1385	3193

microflore sur les qualités organoleptiques et sanitaires sera évoquée dans le [Chapitre 2](#).

### III. Ressources halieutiques et consommation du poisson

#### 1. Les ressources halieutiques mondiales

La totalité des données présentées dans ce paragraphe sont issues de rapports FAO sur la situation mondiale des pêches de l'aquaculture en 2010 et 2012 (FAO 2010, 2012).

##### a. Une production halieutique mondiale soutenue par l'aquaculture

Comme le montre le [Tableau I-XII](#), les dernières statistiques provisoires mondiales font état, en 2011, d'un niveau de pêche de 154 millions de tonnes de produits dont 58,7% proviennent de la capture et 41,3% de l'aquaculture. Sur ce total, 63,4% proviennent de capture ou d'aquaculture en milieu marin. L'aquaculture mondiale en milieu marin ne représente que 20% des 98,2 millions de tonnes issues des pêches marines. En outre, dans 85% des cas le produit est à destination d'une consommation alimentaire. Un fait important concernant la production halieutique mondiale est l'évolution de l'aquaculture par rapport à la pêche de capture ([figure 1-5](#)). Ainsi dans les années 1980, l'aquaculture représentait environ 7% de la pêche mondiale ; en trente ans, elle a donc pris treize points dans la production totale annuelle et c'est elle qui tire la production mondiale et lui permet une constante augmentation sur la période. Depuis le milieu des années 1990, la pêche de capture stagne, voire amorce une décroissance depuis le début des années 2000, les 260000 tonnes de baisse de production moyenne annuelle sur la période 2006-2011 en sont la preuve.

##### b. Données concernant la pêche marine mondiale

La zone de pêche la plus prolifique à la surface du globe concernant la quantité de produits capturés est le Pacifique Nord-Ouest. Certaines zones enregistrent une augmentation du volume de capture ces dernières années, comme les parties orientales et occidentales de l'océan Indien, le Pacifique Centre-Ouest, d'autres sont en repli comme la Méditerranée, l'Atlantique Nord-Ouest, l'Atlantique Nord-Est ou le Pacifique Nord-Est.

Dans certaines régions, des fluctuations sont observées, souvent le fruit de catastrophes naturelles ou issues de l'activité humaine. Ainsi, le tsunami et l'accident de Fukushima a touché une zone représentant 21% de la production japonaise, la fuite d'hydrocarbures de 2010 dans le Golfe du Mexique serait responsable d'une baisse de capture de 100000 tonnes de poissons. Enfin, des phénomènes climatiques sont également responsables des fluctuations, comme le phénomène de la Niña apportant des masses d'eau froides en Pacifique du Sud-Est notamment ce qui peut avoir un impact sur les populations de juvéniles.

Les principaux pays producteurs de poissons sont dans l'ordre la Chine, l'Indonésie, les Etats-Unis et le Japon, ils représentaient 32% du volume total des pêches en 2008. Parmi ces importants producteurs, seuls la Chine et les Etats-Unis sont également d'importants exportateurs de poissons puisqu'ils occupent respectivement les 1<sup>er</sup> et 5<sup>ème</sup> rangs mondiaux. La Norvège, la Thaïlande et le Vietnam se classent de la 2<sup>ème</sup> à la 4<sup>ème</sup> place ([Tableau I-XIII](#)).

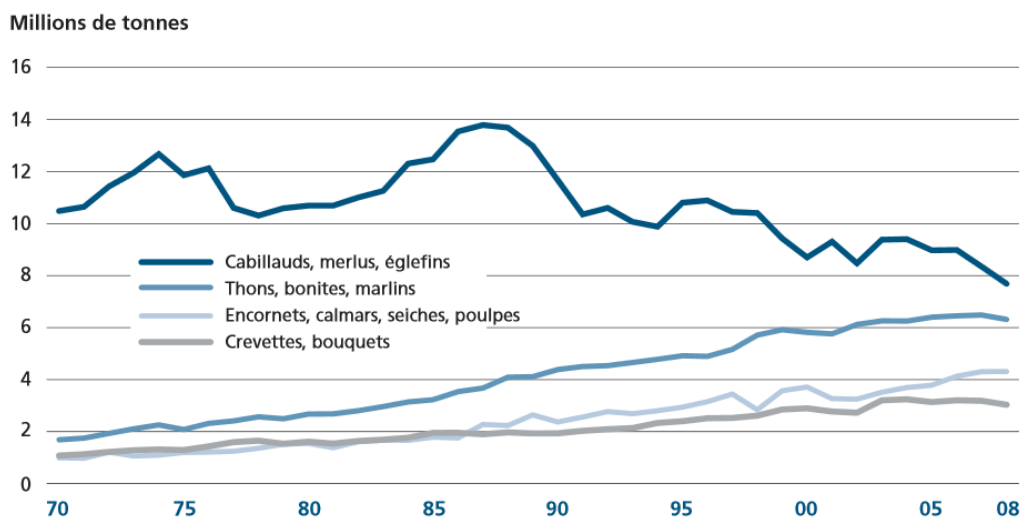


Figure 1-6 : Evolution des captures marines classées par groupes d'espèces les plus prisées par le marché mondial. Les données présentent l'évolution des captures sur les quarante dernières années (FAO, 2010).

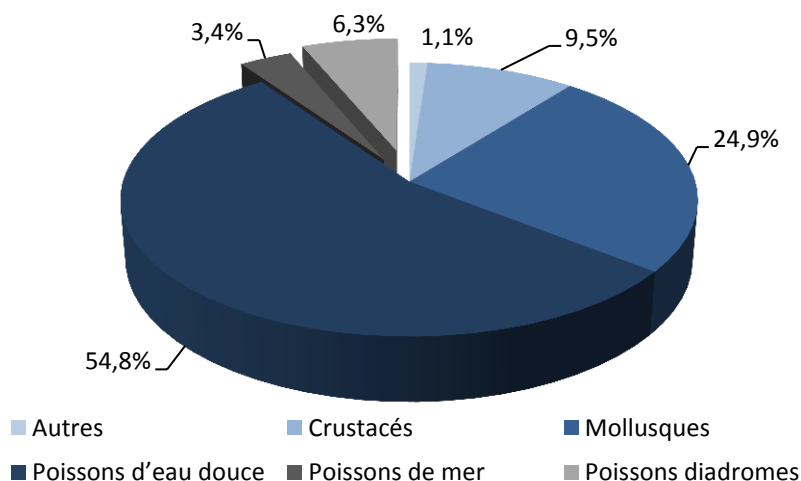


Figure 1-7 : Principaux groupes d'espèces compris au sein de la production aquacole mondiale. Les données correspondent à des pourcentages issus de volumes de production en millions de tonnes (FAO, 2010).

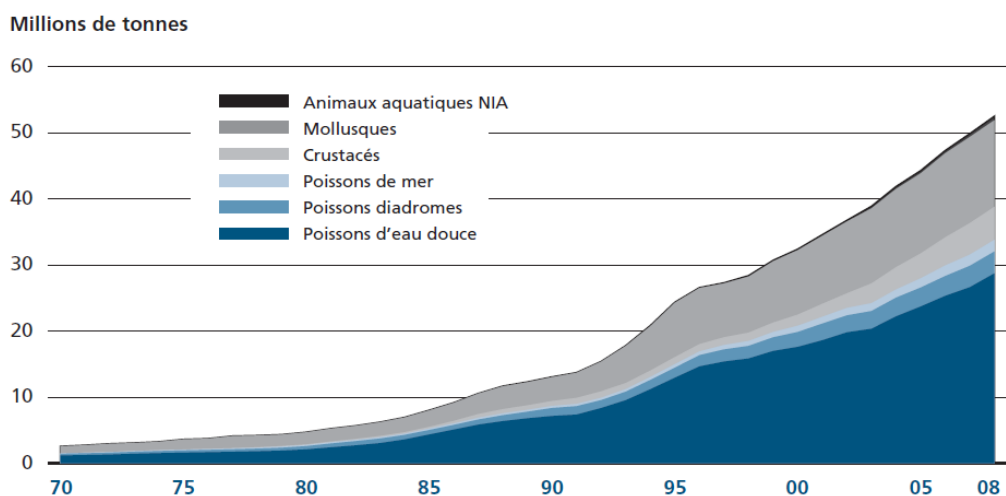


Figure 1-8 : Evolution de la production aquacole mondiale sur la période 1970-2008. Les données sont classées par principaux groupes d'espèces. NIA signifie non inclus ailleurs (FAO, 2010).

Concernant les importations, les cinq plus gros importateurs mondiaux de poissons sont les Etats-Unis, le Japon, l'Espagne, la Chine et la France (Tableau I-XIII). En 2008, 33% du volume des captures de poissons marins étaient composés de dix espèces majeures (FAO 2010) dont les anchois (Engraulidés), le colin (*Theragra chalcogramma*), le hareng de l'Atlantique. Depuis le pic observé au milieu des années 1980, la baisse des captures de gadidés est restée constante (figure 1-6). Parallèlement, en quatre décennies, les captures de thonidés sont en augmentation quasi constante.

Comme vu précédemment l'aquaculture est en plein essor, de nos jours près d'un poisson sur deux est issu de l'aquaculture. En soixante ans, son volume de production a été multiplié d'un facteur 60 (FAO 2010, 2012). En considérant l'activité aquacole mondiale dans sa globalité, *i.e* marine et continentale, l'Asie est de loin le plus gros producteur avec 88,8% du volume produit en 2008. L'Asie est suivie des Amériques (4,60%) fortement poussée par l'activité de l'Amérique Latine (3,30%) et l'Europe (4,50%). En "écho" aux chiffres de la production asiatique, les cinq plus gros producteurs aquacoles mondiaux sont la Chine, l'Inde, le Viêtnam, l'Indonésie et la Thaïlande. Enfin pour conclure ce développement sur la production aquacole mondiale, il convient de noter que la très grande majorité de la production est portée par des pays en développement (88,9%) pour lesquels l'aquaculture est une source d'aliments à forte teneur en protéines permettant d'assurer la sécurité alimentaire de ces derniers. A l'heure actuelle 30% de l'aquaculture mondiale consistent en des élevages en eau de mer (FAO 2012). En 2008, près de 10% de la production aquacole mondiale étaient composés d'espèces de poissons marins ou amphihalins (figure 1-7). Cependant la valeur ajoutée de la production de ces espèces est telle qu'elles représentaient près de 20% de la valeur marchande. La production d'espèces amphihalines concerne surtout le saumon de l'Atlantique représentant 44% de la production, puis le poisson-lait (*Chanos chanos*) (20%), la truite arc-en-ciel (17,4%) et les anguilles (7,9%). L'Europe est leader dans le domaine de la production de saumon, puisqu'elle assure près de 55% de la production dont 36,4% pour la seule Norvège, dans le reste du monde le plus gros producteur est le Chili assurant 28% de la production. Il est à noter que ces données, de 2008, ne tiennent pas compte d'une épidémie ayant entraîné une baisse de moitié de la production en 2009.

Les données concernant la production d'espèces d'eau de mer indiquent une production importante d'espèces de poissons plats notamment le cardeau hirame (*Paralichthys olivaceus*), le turbot et la sole-langue (*Cynoglossus semilaevis*). La production de ces espèces a été multipliée par six en huit ans et les principaux producteurs sont la Chine et l'Espagne.

Afin de conclure ce développement sur l'aquaculture, il convient de noter que, si avant les années 1990 l'aquaculture d'espèces marines ou diadromes était quasiment anecdotique, elle n'a eu de cesse de se développer depuis cette période (figure 1-8), notamment grâce aux espèces diadromes. Cependant cette évolution reste moins marquée que pour les espèces d'eau douce et les mollusques, qui représentent les deux principaux groupes d'es-

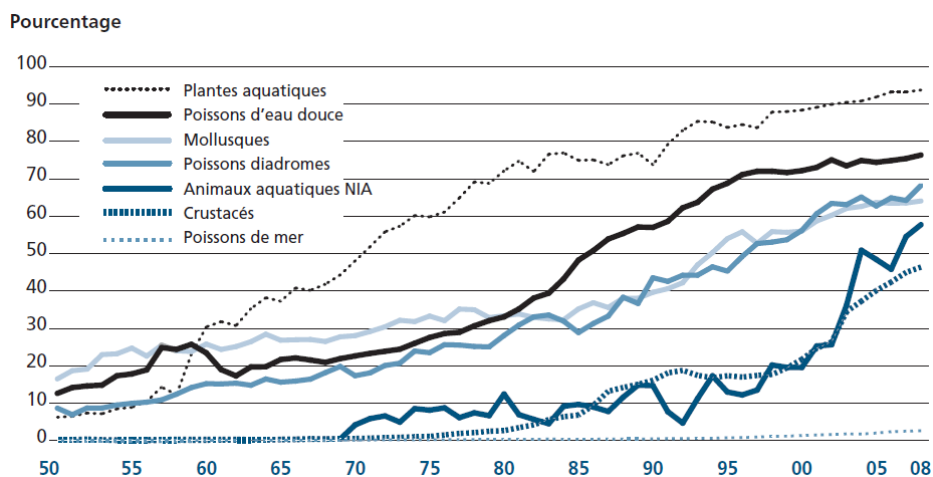


Figure 1-9 : Part de l'aquaculture dans la production mondiale selon les principaux groupes d'espèces. Les données sont présentées sur la période 1950-2008 (FAO, 2010).

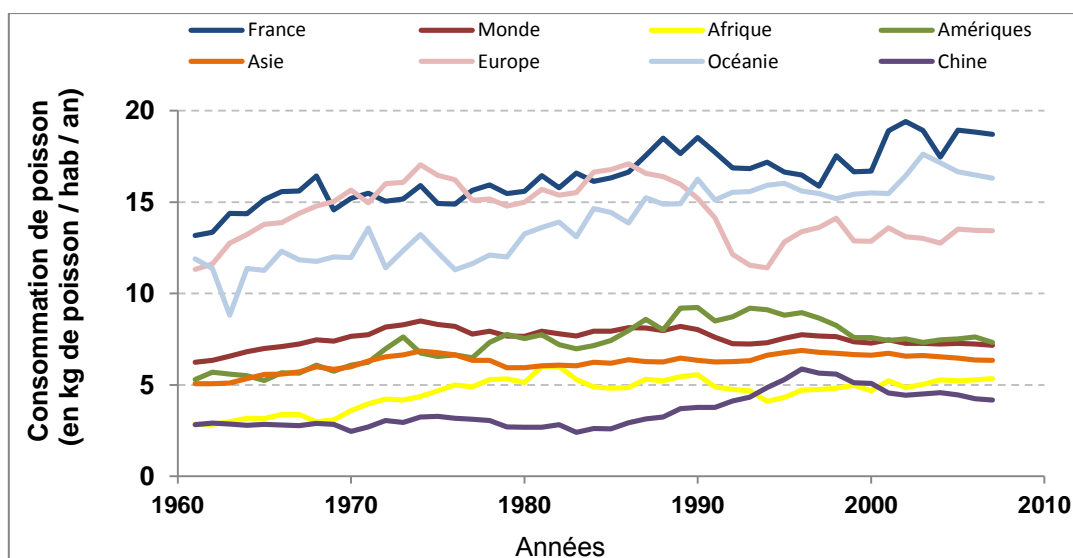


Figure 1-10 : Evolution de la consommation en poisson appartenant aux espèces pélagiques et démersales et autres types de poissons marins sur la période 1960-2010. Les données sont communiquées pour le monde, les grands continents, la Chine et la France.

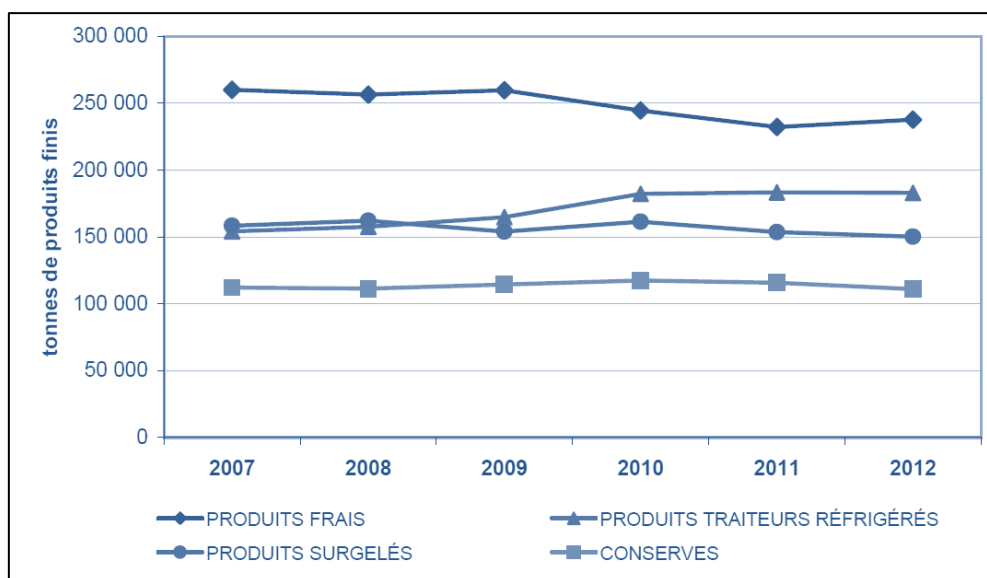


Figure 1-11 : Evolution des quantités de produits de la mer achetées (en tonnes de produits finis) en fonction des années. Quatre types de produits sont présentés : frais, traiteur, surgelés et appertisés. La période étudiée va de 2007 à 2012 (FranceAgriMer 2013).



pèces compris au sein de la production aquacole mondiale (figure 1-9). Enfin une différence claire apparaît entre les deux classes d'espèces pouvant évoluer en mer ; en 2008, les espèces diadromes étaient ainsi produites à près de 70% par l'aquaculture, quand les espèces de mer provenaient encore pour plus de 95% de la capture (figure 1-9).

## **2. Etat de la consommation française de poissons**

### **a. Une consommation importante et stable**

Les données Eurostat de la production annuelle française de produits de la mer attestent d'une production de 650500 tonnes en 2011, dont le tiers issu de l'aquaculture. Cette production ne permet pas d'assurer la consommation de produits de la pêche estimée à 36,7 kg/hab/an (FranceAgriMer 2013). Il existe donc un déficit commercial dans le domaine des produits de la pêche en France. La consommation de poisson est évaluée par FranceAgriMer à 23,4 kg/hab en 2012 (FranceAgriMer 2013), chiffre dans la moyenne des observations sur les dix dernières années, ces chiffres sont légèrement différents de ceux de la FAO (figure 1-10). Quoi qu'il en soit la tendance d'une consommation moyenne de 20 kg/hab/an s'esquisse, cette donnée indique que dans le monde, la France fait partie des pays consommant beaucoup de poisson (figure 1-10). D'un point de vue régional, après avoir connu une évolution et des niveaux similaires de consommation de 1960 à 1985, la consommation européenne a ensuite chuté avant de repartir au milieu des années 1990 (figure 1-10). A niveau international, des consommations similaires au niveau français sont enregistrées en Asie du Sud-Est et supérieures en Polynésie, Mélanésie et Micronésie.

### **b. Habitudes des consommateurs français**

La totalité des données présentées dans ce paragraphe sont issues du rapport FranceAgriMer sur la consommation de produits de la pêche (FranceAgriMer 2013). Les consommateurs plébiscitent l'achat de produits frais bien que ce secteur ait subi une baisse de 20000 tonnes entre 2009 et 2012 (figure 1-11). Cette baisse semble s'être réalisée au profit des produits traiteurs, deuxième forme de consommation la plus répandue. Enfin, viennent les produits surgelés et appertisés dont la consommation est stable sur la période 2007-2012. Dans chacun des types de produits évoqués, le poisson occupe une part importante. En 2012, le poisson représentait 69,7% des produits aquatiques frais commercialisés, 35,4% des produits traiteurs, 59,1% des produits surgelés et 90% des produits appertisés avec une majorité de thon (52,7%). Concernant les produits frais, sur les six dernières années les trois espèces les plus consommées n'ont pas changé (Tableau I-XIV), il s'agit du saumon, du cabillaud et du lieu noir (*Pollachius virens*). Les places suivantes sont occupées tour à tour par des espèces telles que le merlan (*Merlangius merlangus*), le merlu (*Merluccius merluccius*) et la dorade. Enfin d'un point de vue socio-démographique, les poissons frais sont surtout consommés dans les régions ouest et parisiennes qui représentent 43% de la consommation française. La population type consommant du poisson appartient à la classe moyen-

Tableau I-XIV : Evolution du volume de poissons frais produits (en tonnes) sur la période 2007-2012 pour les espèces les plus consommées en France (FranceAgriMer 2013).

<b>Espèces</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>
Saumon	26350	28000	29909	27150	25763	33579
Cabillaud	12858	12186	17963	18345	17433	18978
Lieu noir	7512	8300	8378	7980	7097	7269
Merlan	5904	4790	5307	5558	5414	5160
Merlu/Colin	4886	5020	5514	5511	5790	5104
Baudroie	4711	4468	4497	4511	4182	4782
Maquereau	4905	4439	4943	4681	4207	4337
Dorade	5414	6155	6086	5409	4534	4329
Truite	5226	5880	5357	4978	3976	4126
Bar	5204	4692	5057	5523	4558	3785

ne (70% de la consommation) et vit dans des pôles urbains (61% de la consommation). Enfin une dissymétrie semble exister entre les classes d'âges. En effet, les personnes âgées de moins 49 ans privilégient l'achat de produits surgelés, du rayon traiteur ou de conserves quand celles âgées de plus de 50 ans plébiscitent l'achat de produits frais.

La consommation de produits de la mer et *a fortiori* de poisson est donc relativement stable en France et proche de 20 kg par habitant par an. Le poisson est une matrice rapidement altérable de par sa composition (richesse en lipides, présence de composés azotés non-protéiques, etc.) et sa flore bactérienne. Face à cet environnement « hostile », il convient donc de garantir un produit de qualité aux consommateurs. Dans le domaine des produits de la pêche la notion de qualité est bien souvent synonyme d'un produit frais. Le prochain chapitre s'attachera à définir les notions de qualité et de fraîcheur, puis à décrire les outils existant pour évaluer la fraîcheur du poisson.



Figure 2-1 : Diagramme illustrant le terme de qualité et les notions sous-jacentes qui lui sont liées.

---

## Chapitre 2. Qualité et suivi de la fraîcheur du poisson : quels outils ?

La notion de qualité peut être définie comme le « *degré d'excellence relative, [la] valeur que l'on attribue à une chose et qui permet de la juger, de la classer par rapport à une norme de référence ou par rapport à des choses analogues* » (Académie Française 2013b). Dans le domaine de l'alimentation et dans celui de la consommation de produits de la pêche aussi, le terme de qualité renferme différentes occurrences (Oehlenschläger & Sørensen 1997) qui sont présentées sur la figure 2-1.

De prime abord, la qualité renferme une notion de sécurité alimentaire, *i.e* constance des approvisionnements d'une nourriture saine ayant de bonnes valeurs nutritionnelles. La seconde notion importante autour du concept de qualité concerne les propriétés organoleptiques de l'aliment. Il s'agit du respect de l'intégrité, de la texture, du goût et des arômes. Une troisième composante de la qualité d'un aliment est la garantie de la sécurité sanitaire. Il s'agit de maîtriser tous les risques de présence de pathogène(s), toxine(s) ou toxique(s) au sein de l'aliment. Enfin, la fraîcheur est le dernier paramètre pouvant être rattaché à la notion de qualité. Ainsi un poisson est considéré comme frais, de qualité, quand la période d'altération qu'il a connue est courte (Oehlenschläger & Sørensen 1997), de plus le risque en termes de sécurité sanitaire est faible. La fraîcheur est une notion primordiale dans le domaine des produits de la pêche, cela est d'autant plus vrai dans le cas du poisson, puisque son état de fraîcheur est le premier paramètre pris en compte par le consommateur pour évaluer la qualité.

Afin de mieux appréhender l'évolution de cette qualité au cours du processus d'altération, le prochain développement va s'attacher à traiter de l'évolution post mortem de la chair du poisson et de ces conséquences.

### I. Evolution post mortem de la chair du poisson

Après la mort, le tissu musculaire va subir différentes modifications biochimiques liées à l'action autolytique du tissu puis l'action de la flore microbologique.

#### **1. L'étape de rigor mortis entre changements biochimiques et modifications de la texture**

Le rigor mortis ou rigidité cadavérique est la première modification visible de la chair de poisson observée après sa mort. Cette étape se décompose en trois parties.

La phase de pré-rigor commence dès la mort du poisson, à partir de cette étape plusieurs processus biochimiques s'enclenchent. La rupture de l'approvisionnement en dioxygène conduit à la fin de la régénération des molécules d'ATP par le cycle de Krebs (Campbell & Reece 2004). En anaérobiose, la dégradation du pyruvate conduit à une acidification du tissu suite à la production de lactate conduisant à une baisse de pH du muscle à des valeurs comprises entre 5,4 et 6,1 (Huss 1999).

Tableau II-I : Principaux facteurs ayant une influence sur la période écoulée entre la mort du poisson et l'apparition de la rigor mortis (Roth *et al.* 2006; Iwamoto *et al.* 1987; Abe & Okuma 1991; Poli *et al.* 2005; Bjørlykke *et al.* 2011; Amlacher 1961).

Diminution	Augmentation
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Température de conservation élevée pour les poissons non-tropicaux</li> <li>- Poisson affamé</li> <li>- Poisson fatigué, stressé</li> <li>- Abattage par étourdissement et hypothermie</li> <li>- Abattage précédé d'une exposition au monoxyde de carbone ou choc électrique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abattage du poisson par administration d'un coup sur la tête</li> <li>- Poisson reposé</li> <li>- Différence faible entre la température de l'eau et celle de stockage</li> <li>- Température de conservation élevée pour les poissons tropicaux</li> </ul>

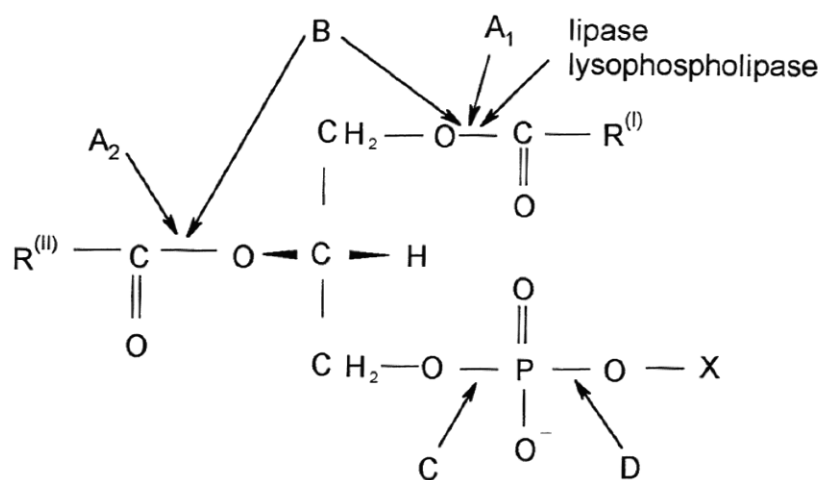


Figure 2-2 : Sites d'action potentiels des lipases A1, A2, B, C et D sur une molécule de phospholipide (Lopez-Amaya & Marangoni 2000b).

L'installation de la rigor mortis se manifeste au niveau de la tête pour se prolonger ensuite vers la partie caudale du poisson. Une méthode de mesure de l'état de rigor mortis a été développée chez le poisson (Iwamoto *et al.* 1987). Selon les conditions de capture, la rigor mortis apparaît d'une à 22 heures après la capture pour se terminer entre 2 et 120 heures après sa prise (Amlacher 1961). L'installation de la rigor mortis est le résultat de plusieurs facteurs dont l'inhibition des kinases et l'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  conduisant à la formation du complexe d'actomyosine (Eckert 1999). L'apparition de la rigor mortis est soumise à de nombreux facteurs, comme l'état de stress ou le niveau de satiété du poisson, la méthode d'abattage ou encore le type de conservation (Tableau II-1).

A l'issue du rigor, s'ouvre la période de résolution de la rigor conduisant à un ramollissement irréversible de la chair (Mackie 1997). Ce phénomène résulte vraisemblablement de la libération d'enzymes endogènes comme les cathépsines, calpaïnes et collagénases. Les cathépsines sont des protéases acides thermostables (Ho *et al.* 2000), elles interviennent dans la dégradation du complexe d'actomyosine (Jiang *et al.* 1996). Les cathépsines B, L et la L-like ont été décrites dans les produits de la mer (Jiang *et al.* 1994; Jiang 2000). Les calpaïnes sont des protéases neutres dépendantes du calcium. Deux calpaïnes principales sont retrouvées dans le poisson : la  $\mu$ -calpaïne et la m-calpaïne (Chéret *et al.* 2007). Ces enzymes ont une action protéolytique sur les myofibrilles, certaines enzymes sarcoplasmiques et les neurofilaments (Ho *et al.* 2000; Jiang 2000; Goll *et al.* 2008) conduisant à la formation de polypeptides (Muramoto *et al.* 1989; Goll *et al.* 2008). Enfin les collagénases sont des protéases de pH optimal compris entre 6,5 et 8,0 (Simpson 2000). Les collagénases sont de plus petite taille que les cathépsines et les calpaïnes (Kim *et al.* 2002; Park *et al.* 2002), elles catabolisent l'assise reliant les fibres musculaires au myocomme (Bremner & Hallett 1985; Sikorski & Kotakowski 2000).

L'étape de rigor mortis est cruciale dans le déroulement de l'altération. En effet, elle conduit à une modification des conditions biochimiques notamment via la baisse du pH et la rupture de l'intégrité cellulaire. Ceci conduit à l'apparition de nouvelles molécules au sein de la matrice, potentiellement utilisables par la flore d'altération.

## **2. Deux voies d'altération conduisant à la dégradation des lipides**

Lors de sa conservation, les lipides du poisson subissent une dégradation via deux processus celui d'hydrolyse enzymatique et celui d'oxydation des AGL.

### **a. Dégradation des lipides par hydrolyse enzymatique**

Huss (1999) a montré l'augmentation d'AGL dans la chair de hareng en cours de conservation, phénomène d'autant plus important chez les poissons non-éviscérés. Ceci a suggéré l'implication d'enzymes intestinales : les phospholipases et les lipases.

Cinq classes de phospholipases ont été décrites (figure 2-2). Les études concernant la chair de poisson, ayant surtout porté sur les phospholipases A1 et A2. Une activité de la phospholipase A1 a été suggérée dans le muscle de la bonite vraie (*Euthynnus pelamis*) sui-

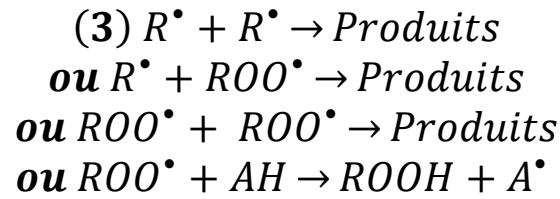
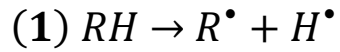


Figure 2-3 : Réactions chimiques intervenant dans le processus d'autooxydation. Le processus est divisé en trois étapes d'initiation (1), propagation (2) et terminaison de la réaction (3). (Frankel 2005)

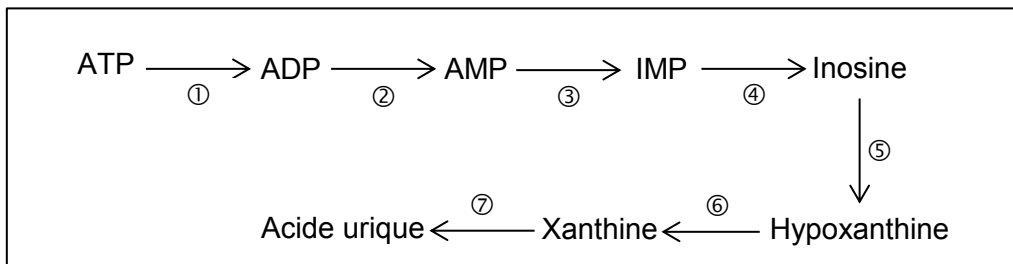


Figure 2-4 : Représentation schématique des réactions de dégradation de l'ATP et de ses métabolites. Avec 1 : ATPase, 2 : Myokinase, 3 : AMP désaminase, 4 : IMP phosphohydrolase, 5 : Nucléoside phosphorilase ou Inosine nucléosidase, 6 et 7 : Xanthine oxydase (Henehan *et al.* 1997; Huss 1999).



te à l'augmentation de la teneur en lysophosphatidylcholine dans le muscle (Satouchi *et al.* 1994). Cette enzyme possède une activité maximale pour un pH compris entre 6,5 et 7 et des températures situées entre 20°C et 30°C (Lopez-Amaya & Marangoni 2000b). Il convient de noter que de faibles activités ont été enregistrées à températures négatives (Satouchi *et al.* 1994). La phospholipase A<sub>2</sub> a surtout été étudiée à partir de tissus du système digestif chez plusieurs espèces comme le cabillaud ou encore la truite (Lopez-Amaya & Marangoni 2000b). Bien qu'une phospholipase A<sub>2</sub> isolée de cabillaud active à pH acide ait été décrite (Aaen *et al.* 1995), les phospholipases A<sub>2</sub> possèdent des caractéristiques identiques selon les espèces de poisson avec une activité optimale entre 30 et 40 °C et un pH entre 8 et 10.

Les lipases sont quant à elles des enzymes capables d'hydrolyser les triglycérides dont deux types, issus de poissons, ont été décrits : une lipase pancréatique et une enzyme proche de la lipase des mammifères (Lopez-Amaya & Marangoni 2000a). Ces lipases ont notamment été isolées dans l'hépatopancréas et le cæcum de truite arc-en-ciel et de sardine indienne (*Sardinella longiceps*) pour la première et dans les mêmes tissus d'anchois de Californie (*Engraulis mordax*) ou de saumon rose (*Oncorhynchus gorbuscha*) pour la seconde (Leger *et al.* 1977; Mukundan *et al.* 1985; Leger 1985; Tocher & Sargent 1984). Comme les phospholipases, ces enzymes sont actives à pH basique avec une activité maximale pour une température supérieure à 30°C, bien qu'une activité ait été décrite pour des températures inférieures à 0°C.

#### **b. Autooxydation des acides gras libres**

Les AGPI issus de l'hydrolyse des lipides sont des molécules particulièrement vulnérables à l'oxydation. La présence d'insaturations augmente le potentiel d'autooxydation, proportionnels au nombre de double liaisons (Frankel 2005). Au contact du dioxygène et en présence de lumière les AGPI s'autooxydent et forment des radicaux libres. Cette réaction est décomposée en trois sous-étapes : initiation, propagation et terminaison (figure 2-3).

L'oxydation des lipides conduit à la modification des propriétés organoleptiques, notamment de l'odeur et du goût du poisson, par la production de certains composés qui feront l'objet du Chapitre 3. Enfin les produits d'oxydation des lipides ou les AGL peuvent également influencer sur la qualité du produit via la création de liaison faible avec les protéines et conduire à un brunissement de la chair ou une modification de sa texture (Undeland 1997).

### **3. Catabolisme des nucléotides**

Lorsque le terme de catabolisme des nucléotides est utilisé, il sous-entend surtout le catabolisme de l'ATP. Comme vu dans la partie I.1, l'entrée en rigor mortis suit la baisse de concentration en ATP du muscle. Parallèlement à la résolution de la rigor s'engage un processus de dégradation de l'ATP relativement rapide. La chaîne réactionnelle est illustrée sur la figure 2-4 et conduit dans un premier temps à l'apparition de deux produits : l'inosine et l'hypoxanthine qui sont les seuls produits retrouvés dans le poisson en cours d'altération. En effet Henehan *et al.* (1997) notent que la dégradation de l'hypoxanthine et la xanthine sont

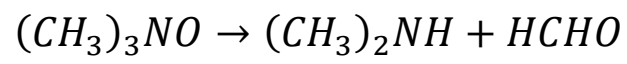


Figure 2-5 : Equation chimique de la réduction de l'OTMA en DMA et formaldéhyde par l'action de l'OTMA déméthylase.

des processus plus lents, ne survenant que dans les phases avancées d'altération du poisson. Cette voie catabolique s'applique à la plupart des espèces de poissons, mais des essais de modélisation ont montré qu'une partie de l'inosine et de l'hypoxanthine disparaissait dans le muscle, un phénomène de lixiviation pouvant expliquer les pertes (Howgate 2006).

Henehan *et al.* (1997) rapportent une évolution de la dégradation des nucléotides corrélée à l'état d'altération du poisson, il s'agit donc de marqueurs d'intérêt pour l'évaluation de l'altération du poisson. Ces auteurs indiquent un faible impact de ces catabolites sur les propriétés organoleptiques du poisson, néanmoins une étude menée a montré un lien entre la teneur en hypoxanthine et le développement d'une saveur amère chez le hareng altéré (Hughes & Jones 1966). De même, il existerait un lien entre la teneur d'IMP, la flaveur de fraîcheur du poisson et la saveur umami (Huss 1999; Kawai *et al.* 2002).

Plusieurs facteurs influencent les taux de catabolites ainsi que leurs taux de conversion : l'espèce de poisson, la flore bactérienne ou encore les conditions de manutention (Surette *et al.* 1988; Howgate 2006).

#### **4. Deux voies de réduction de l'OTMA**

Comme vu précédemment (Chapitre 1.II), l'OTMA est une molécule présente dans le muscle du poisson, cette molécule peut être catabolisée selon deux voies métaboliques.

##### **a. Décomposition par voie autolytique**

Une première voie de dégradation de l'OTMA vient de l'action d'une enzyme endogène appelée OTMA déméthylase ou OTMAase (EC 4.1.2.32). Cette enzyme catalyse la réaction illustrée sur la figure 2-5 conduisant à la production de diméthylamine (DMA) et de formaldéhyde en proportions équimolaires (Nielsen & Jørgensen 2004). Cette réaction est surtout rencontrée lors de la surgélation de poisson à des températures trop élevées, mais elle a également lieu dans le poisson frais, la DMA étant un potentiel marqueur de fraîcheur (Olafsdottir & Jonsdottir 2010). La libération de formaldéhyde au sein du muscle conduit à un durcissement de la chair du poisson et une diminution des capacités de rétention en eau. Cette modification des propriétés du muscle fait suite notamment à la formation de liaisons transversales entre les myofibrilles (Huss 1999; Erickson 2000; Nielsen & Jørgensen 2004). Nielsen & Jørgensen (2004) notent que les niveaux de formaldéhyde ne dépassent que rarement le niveau acceptable de cette molécule pour des denrées alimentaires.

La présence de l'OTMA déméthylase au sein de la chair de poisson a été décrite dans de nombreuses espèces de poissons et particulièrement au sein des tissus des Gadiformes (Sotelo & Rehbein 2000). La présence de l'OTMA déméthylase est loin d'être constante au sein des espèces de poisson et serait soumise à de nombreux facteurs, ainsi sexe, âge, température environnante ou état de satiété sont autant de facteurs ayant un impact sur la quantité d'enzymes présentes. Certains organes, notamment les reins et la rate, ont été décrits dans la littérature comme ayant une importante activité de l'OTMA déméthylase. D'autres tissus comme les muscles et le sang présentent une activité plus faible (Sotelo &

Tableau II-II : Exemple de molécules jouant le rôle d'inhibiteur ou de cofacteurs pour l'OTMA déméthylase (Sotelo & Rehbein 2000).

Cofacteurs	Inhibiteurs
NADPH	EDTA
NADH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Riboflavine	O <sub>2</sub>
Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>
Cystéine	

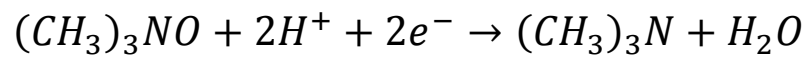


Figure 2-6 : Equation chimique de la réduction de l'OTMA en TMA et en eau par l'action de l'OTMA réductase.

Rehbein 2000). L'existence d'une activité importante de cette enzyme au sein des reins pose problème lors de l'opération de filetage. En effet, cet organe est situé le long de l'arrête centrale et son intégrité peut être touchée lors du processus de désarêtage libérant l'enzyme au sein du muscle (Huss 1999). D'un point de vue biochimique, l'enzyme est dépendante de l'action de plusieurs cofacteurs et inhibiteurs de natures diverses dont une liste non-exhaustive est donnée sur le [Tableau II-II](#). Deux systèmes de cofacteurs coexisteraient, l'un nécessitant des conditions d'anaérobiose et utilisant le NADH, le NADPH ou la riboflavine comme cofacteurs et le second indépendant de la présence de dioxygène utiliserait l'ion ferreux et la cystéine comme cofacteurs. En outre, l'existence de molécules inhibitrices et de cofacteurs rencontrés habituellement dans des réactions d'oxydoréduction suggèrent un mécanisme réactionnel faisant intervenir un transfert électronique (Sotelo & Rehbein 2000). La présence de l'OTMA déméthylase dans le milieu fait suite au relargage de l'enzyme après rupture des membranes cellulaires (Huss 1999). La particularité de cette enzyme est son excellente thermostabilité à température négative. En effet, plusieurs auteurs ont montré une stabilité jusqu'à -29°C (Sotelo & Rehbein 2000), avec une décroissance de l'activité lors de l'abaissement de la température. Enfin l'enzyme possède une activité maximale dans la zone de pH post-mortem.

#### **b. Réduction via l'activité microbienne**

Un second type de dégradation de l'OTMA résulte de l'activité microbienne et l'action d'une enzyme microbienne l'OTMA réductase (EC 1.6.6.9). Cette enzyme catalyse comme son nom l'indique une réaction de réduction de l'OTMA présentée sur la [figure 2-6](#). Cette enzyme est exprimée par de nombreuses bactéries présentes au sein de la flore d'altération du poisson dont notamment les genres *Photobacterium*, *Vibrio*, *Shewanella*. Ces bactéries utiliseraient l'OTMA comme accepteur final d'électron lors de la respiration anaérobique (Huss 1999) ceci expliquant l'amélioration de leur croissance en conditions anaérobies (Dos Santos *et al.* 1998). La réduction de l'OTMA conduit à la formation de TMA qui impacte les propriétés organoleptiques par la modification de l'odeur du poisson. En effet, la TMA est responsable de la note ammoniacale caractéristique du poisson altéré (Olafsdóttir & Fleurence 1997; Giri *et al.* 2010). Concernant les propriétés biochimiques de cette enzyme, l'OTMA réductase nécessite la présence de molybdène qui est son cofacteur. Cette enzyme, synthétisée par des espèces bactériennes psychrophiles et psychrotrophes est active à des températures de réfrigération. En outre, l'étude du gène responsable de la synthèse de cette enzyme fera l'objet d'un développement détaillé au sein du [Chapitre 4](#).

### **5. Evolutions microbiologiques**

Si les muscles des poissons vivants sont globalement stériles, la mort des poissons va voir se développer une colonisation progressive du muscle par les bactéries notamment celles de la flore commensale du poisson (Ruskol & Bendtsen 1995). Ceci est explicable par l'abolition des défenses immunitaires enregistrée au sein du tissu des poissons morts.

Tableau II-III : Récapitulatif des principales activités de la flore microbienne du poisson et de leurs conséquences d'un point de vue sensoriel (Gram & Huss 1996).

Activités bactériennes	Conséquences sensorielles
Catabolisme des nutriments	Production de gaz, de mauvaises odeurs.
Production de polysaccharides extracellulaires	Formation d'un mucus
Synthèse de pigments	Présence de colonies visibles
	Décoloration/Coloration de l'aliment

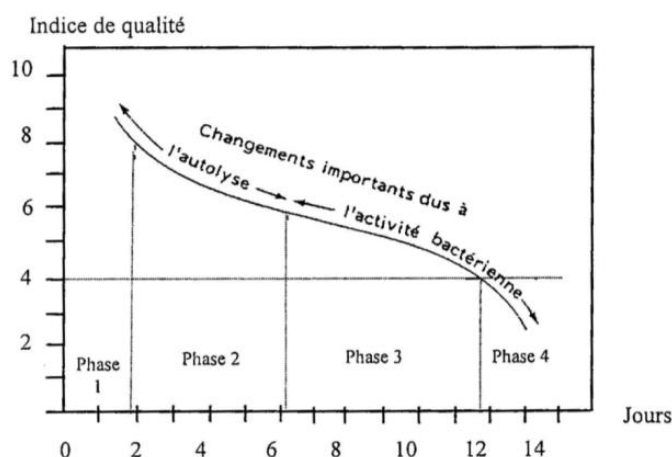


Figure 2-7 : Diminution de l'indice de qualité de cabillaud conservé à 0°C. Les causes majeures de l'altération sont données pour les phases considérées (Huss 1999).

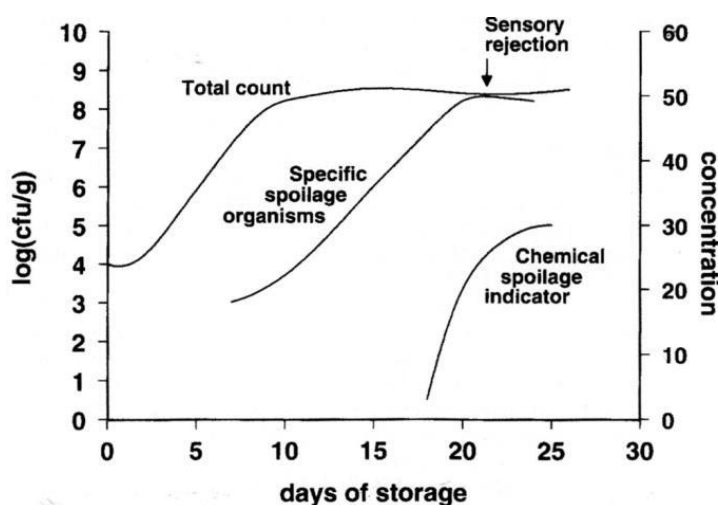


Figure 2-8 : Représentation schématique de la cinétique de la microflore présente au sein de la chair du poisson, de celle d'un microorganisme spécifique d'altération et d'un catabolite servant d'indicateur d'altération (Gram & Huss 1996).

Tableau II-IV : Exemples d'organismes spécifiques d'altération rencontrés pour différentes conditions de conservation de poisson marins des eaux froides ou tempérées (Gram & Huss 1996; Koutsoumanis *et al.* 1997; Gram & Dalgaard 2002).

Conditions de conservation	Organismes spécifiques d'altération
Aérobie sous glace fondue	<i>S. putrefaciens</i> / <i>Pseudomonas</i> spp.
Sous vide	<i>S. putrefaciens</i> / <i>P. phosphoreum</i>
Sous atmosphère modifiée (enrichie en CO <sub>2</sub> )	<i>P. phosphoreum</i>
Sous vide/ Sous atmosphère modifiée	<i>B. thermosphacta</i> et flore lactique

a. Une évolution de la microflore soumise à de nombreux facteurs

Si la microflore environnant le poisson est composée de nombreux genres et espèces bactériennes, tous ne vont pas participer à l'altération du poisson après sa mort. Le premier concept important lors de l'évocation des aspects de microbiologie et de conservation de la chair de poisson, est la notion de flore d'altération. Celle-ci correspond à la communauté bactérienne retrouvée au sein de la chair lors du processus d'altération, plusieurs microorganismes sont retrouvés dont les *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Lactobacillus*, *Photobacterium*, *Carnobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium* et *Vibrio* (Gram & Dalgaard 2002). La composition exacte est soumise premièrement aux variations de facteurs extrinsèques tels que les conditions de transformation, le temps et les conditions de stockage. Dans un second temps, des facteurs intrinsèques vont également influencer la composition de la microflore tels que la qualité initiale des poissons, le pH post-mortem ou la présence de quantités importantes d'azote non-protéique (Gram & Huss 1996). Une microflore essentiellement bactérienne se développe sur le poisson en cours d'altération, utilisant les ressources de leurs environnements. La microflore a un impact sur deux aspects sensoriels : l'odeur et l'aspect visuel de la chair (Tableau II-III). Il est reconnu dans la littérature que l'altération du poisson et la diminution de la qualité du poisson sont d'abord dues dans un premier temps au phénomène d'autolyse puis dans une seconde phase à l'activité bactérienne (figure 2-7), qui utilise les molécules issues de l'autolyse comme source de nutriments.

D'un point de vue cinétique, une phase de latence très courte est observée pour la flore bactérienne composant les poissons des eaux froides ou tempérées (Huss 1999), en effet cette flore, majoritairement psychrophile ou psychrotrophe, n'aurait pas besoin d'une période d'adaptation lors du stockage à froid. Comme le montre la figure 2-8, la charge bactérienne d'un poisson en cours d'altération est de l'ordre de  $10^8$  UFC/g après 10 jours de stockage avec un gain moyen de l'ordre de cinq logarithmes sur cette même période.

b. Importance de la notion d'organisme spécifique d'altération

Le second concept important dans l'altération du poisson est celui d'organisme spécifique d'altération qui a été décrit dès la fin des années 1980 (Gram et al. 1987) et précisé dans le courant des années 1990 (Dalgaard 1995b). Il s'agit d'une fraction de la flore d'altération présente initialement dans le poisson, généralement une seule espèce bactérienne, qui prend de l'importance au sein de la microflore en cours de processus d'altération et, est à l'origine de la synthèse de métabolites d'altération (Gram & Dalgaard 2002). La caractérisation de ces organismes spécifiques est réalisée en étudiant les corrélations entre des numérations bactériennes et des observations sensorielles ou des mesures de molécules indicatrices d'altération comme la TMA, l' $H_2S$ , le méthane-thiol ou l'ammoniac (Dalgaard 1995b; Gram & Huss 1996; Gram & Dalgaard 2002). Plusieurs organismes spécifiques d'altération ont été décrits dont notamment *S. putrefaciens* et *P. phosphoreum* pour les eaux froides et les bactéries lactiques pour les poissons de Méditerranée (Tableau II-IV).


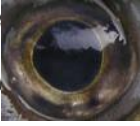










Jours	Aspect général du poisson	Oeil	Branchies
Jour 1			
Jour 4			
Jour 7			
Jour 11			

Figure 2-9 : Evolution visuelle de l'apparence globale de bars communs, de la transparence de leurs rétines et de l'aspect des branchies.



Longtemps décrit comme une espèce, *S. putrefaciens* est plus spécifiquement un groupe bactérien (Ziemke *et al.* 1998) ces membres possédant des phénotypes différents alors que des similarités sont observées d'un point de vue génotypique (Helgason *et al.* 2000). Les membres du groupe *S. putrefaciens* constituent la flore d'altération lors de la conservation du poisson sous glace fondante en conditions aérobie, alors que c'est *P. phosphoreum* qui est surtout retrouvé lors de la conservation en barquette sous atmosphère modifiée. Les membres du groupe *S. putrefaciens* ont également été décrits comme étant les organismes spécifiques d'altération des poissons marins tropicaux (Gram & Huss 1996). De façon générale, les poissons d'eau douce et les poissons tropicaux conservés sous atmosphère modifiée seraient surtout altérés par l'action de bactéries lactiques (Gram & Huss 1996).

Comme le montre la figure 2-8, le seuil de rejet du poisson par les analyses sensorielles est enregistré lorsque la charge d'organisme spécifique d'altération approche les  $10^8$  UFC/g en fin de phase exponentielle, composant la quasi-totalité de la flore bactérienne présente sur le poisson. En réalité, selon l'organisme considéré la charge s'étend entre  $10^7$  UFC/g pour *P. phosphoreum* et  $10^8 - 10^9$  UFC/g pour *S. putrefaciens* (Dalgaard 1995b). Cette étape marque également le maximum de production de molécules indicatrices d'altération (TMA, H<sub>2</sub>S, etc.) induisant les changements sensoriels.

## II. Méthodes analytiques d'évaluation de la qualité/fraîcheur du poisson

L'évolution post-mortem du poisson conduit à l'évolution de différents paramètres. Plusieurs techniques ont été développées pour suivre certains d'entre eux, elles seront présentées dans ce point.

### 1. Analyses sensorielles

La première approche utilisée pour évaluer la fraîcheur du poisson consiste à utiliser la vue, l'odeur et le toucher afin d'estimer l'état d'altération global du poisson (figure 2-9).

#### a. Une méthode d'évaluation issue de la réglementation européenne

En 1996, le conseil européen a adopté le règlement CE n°2406/96 qui fixe les « normes communes de commercialisation pour certains produits de la pêche » (Conseil européen 1996). Outre des barèmes de calibrage pour les poissons, céphalopodes et crustacés, ce règlement fixe également une méthode d'estimation de la fraîcheur selon trois catégories : Extra, A, B. Pour chacune des catégories, un ensemble de descripteurs existe permettant d'aider le juge à classer le produit dans une des catégories ou à le rejeter. Cette méthode, bien qu'il s'agisse d'une méthode réglementaire, possède un inconvénient majeur : celui de l'absence de données chiffrées pour l'évaluation des différents paramètres. Aussi l'utilisation de trois classes est extrêmement restrictive et rend difficile la définition d'un critère de fraîcheur global pour un poisson quand œil, peau, branchies et chair sont placés dans des catégories différentes.

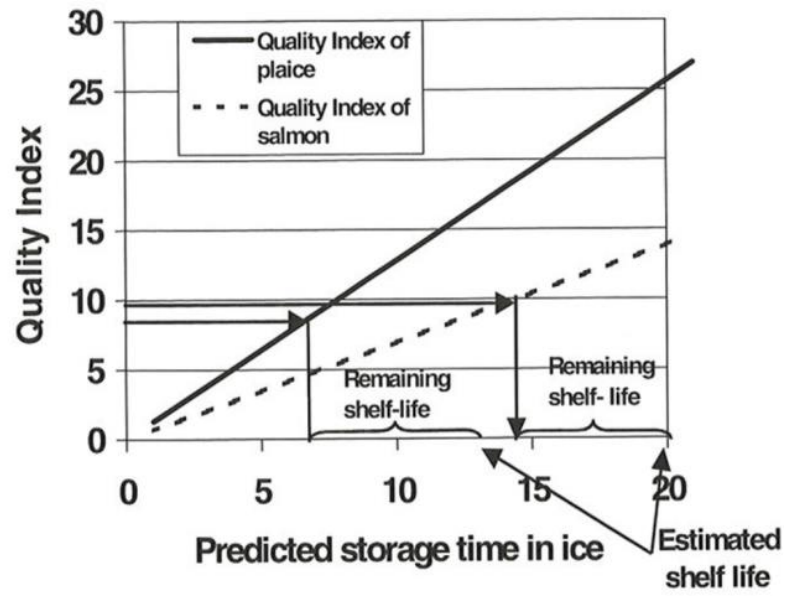


Figure 2-10 : Représentation schématique illustrant le lien entre la note QIM et le temps de conservation sous glace de plie et de saumon (Martinsdóttir *et al.* 2003).

*b. Développement du Quality Index Method (QIM)*

La méthode QIM a été développée en Australie (Bremner 1985). L'approche privilégiée par les chercheurs a été d'associer une note de démerite aux paramètres de qualité étudiés et non une classe. Plus le paramètre est altéré plus sa note est importante. Cette méthode a été développée sur un grand nombre d'espèce de consommation courante en Europe, dont le saumon, le cabillaud, le maquereau, la dorade ou encore la plie (Sveinsdottir *et al.* 2002; Martinsdóttir *et al.* 2003; Huidobro *et al.* 2000). En outre, une relation mathématique a été établie entre le QIM global et le nombre de jours conservés sous glace offrant une nouvelle dimension à l'analyse sensorielle : l'estimation du temps de conservation écoulé et du temps restant (figure 2-10). Ces estimations sont soumises à de multiples facteurs pouvant influencer la qualité initiale du produit et la cinétique d'altération (Martinsdóttir *et al.* 2003). Plusieurs études ont pu estimer les valeurs de QIM avant le rejet des poissons, une valeur proche de 15 a ainsi été définie pour le rejet de dorades conservées à  $2 \pm 1^\circ\text{C}$  ou de saumons conservés sous glace (Huidobro *et al.* 2000; Sveinsdottir *et al.* 2002). Des valeurs de QIM plus faibles ont été décrites pour le rejet de merlus conservés à  $4^\circ\text{C}$  et de filets de cabillaud conservés sous glace fondante (Baixas-Nogueras *et al.* 2003; Cardenas Bonilla *et al.* 2007). De façon générale les précisions de prédiction des méthodes sont comprises entre 1 et 2 jours (Sveinsdottir *et al.* 2002; Cardenas Bonilla *et al.* 2007), le nombre de poissons étudiés impactant la précision d'évaluation (Hyldig *et al.* 2010).

*c. Avantages et inconvénients des méthodes sensorielles*

Les méthodes sensorielles possèdent un avantage non-négligeable : celui d'utiliser les sens humains, pour évaluer l'état de fraîcheur du poisson dans sa globalité. Cette technique permet de contrôler un nombre important de paramètres qui ne peuvent être tous évalués par un automate unique. Le développement du QIM a permis d'arriver à modéliser l'altération. En outre, le projet QIM Eurofish a permis de démocratiser l'utilisation du QIM via le développement d'une application pour smartphone. Malgré cela, les analyses sensorielles présentent plusieurs inconvénients comme l'utilisation d'un panel de juges, coûteux et nécessitant une formation constante de façon à maximiser son objectivité. Un second frein au développement de telles techniques, en routine, est qu'elles sont généralement applicables à une espèce de poisson, un type de préparation et un mode de conservation. Enfin le QIM nécessite généralement l'évaluation d'un poisson entier, la méthode est donc inopérante pour l'évaluation de poissons frais transformés, sachant qu'ils représentent le double du tonnage du poisson frais entier acheté annuellement en France (FranceAgriMer 2013).

Les analyses sensorielles peuvent difficilement être utilisées en industrie compte tenu de l'ensemble des paramètres évoqués précédemment, néanmoins une technique comme le QIM est très intéressante dans le domaine de la recherche, notamment pour les développements méthodologiques dans le but d'avoir un score de qualité pour le poisson analysé.

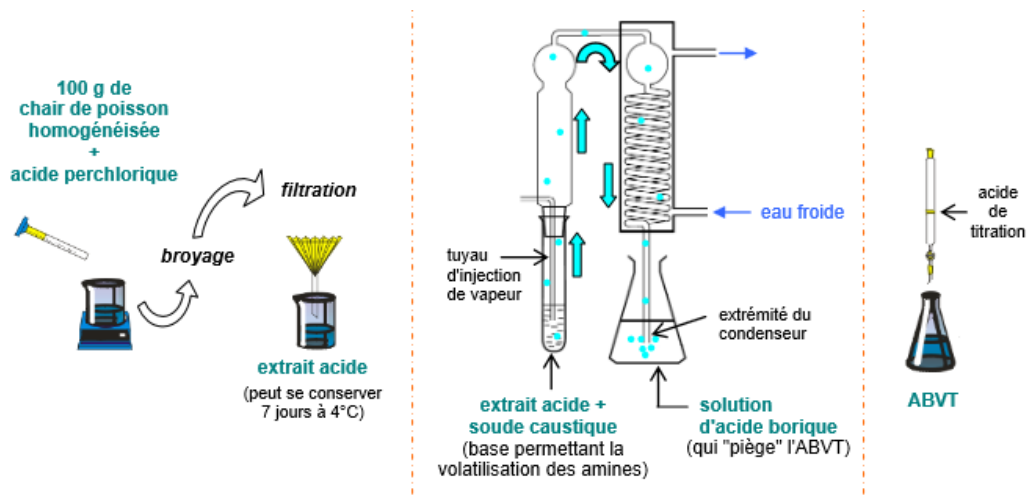


Figure 2-11 : Représentation schématique du processus analytique conduisant au dosage de l'ABVT (Ifremer 2008a).

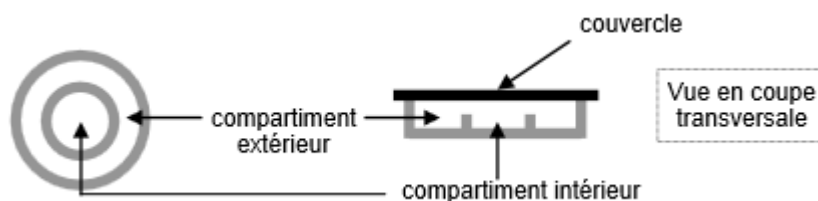


Figure 2-12 : Représentation schématique de la cellule à microdiffusion de Conway (vue de dessus et coupe transversale). (Ifremer 2008a)

Tableau II-V : Valeurs de l'ABVT (en mg d'azote pour 100g de chair) et du pourcentage P correspondant à la part de TMA dans l'ABVT pour les espèces de poissons à chair blanche telles que le bar commun, la dorade royale ou le sébaste émis par le CNERNA-CNRS (Ifremer 2008a).

Etat de fraîcheur du poisson	Valeur de l'ABVT	Valeur du %P
Satisfaisant	<20	< 17%
Acceptable	20-25	17 - 40%
Non satisfaisant	>25	> 40%

## 2. Analyses biochimiques

Parmi les composés issus de la dégradation des tissus sont retrouvés les bases volatiles, les dérivés nucléotidiques, les amines biogènes et les produits d'oxydation des lipides. Ces derniers peuvent être analysés par différentes méthodes biochimiques.

### a. Dosage de l'azote basique volatil total (ABVT)

Ammoniac, DMA, TMA ainsi que des amines primaires à faible poids moléculaire sont des molécules regroupées sous la dénomination de bases volatiles et constituent l'azote basique volatil total (Ifremer 2008a). Ces composés sont essentiellement issus de la dégradation de l'OTMA et d'acides aminés. Une des méthodes de référence pour le dosage de l'ABVT (European commission 2005b) consiste à déprotéiniser l'échantillon, puis de distiller et entraîner à l'aide d'un flux de vapeur l'ensemble des amines volatiles avant de les titrer par un acide fort (figure 2-11). Les autres méthodes de référence consistent à réaliser une distillation directe sans précipitation ou utiliser la méthode de microdiffusion de Conway (figure 2-12), plus difficile à mettre en œuvre (Timm & Jørgensen 2002).

L'ABVT permet d'évaluer l'état de fraîcheur d'un poisson entier ou transformé. Différentes valeurs de rejet ont pu être définies par la réglementation selon les espèces de poissons (European commission 2005b). En France ces valeurs sont peu utilisées, un système de catégories a été substitué, essentiellement pour les poissons maigres (Tableau II-V).

Des méthodes existent permettant également de doser plus spécifiquement ammoniac, DMA ou TMA. Elles consistent notamment en des approches de dosages colorimétriques (pour la TMA et la DMA), enzymatiques (pour le NH<sub>3</sub> et la TMA) ou de titrage d'un échantillon déprotéinisé additionné de formaldéhyde pour le dosage spécifique de la TMA (Ifremer 2008a). D'autres techniques permettent le dosage de l'ensemble des molécules de l'ABVT, ainsi une méthode d'électrophorèse capillaire permet la séparation et la quantification de l'ammoniac, la DMA, la TMA et l'OTMA (Timm & Jørgensen 2002). Des méthodes de chromatographie gazeuse ont également été développées avec une bonne sensibilité de détection des molécules volatiles (Veciana-Nogues *et al.* 1996; Chan *et al.* 2006).

La mesure de l'ABVT par la méthode de référence est rapide et simple à réaliser, néanmoins la méthode reste peu fiable pour les premiers jours d'altération des poissons (Huss 1999). D'autres inconvénients pour la mesure d'ABVT ont été décrits comme la limitation à certaines espèces, à certains types de conservation, ou l'impossibilité d'évaluer des produits transformés (Ifremer 2008b). Une dernière limite la méthode de référence est son absence de sélectivité vis-à-vis des différents composants de l'ABVT. Ce paramètre a été en partie résolu par l'utilisation de méthodes chromatographiques sélectives et sensibles, comme la GC/MS, mais elles nécessitent une phase de préparation importante et l'utilisation de solvants dangereux (Veciana-Nogues *et al.* 1996).

### b. Dosage des dérivés nucléotidiques

L'ATP et les métabolites issus de sa dégradation sont des indicateurs pertinents pour

$$K(\%) = \frac{[Inosine] + [Hypoxanthine]}{[ATP] + [ADP] + [AMP] + [IMP] + [Inosine] + [Hypoxanthine]} \times 100 \quad \text{(a)}$$

$$K' = \frac{[Inosine] + [Hypoxanthine]}{[IMP] + [Inosine] + [Hypoxanthine]} \times 100 \quad \text{(b)}$$

Figure 2-13 : Formules établissant la valeur du facteur K (a) permettant d'estimer la fraîcheur d'un poisson et celle du facteur K' (b), forme simplifiée du facteur K.

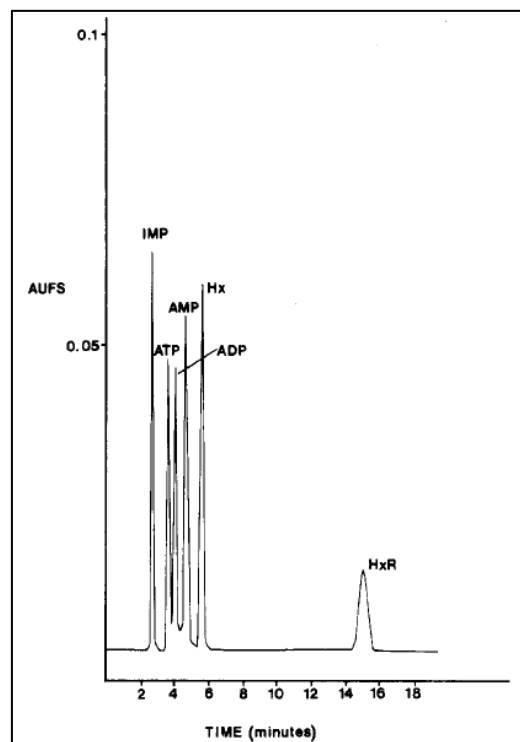


Figure 2-14 : Profil chromatographique obtenu lors de la séparation de l'ATP et de ses catabolites par HPLC. Avec : Hx, l'hypoxanthine et HxR l'inosine. (Ryder 1985)

l'estimation de la fraîcheur du poisson (cf. Chapitre 2 I.). Le facteur K, développé par Saito *et al.* (1959), permet de calculer la part de métabolites finaux de l'ATP (*i.e* inosine et hypoxanthine) par rapport à l'ensemble des concentrations de l'ensemble composé de l'ATP et de ses dérivés (figure 2-13). Néanmoins les étapes initiales de dégradation de l'ATP étant très rapides (Saito *et al.* 1959; Henehan *et al.* 1997; Karube *et al.* 1984), il a été suggéré de simplifier le ratio par un autre facteur ( $K'$  ou  $K_1$ ) (Henehan *et al.* 1997; Howgate 2006). Les facteurs K et  $K'$  sont de bons indicateurs de l'état de fraîcheur du poisson, leurs valeurs augmentent de façon quasi linéaire tout au long de la conservation (Henehan *et al.* 1997; Gonçalves *et al.* 1997)

Deux types de techniques analytiques principales permettent de quantifier l'ATP et ses métabolites : les méthodes enzymatiques et les méthodes chromatographiques. Les méthodes enzymatiques utilisent des enzymes catalysant la dégradation de l'IMP, l'inosine et l'hypoxanthine. La détection peut être réalisée selon différentes méthodes comme le suivi de la consommation de dioxygène par des sondes (Freshness Meter, BIOFRESH system, etc.), l'utilisation de bandelettes test (Henehan *et al.* 1997) ou plus récemment la production de NADH (PRECICE® Freshness Assay). La première méthode chromatographique (figure 2-14) permettant la séparation de l'ATP et de ses catabolites fait suite à des travaux de Ryder (1985). Elle permet à partir d'une préparation simple de l'échantillon de réaliser une séparation en phase inverse par HPLC, la phase mobile étant composée d'un tampon phosphate et la détection étant réalisée dans l'UV.

Si le facteur K est un outil intéressant de mesure indirecte de la fraîcheur par le dosage de catabolites des nucléotides, il n'en demeure pas moins limité par plusieurs facteurs. Ainsi, des variations importantes du facteur K ont été reportées en fonction des individus (maturité, sexe), des méthodes de pêche, de l'état de fatigue du poisson, de la méthode d'abattage ou du mode de stockage, un phénomène de lixiviation pouvant être observé (Henehan *et al.* 1997; Howgate 2006).

### c. Dosage des amines biogènes

Les amines biogènes sont des molécules issues de la décarboxylation d'acides aminés, essentiellement sous l'action d'enzymes bactériennes (Santos 1996). Parmi les amines biogènes isolées dans les poissons sont notamment retrouvées l'histamine, la putrescine, la cadavérine et la tyramine. Ces amines proviennent respectivement de la décarboxylation de l'histidine, l'ornithine, la lysine et la tyrosine (Huss 1999). L'histamine est l'amine biogène responsable d'une intoxication alimentaire spécifique des produits de la pêche appelée intoxication scombroid (Lehane & Olley 2000) qui touche particulièrement la chair des Scombridés, Clupéidés et Engraulidés. Les espèces bactériennes productrices d'histamine sont bien renseignées dans la littérature, ainsi *Hafnia halvei*, *Raoultella planticola*, *Morganella morgani*, *Morganella psychrotolerans* ou encore *Photobacterium phosphoreum* ont été décrits productrices d'histamine (Kanki *et al.* 2004; Emborg *et al.* 2006; Ferrario *et al.* 2012).

$$AI' = \frac{[Hist] + [Put] + [Cad]}{[Hist] + [Put] + [Cad] + [Spd] + [Spm] + [Tyra] + [Tryp] + [Meth]} \times 100$$

$$\text{Indice de qualité} = \frac{[Histamine] + [Putrescine] + [Cadavérine]}{1 + [Spermidine] + [Spermine]}$$

Figure 2-15 : Formule permettant de définir l'amine index (AI') en fonction des concentrations en histamine (Hist), putrescine (Put), cadavérine (Cad), spermidine (Spd), spermine (Spm), tyramine (Tyra), tryptamine (Trp) et en méthylamine (Meth) (Duflos *et al.* 1999). La formule de l'indice de qualité valable pour des canettes de thon, défini par Mietz & Karmas (1977), est donnée ensuite.



Plusieurs méthodes existent permettant le dosage des amines biogènes, mais la méthode la plus utilisée est l'HPLC. Parmi les nombreuses méthodes développées, sont notamment retrouvées la chromatographie sur couche mince (Jeya Shakila *et al.* 2001), la méthode ELISA par compétition (Marcobal *et al.* 2005), l'électrophorèse capillaire (Kovács *et al.* 1999) ou la chromatographie gazeuse (Laleye *et al.* 1987).

L'HPLC est une technique chromatographique utilisée par un nombre important de méthodes de quantification des amines biogènes. Celles-ci diffèrent surtout selon plusieurs paramètres comme la préparation de l'échantillon, l'existence de modification en amont ou aval de la colonne et selon la méthode de détection (Duflos *et al.* 1999; Dadáková *et al.* 2009; Šimat & Dalgaard 2011). La méthode HPLC fait référence pour le dosage de l'histamine au sein de l'union européenne. D'un point de vue réglementaire, un poisson ayant une teneur en histamine inférieure à 100 ppm ou un produit ayant subi une maturation enzymatique avec une concentration inférieure à 400 ppm sont considérés comme acceptables (European commission 2007, 2013).

L'utilisation des amines biogènes pour évaluer la fraîcheur d'un produit est intéressante d'autant plus qu'elle est le reflet de l'activité d'une partie de la flore d'altération et permet d'évaluer la sécurité sanitaire du produit. Quelques études ont permis de modéliser l'évolution des amines biogènes via le calcul d'indice comme l'amine index ou indice de qualité (figure 2-15). Malgré de bonnes corrélations avec les indices de fraîcheur (Duflos *et al.* 1999), ces indices restent peu utilisés. La principale limite réside dans les variations de la teneur en amines biogènes d'une espèce à l'autre et même d'un poisson à l'autre, cela résultant de variations de la teneur en acides aminés libres (*cf.* Chapitre 1 II.). Enfin la méthode de conservation, notamment à température basse, peut réduire les cinétiques des flores histaminogènes, sans empêcher le déroulement d'autres processus d'altération (Huss 1999).

#### *d. Mesure de l'oxydation des lipides*

Comme vu dans le point I.2., dès la mort du poisson, les lipides vont subir une oxydation. Celle-ci entraîne rancissement de la chair qui peut être mesuré, par le suivi de la synthèse de produits intermédiaires ou finaux, à l'aide de plusieurs techniques. Parmi les techniques les plus utilisées sont retrouvés l'indice de peroxyde, les techniques spectrométriques et la mesure des TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) (Olafsdottir *et al.* 1997).

L'utilisation des produits de l'oxydation des lipides ne s'avère pas être un outil adéquat pour évaluer la fraîcheur des poissons, car seul un seuil à 10 µmoles éq. malondialdéhyde/kg poisson a pu être établi avant le développement d'une flaveur rance marquée (Ke *et al.* 1976). De plus, la présence d'une valeur faible d'indice de peroxyde reste ambivalente.

### **3. Analyses microbiologiques**

Le poisson, en cours d'altération, est le lieu d'un développement bactérien. Suivant la réglementation, seuls des indicateurs de sécurité sanitaire et non de fraîcheur ont été définis.

Tableau II-VI : Critères microbiologiques applicables aux produits de la pêche d'après les règlements CE 2073/2005 et CE 1441/2007.

Genres microbiens	Critères microbiologiques
<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 g
<i>E.coli</i>	1 à 10 UFC/g
<i>Staphylococcus</i>	100 à 1000 UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	100 UFC/g

Tableau II-VII : Critères microbiologiques recommandés par la fédération des entreprises du commerce et de la distribution (FCD) pour les produits à base de poissons frais ou transformés.

Denrées	Germes bactériens	Critères microbiologiques
Filets de poissons crus, frais ou surgelés	<i>E.coli</i>	10 UFC/g
	Staphylocoques à coagulase positive	100 UFC/g
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 g
	<i>Vibrio</i> pathogènes	Absence dans 25 g
	<i>L.monocytogenes</i> *	Absence dans 25 g ou 100 UFC/g**
Préparations à base de filets de poisson, hachées crues	Flore aérobie à 30°C	10 <sup>5</sup> UFC/g
	<i>E.coli</i>	10 UFC/g
	Staphylocoques à coagulase positive	100 UFC/g
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 g
	<i>Vibrio</i> pathogènes	Absence dans 25 g
	<i>L.monocytogenes</i> *	Absence dans 25 g ou 100 UFC/g**

\* Flore réglementée par les règlements européens

\*\* Critère évoluant en fonction du lieu d'évaluation sortie de fabrication et mise sur le marché

**a. Un outil caractérisant essentiellement la sécurité sanitaire**

Les critères microbiologiques sont des bons indicateurs de la qualité du produit à travers la caractérisation de la sécurité sanitaire de ce dernier. Aussi, dès la fin des années 1970 différents critères microbiologiques ont pu être établis ([Journal officiel de la République Française, 1979](#)). Parmi les critères établis pour les produits de la pêche, étaient retrouvés :

- la recherche d'indicateurs généraux d'hygiène comme la flore aérobie totale à 30°C.
- la recherche d'indicateurs de contamination humaine ou environnementale comme les coliformes totaux, streptocoques fécaux ou la présence de staphylocoques.
- la recherche de pathogènes potentiels comme les bactéries du genre *Salmonella* ou les flores sulfito-réductrices.

Suite à l'avènement du « paquet hygiène » visant à uniformiser les législations européennes et rendre la politique d'hygiène de l'alimentation plus transparente, les années 2000 ont vu de nombreux critères être supprimés dans différents règlements CE ([European commission 2005a, 2007](#)) ([Tableau II-VI](#)). A l'exception des critères pour *L.monocytogenes*, la quasi-totalité des critères ne concerne pas directement les poissons.

Cette modification a été suivie par la mise en place, par les industriels, des nouveaux critères microbiologiques ([Tableau II-VII](#)) dont beaucoup ne répondent pas à une obligation réglementaire.

**b. Approches microbiologiques pour l'estimation de la fraîcheur**

Si les techniques microbiologiques existent et attestent de la qualité du poisson par l'intermédiaire de la sécurité sanitaire, il existe peu de techniques pour évaluer la fraîcheur. Des études ont montré via des approches de modélisation qu'il est possible de suivre la durée de conservation restante en se focalisant sur *P. phosphoreum*, organisme spécifique d'altération du poisson conservé sous atmosphère modifiée ([Dalgaard 1997](#)). Des approches statistiques ont également montré une anti-corrélation claire (-0.9) entre le temps de conservation restant et la quantité de diverses flores présentes dans la chair de poissons conservés dans différentes atmosphères modifiées ([Koutsoumanis et al. 1997](#)). Enfin, des études de dénombrement de la flore produisant de l'H<sub>2</sub>S, supposée être *S. putrefaciens*, ont également montré des bonnes corrélations avec le temps de conservation résiduel ([Capell et al. 1997](#)).

Malgré l'existence de corrélations établies et de certains modèles développés pour la prédiction de l'état de fraîcheur du poisson ([Dalgaard 1995a, 1997](#); [Taoukis et al. 1999](#)), y compris en conditions dynamiques, l'utilisation de techniques microbiologiques n'est pas appropriée, près de trente paramètres pouvant induire des variations dans les résultats [Gibson & Ogden \(1997\)](#). Ces auteurs recommandent une standardisation des paramètres, même si certains le seront difficilement comme les milieux de culture de composition empirique. Le second frein à l'utilisation de telles méthodes est le temps nécessaire avant l'obtention de résultats, en effet certaines méthodes nécessitent des temps longs d'incubations ; or en matière de fraîcheur, le préalable au développement de toute méthode

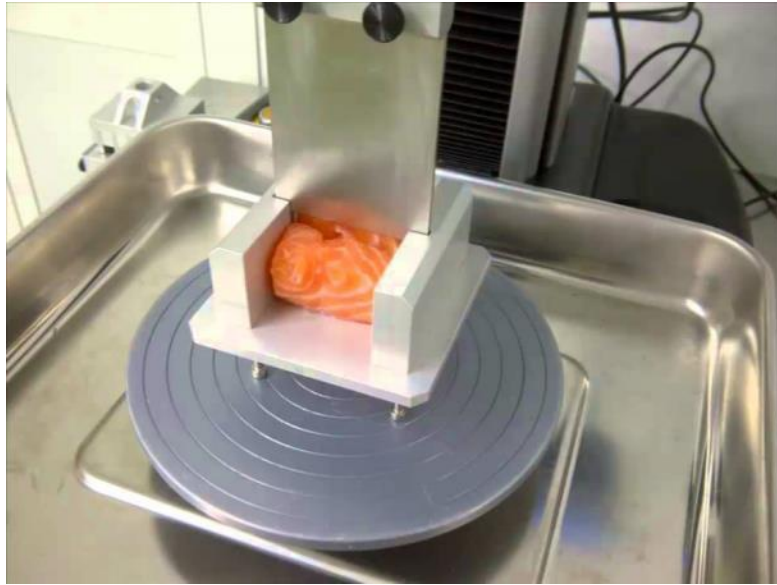


Figure 2-16 : Texturomètre équipé d'un dispositif permettant de réaliser le test de Warner-Bratzler sur un échantillon de saumon.

d'analyse est l'obligation d'un résultat rapide. Une technique a été décrite s'affranchissant du dénombrement sur boîtes de Petri, elle utilise la mesure de conductance d'un milieu enrichi en OTMA pour la croissance de *P. phosphoreum* (Dalgaard 1997), néanmoins, le temps d'analyse reste compris entre quinze et cinquante heures.

Si ces techniques ne sont pas appropriées pour l'évaluation de la fraîcheur, elles n'en demeurent pas moins un bon outil pour le développement et l'évaluation de méthodes de conservation. De plus, l'avènement de nouvelles techniques, comme la réaction de polymérisation en chaîne, en lien avec la microbiologie, sont prometteuses (cf. Chapitre 4).

#### **4. Analyses physiques**

Une dernière famille de méthodes utilisées pour évaluer la fraîcheur du poisson est celle des méthodes physiques avec notamment la mesure de la texture, des propriétés électriques du muscle et l'analyse d'image.

##### **a. Mesure de la texture**

Une des premières méthodes physiques consiste à étudier la texture du poisson en utilisant des paramètres des approches sensorielles. En effet, en cours d'altération, la chair de poisson se relâche pour adopter une texture molle caractéristique. Plusieurs méthodes ont été développées en se basant sur différents principes (Sánchez-Alonso *et al.* 2010). Le principe général des texturomètres consiste à mesurer la force de réaction d'un aliment suite à une déformation qui lui est imposée. Les tests développés pour l'analyse des produits de la mer sont essentiellement empiriques, *i.e* mesures instrumentales corrélées à des tests sensoriels (Careche *et al.* 2003; Sánchez-Alonso *et al.* 2010).

De nombreux tests existent pour évaluer la texture d'un aliment, comme le test de Kramer et Warner-Bratzler qui utilise des lames passant à travers l'aliment (figure 2-16), la texture  $y$  est évaluée en mesurant les forces de compression/cisaillement. D'autres tests comme le test de pénétration avec un poinçon, de compression relaxation ou le profil textural ont été développés. Les mesures de force/déformation ont pu être corrélées avec des appréciations sensorielles comme la dureté, la cohésion, la souplesse, l'adhésivité, la fragilité ou l'aptitude à être mastiquée (Sánchez-Alonso *et al.* 2010).

L'utilisation de tests de compression-relaxation, a montré de bonnes corrélations entre les données d'évaluations sensorielles et les données mesurées par l'automate lors de suivis de poissons stockés sous glace ou sous forme congelée (Careche *et al.* 2003). L'analyse du profil textural de poissons en cours de conservation a été étudié, mais seul le paramètre de dureté possède une bonne corrélation avec les analyses sensorielles (Caballero *et al.* 2009; Sánchez-Alonso *et al.* 2010). En revanche ces techniques sont répandues pour évaluer la qualité de gels de surimis (Tahergorabi *et al.* 2012; Debusca *et al.* 2014).

La texture résulte de la combinaison et de l'interaction de nombreux facteurs en partie méconnus, rendant la mesure instrumentale plus compliquée (Cheng *et al.* 2014). De nombreux facteurs influencent la texture du muscle : l'espèce tout d'abord, puis l'état biologi-



Figure 2-17 : Illustration de l'utilisation d'un Torry meter pour mesurer l'état d'altération d'un poisson entier.

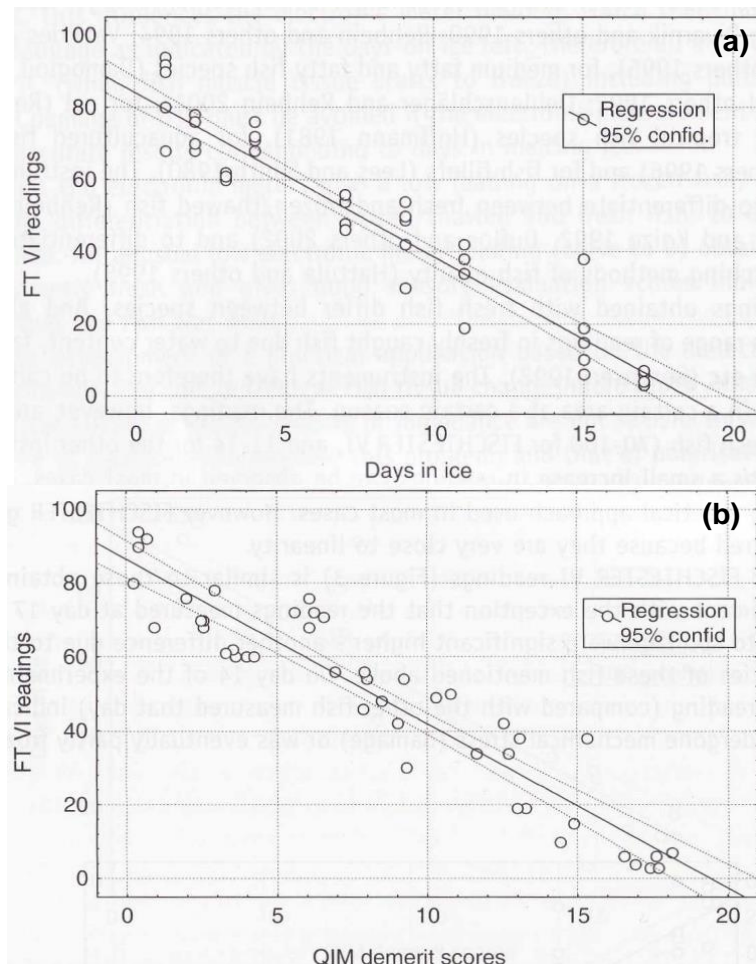


Figure 2-18 : Corrélations enregistrées entre les valeurs issues de mesures réalisées sur du cabillaud entier stocké sous glace fondante par le Fischtester VI et le nombre de jours de conservation (a) ou les notes QIM obtenues (b). (Oehlenschläger *et al.* 2003)

que du poisson, la méthode de pêche, d'abattage, de transformation ou de stockage [Sánchez-Alonso et al. \(2010\)](#). Il est important de noter que la zone testée doit être standardisée de façon à pouvoir comparer les résultats obtenus. Les mesures de textures peuvent aussi bien être réalisées sur des poissons entiers ou sous forme de filet ([Careche et al. 2003](#)).

**b. Suivi des propriétés électriques du muscle**

Une seconde approche physique s'est basée sur la mesure des propriétés diélectriques du muscle. Lors de l'altération, une lyse cellulaire est observée libérant le contenu cytoplasmique, riche en électrolytes, dans l'espace inter-cellulaire ([Oehlenschläger et al. 2003](#)). Ceci induit une modification des propriétés diélectriques du muscle, notamment de sa résistance et sa capacité électrique ([Oehlenschläger et al. 2003](#)). Ces mesures ont été corrélées avec des analyses sensorielles réalisées sur du poisson, la résistance électrique diminuant et la conductivité augmentant en cours d'altération. ([Oehlenschläger et al. 2003](#)).

Le principal instrument ayant été développé et breveté ([figure 2-17](#)) est le Torry meter ([Lees et al. 1972](#)), deux autres instruments ont également vu le jour le Fischtester VI et le RT-Freshtester ([Oehlenschläger et al. 2003](#); [Ozogul 2010](#)).

Une étude menée sur du cabillaud entier a montré de bonnes corrélations avec le nombre de jours stockés sous glace (0,95) et la note de QIM attribuée (0,94) ([figure 2-18](#)). La saison et le lieu de pêche n'ont pas eu d'impact sur les mesures comme cela a été décrit dans une approche complémentaire. D'autres espèces ont été étudiées et ont conduit à des résultats ambivalents concernant l'évolution du signal électrique en fonction des jours de conservation ([Lougovois et al. 2003](#); [Tejada et al. 2007](#)).

La mesure des propriétés diélectriques des muscles de poissons en phase post-mortem est un outil intéressant, rapide, corrélé aux observations sensorielles, non destructif et offrant des cadences d'analyse importantes, grâce à l'utilisation de certains appareils ([Oehlenschläger et al. 2003](#); [Ozogul 2010](#)). Néanmoins, elle ne fonctionne efficacement que sur des poissons entiers avec peau, l'évaluation de la qualité de filets de poisson n'étant pas satisfaisante et limitée à cinq jours après la capture du poisson ([Oehlenschläger et al. 2003](#)). Ensuite, différentes études ont montré que le lavage des poissons à l'eau de mer impactait le signal mesuré, de plus ce type de mesure n'est pas approprié pour les poissons gras ou ceux ayant subi une étape de décongélation ([Ozogul 2010](#); [Duflos et al. 2002](#)).

**c. Analyse d'image et altération du poisson**

Le dernier type d'analyse physique pour l'évaluation de la fraîcheur du poisson est l'analyse d'image.

Le principe général de l'analyse d'image fait appel à des standards internationaux définissant les paramètres L (luminosité), a (position chromatique sur l'axe vert-rouge) et b (position chromatique sur l'axe bleu-jaune) comme référence s'affranchissant ainsi de biais inhérents à l'appareil de mesure ([Dupont & Steen 2004](#); [Schubring 2010](#)). Plusieurs types d'appareil mesurant la couleur ont été développés notamment les colorimètres trichromati-

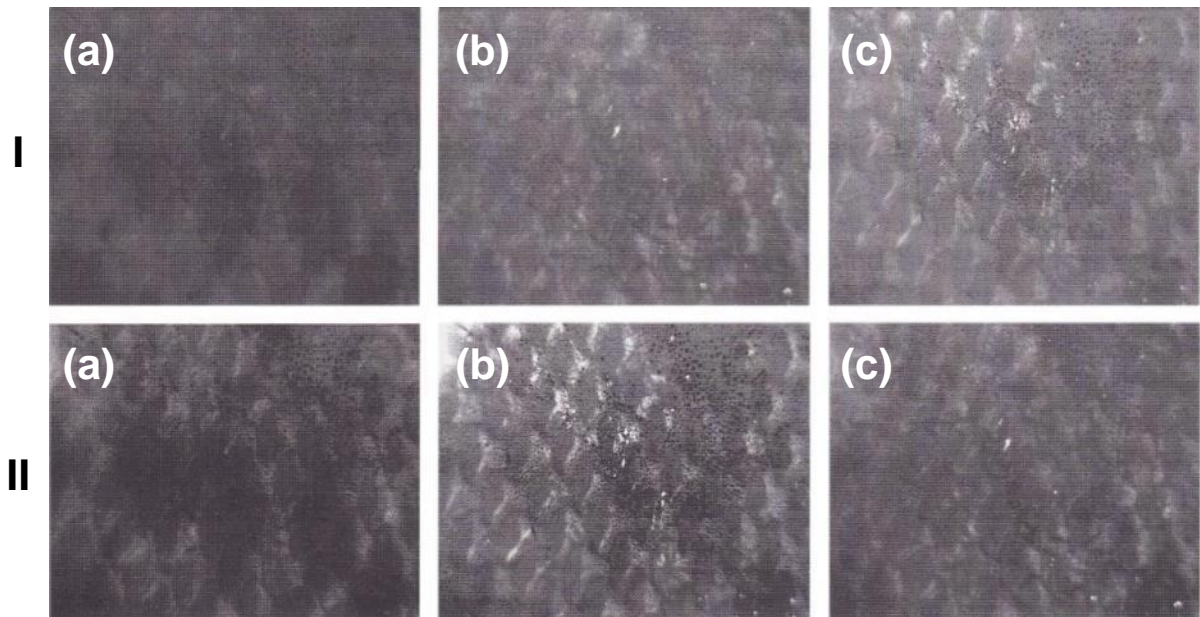


Figure 2-19 : Séries d'images de peau de poissons obtenues à des longueurs d'ondes de 400 nm (a), 660 nm (b) et 940 nm (c). La série I correspond aux images brutes et la série II aux images à l'issue du processus de calibration.(Kröger 2003)

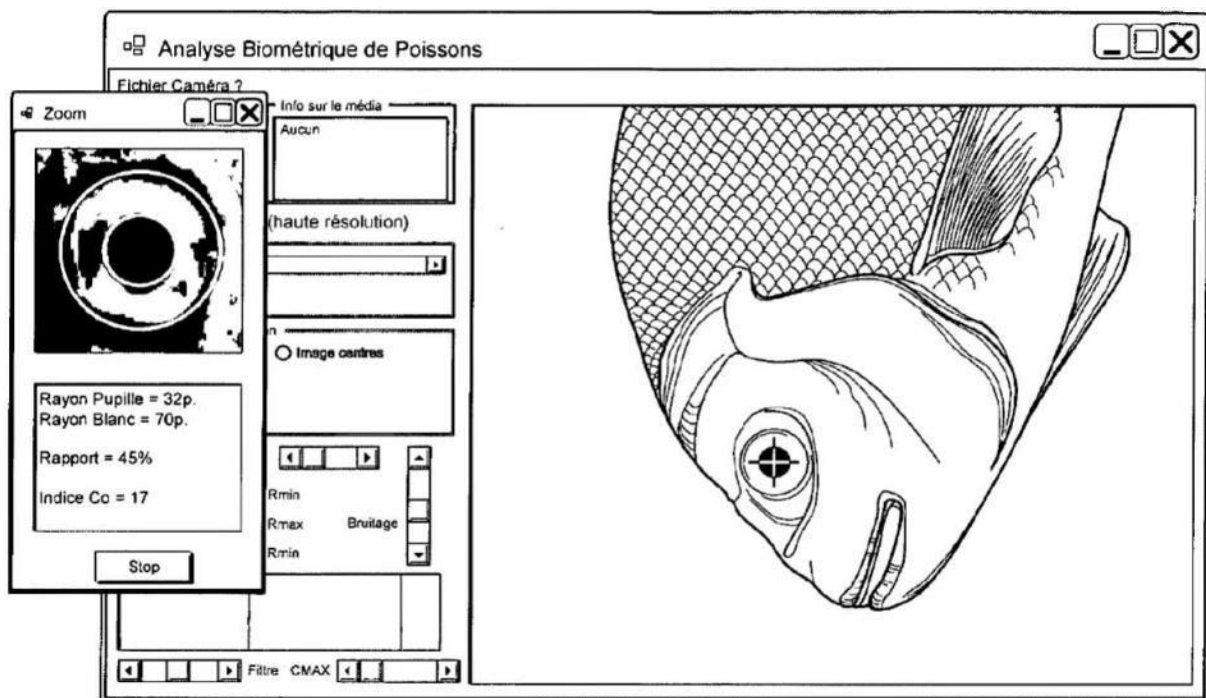


Figure 2-20 : Extrait du brevet européen EP 2 189 789 A1 illustrant une copie d'écran du système permettant l'analyse de l'œil de poissons par approche biométrique. (Autheman & Widmann 2010)



ques et les spectrophotomètres. Le principe de fonctionnement de ces appareils consiste à éclairer l'échantillon et mesurer la lumière émise directement par l'échantillon ou après passage à travers un réseau de diffraction (Schubring 2010). Enfin, une dernière approche consiste à éclairer l'échantillon par une lumière monochromatique, à différentes longueurs d'ondes (figure 2-19), et de former, après une étape de calibration, ainsi une image composée de plusieurs couches issues des prises de vue aux longueurs d'ondes données (Kröger 2003).

Plusieurs études colorimétriques ont évalué des critères de qualité comme la couleur de la chair de saumon et de bâton de surimi, les effets de la cuisson, du fumage, de l'adjonction de gaz dans l'emballage ou encore l'évolution des paramètres L, a, b lors du stockage de poissons (Schubring 2010). Concernant les analyses de suivis d'altération, les résultats varient d'une étude à l'autre.

Des études sur des filets de bar conservés ou non sous atmosphères modifiées ont montré des différences non-significatives du paramètre L en cours d'altération. En revanche les différentes atmosphères testées conduiraient à une évolution significative des paramètres a et b (Poli *et al.* 2006; Torrieri *et al.* 2006). Dans le cadre de poissons gras, l'étude de l'indice de rougeur, ratio a/b, en cours d'altération a montré une évolution significative lors des neuf premiers jours de l'étude Chaijan *et al.* (2005). Dans le cadre de l'étude d'images monochromatiques la combinaison d'images de trois longueurs d'ondes permet le bon classement de 90% des images de peau et 80% pour celles de la chair en fonction des jours d'altération (Kröger 2003), mais le calibrage préalable est important.

Une approche récente s'est attachée à utiliser les techniques de biométrie (figure 2-20) dans le but de développer un outil de caractérisation de la fraîcheur du poisson (Autheman & Widmann 2010). Ce système permet après détection des contours de l'œil de situer la pupille du poisson. A l'aide d'une analyse de l'image le dispositif détecte deux zones : celle de la transition pupille/blanc de l'œil et celle du passage de la zone blanc de l'œil/extérieur. Les créateurs de ce système notent que la taille de la zone du blanc de l'œil a tendance à augmenter au cours de l'altération.

Les analyses d'images possèdent un avantage non négligeable, celui d'être non-destructrices et rapides grâce à l'acquisition et le traitement automatique des images, cependant dans de nombreux cas les images de peau donnent des résultats plus significatifs que ceux de la chair. L'inconvénient majeur de ces méthodes est donc la nécessité d'avoir un poisson entier ou un filet avec peau selon les cas.

Au cours de ce chapitre, l'évolution post-mortem de la chair de poisson et les méthodes analytiques visant à la mesurer ont été abordées. L'analyse sensorielle reste sans doute la méthode la mieux adaptée pour évaluer la fraîcheur d'un poisson, mais est soumise à la subjectivité des juges. De nombreuses méthodes chimiques, microbiologiques et physiques ont été développées, mais elles possèdent toutes des limites. Généralement, les au-

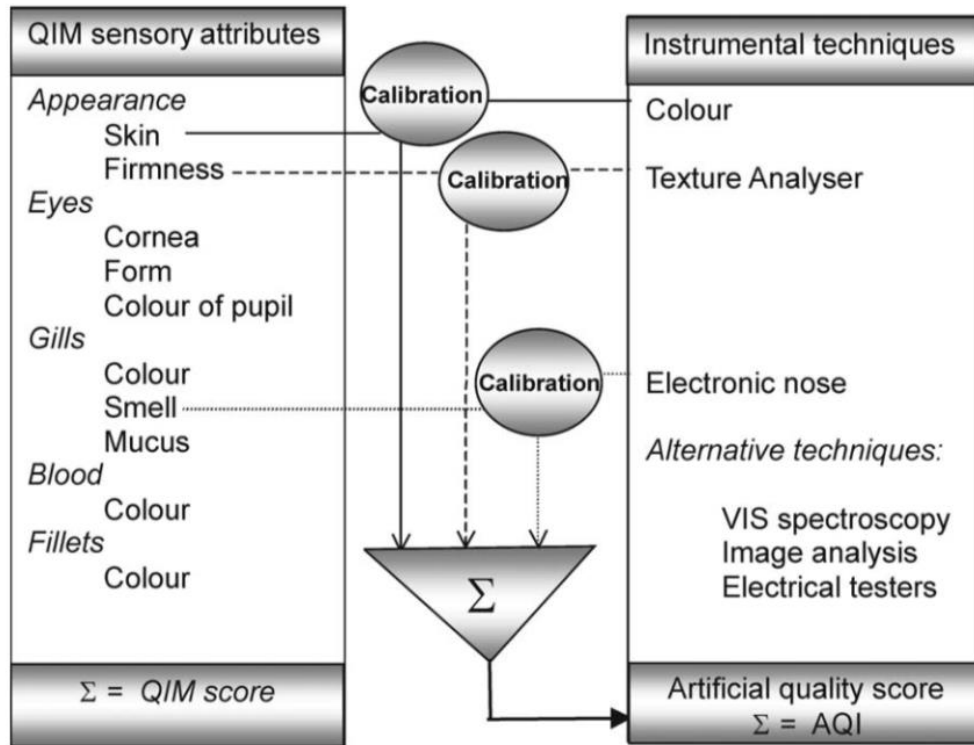


Figure 2-21 : Représentation schématique des équivalences entre méthodes sensorielles et méthodes instrumentales pour l'évaluation de la fraîcheur du poisson et le développement de l'AQI. (Olafsdottir et al. 2004)

teurs recommandent d'utiliser au minimum deux méthodes pour évaluer la fraîcheur d'un poisson. Suite à ces observations, une idée a émergé, celle d'une machine capable de reproduire l'analyse sensorielle à travers ces composantes d'évaluation de la texture, de l'odeur et de l'aspect du poisson. Le projet européen MUSTEC ([Nesvadba 2003](#)), Multi-sensor techniques for monitoring the quality of fish, a eu pour but de développer l'AQI ou Artificial Quality Index ([figure 2-21](#)). L'AQI a été développé en se basant sur des données provenant de texturomètre, analyseur d'images, nez électronique et appareil mesurant les propriétés électriques. Le projet MUSTEC n'a pas, à l'heure actuelle, débouché sur un appareil commercial, néanmoins, l'AQI mesuré offre une robustesse équivalente au QIM. Parmi les nombreuses technologies impliquées dans le projet, celle du nez électronique a été utilisée pour mesurer la composition en composés volatils odorants et tenter de la corrélérer à la qualité. Ce type d'approche fera l'objet du [Chapitre 3](#) où le lien entre odeur et qualité du poisson sera discuté.

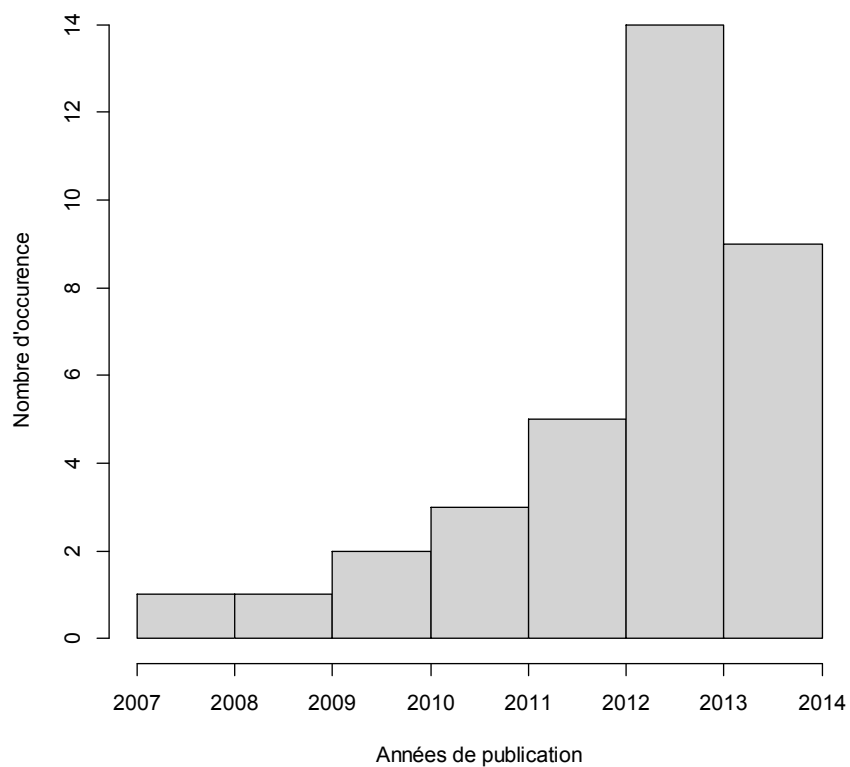


Figure 3-1 : Occurrence du mot volatilome au sein d'articles scientifiques en fonction de l'année de publication. Suivi réalisé à l'aide de Google Scholar (Juillet 2014)

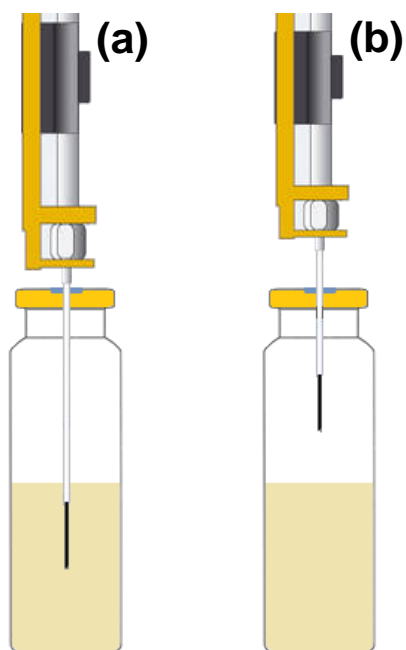


Figure 3-2 : Représentations schématiques des deux utilisations possibles d'une fibre de SPME. (a) collection des composés par immersion et (b) collection des composés volatils dans l'espace de tête

---

## Chapitre 3. Etude du volatilome pour évaluer la qualité/fraîcheur du poisson frais ou transformé

La notion de volatilome est une notion relativement nouvelle au sein de la communauté scientifique évoquée pour la première fois en 2007 (Maffei *et al.* 2007), en effet à l'heure actuelle, seule une trentaine de publications contiennent ce terme (figure 3-1). Elle s'inspire de la terminologie des -omiques, thématiques comprenant notamment :

- La protéomique : étude de l'ensemble des protéines d'un organisme et de leurs variations qualitatives et quantitatives selon différents facteurs. Cette thématique utilise notamment l'électrophorèse bidimensionnelle et le MALDI-TOF (Pazos *et al.* 2011).
- La transcriptomique : étude des ARN messagers synthétisés par des cellules et leurs variations quantitatives en fonction de différents facteurs. Cette thématique s'est accrue avec l'avènement du screening haut-débit sur biopuce.
- La métabolomique : étude qualitative ou quantitative de l'ensemble des produits synthétisés par une cellule (protéines, sucres, acides gras, etc.). Cette thématique utilise des techniques chromatographiques, la RMN ou la spectrométrie de masse. Le volatilome est une sous-partie de la métabolomique, pouvant être défini comme l'ensemble des composés volatils produits par une matrice (organisme vivant ou non), pour une condition donnée.

### I. Les outils de la caractérisation du volatilome

L'analyse des composés volatils odorants trouve de nombreuses applications parmi lesquelles la parfumerie, la cosmétique, l'industrie pharmaceutique ou agroalimentaire. Un nombre important d'outils existe pour analyser les composés volatils présents au sein d'une matrice.

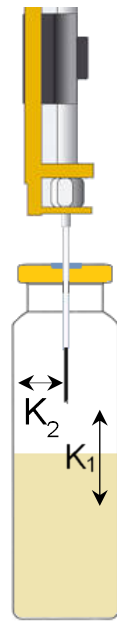
#### 1. L'extraction des composés volatils : préalable à l'analyse

Avant d'être analysés les composés doivent être extraits, selon plusieurs techniques, de leur matrice initiale et concentrés avant d'être appliqués dans le module d'analyse. Différentes méthodes d'extractions existent comme l'extraction liquide-liquide, en phase solide ou celle moins répandue en fluide supercritique (Hennion 1999; Baudot *et al.* 2001; Pourmortazavi & Hajmirsadeghi 2007). Si elles sont techniquement applicables pour l'extraction de composés volatils, elles sont de moins en moins utilisées, supplantées par de nouvelles techniques d'extraction de l'espace de tête également appelé headspace.

##### a. L'espace de tête statique

L'espace de tête est une technique d'extraction de composés volatils généralement réalisée dans des flacons, pouvant être opérée à partir d'une matrice solide ou liquide, en concentrant les espèces volatiles dans la partie gazeuse (figure 3-2).

La notion d'espace de tête statique consiste à collecter les composés volatils à l'aide de différentes méthodes : fibre SPME, seringue à gaz ou sac Tedlar®, au sein d'un système



$$K_1 = \frac{[X]_E}{[X]_H}$$

$$K_2 = \frac{[X]_H}{[X]_F}$$

Figure 3-3 : Représentation schématique des deux étapes de partition enregistrées lors d'une extraction par une fibre SPME, avec  $K_1$  le coefficient de partition entre l'échantillon et l'headspace et  $K_2$  celui entre l'headspace et la fibre.

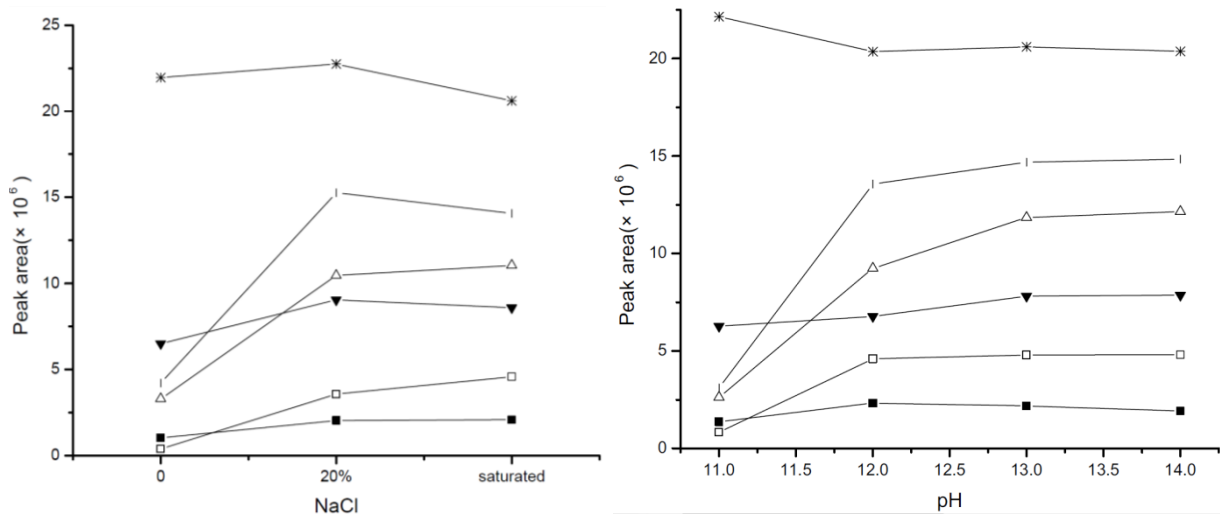


Figure 3-4 : Graphiques illustrant l'impact de la concentration en sel et du pH sur la valeur d'aire de différents composés volatils. (Li *et al.* 2004). Avec \* la tri-n-butylamine, | la di-n-butylamine,  $\Delta$  la triéthylamine,  $\nabla$  la tri-n-propylamine,  $\square$  la n-butylamine et  $\blacksquare$  la TMA.

fermé. LA SPME est une seringue terminée par une fibre recouverte d'une phase solide adsorbante. Le collecteur est introduit dans l'espace de tête ou directement plongé dans un liquide (figure 3-2), permettant l'absorption ou l'adsorption des composés volatils durant une période définie. La dernière étape consiste à l'introduire dans l'injecteur du système d'analyse et d'expulser ou désorber les composés, mécaniquement ou par augmentation de la température (Rouessac & Rouessac 2000). En outre, deux intérêts majeurs conférés par cette technique, par rapport aux approches similaires, sont l'absence de solvants et la diminution du temps d'extraction (Arthur & Pawliszyn 1990).

Aujourd'hui la SPME est la technique la plus répandue pour l'analyse en headspace statique. Comme le montre la figure 3-3, son utilisation fait intervenir deux phases de partition/équilibre : entre l'échantillon et l'espace de tête ( $K_1$ ) puis entre l'espace de tête et la fibre ( $K_2$ ). Ces propriétés de partition dépendent de chaque composé chimique. Plusieurs paramètres permettent d'agir sur le coefficient  $K_1$  comme la durée d'extraction, sa température, la concentration en sels inorganiques du milieu et le pH. La température permet de déplacer l'équilibre vers la phase gazeuse que compose l'espace de tête. En général, plus la température d'extraction est faible plus le temps nécessaire à l'équilibre est important (Jia *et al.* 1998; Li *et al.* 2004). Le coefficient  $K_2$  est également soumis à l'action de la température, ainsi, l'augmentation de la température conduit à la désorption des composés à partir de la fibre (Jia *et al.* 1998). Le choix de la valeur du couple temps/température résulte généralement d'un compromis, de façon à maximiser le signal de détection (Balasubramanian & Panigrahi 2011). Un second paramètre permettant de contraindre l'équilibre vers la phase gazeuse est l'addition de sel inorganique dans la solution contenant les composés volatils, ceux-ci permettent de diminuer la solubilité des composés volatils et donc de réduire  $K_1$ . Le déplacement de l'équilibre suite à l'augmentation de la concentration en sel varie en fonction des composés (figure 3-4) et de leur coefficient de partition eau/air. Un dernier paramètre pouvant être ajusté est le pH (figure 3-4), notamment dans le cas de certaines molécules comme les amines dont la forme volatile est la forme basique, compte tenu de leurs valeurs de pKa élevées (Heising *et al.* 2012; Hall 1957). Outre l'influence de la température, le facteur  $K_2$  est avant tout influencé par la nature de la phase adsorbante utilisée ainsi que par la nature des composés à extraire. Ainsi plusieurs phases existent comme le polydiméthylsiloxane (PDMS) pour les composés volatils en général, le polyacrylate pour les composés polaires, le mélange PDMS et carboxène (CAR) pour les composés volatils et les gaz, ou encore le mélange PDMS et divinylbenzène (DVB) pour les composés polaires volatils (Vaubourdolle 2007).

L'extraction en headspace statique par SPME est un outil simple d'utilisation sans utilisation de solvant. Les paramètres d'extractions nécessitent généralement une optimisation préalable en fonction de la nature des molécules à analyser, un compromis est généralement nécessaire dans le cas de mélange de composés. Dans le cadre de l'analyse de com-

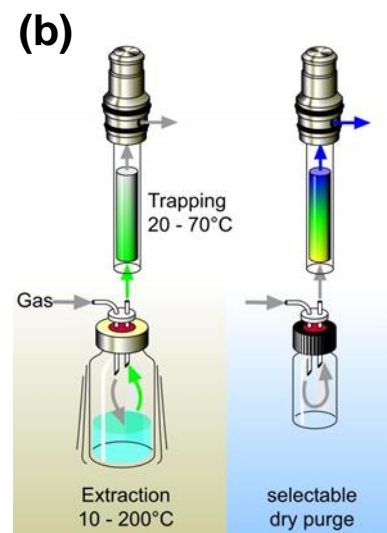
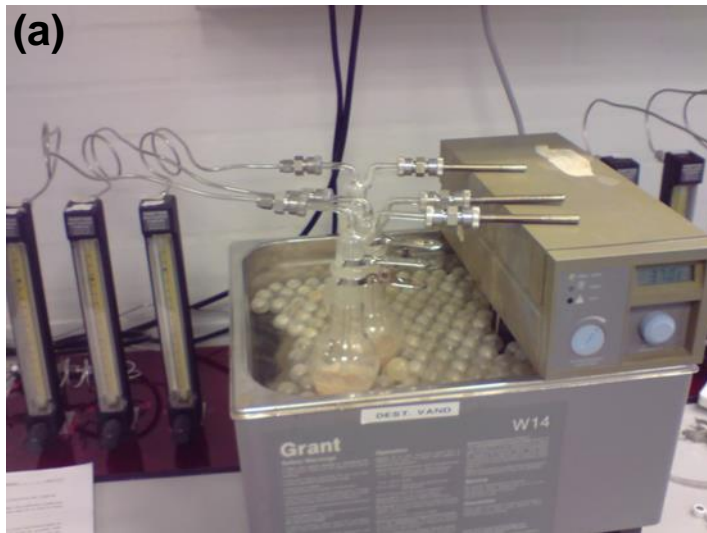


Figure 3-5 : Illustrations d'un montage de "purge and trap" utilisé pour l'extraction de composés volatils (a) et d'un système d'espace de tête dynamique en fiole (b). L'illustration (b) est reproduite avec l'autorisation de la société Gerstel.



posés volatils, la SPME peut même être utilisée pour réaliser une quantification via l'utilisation d'étalons internes ou externes, avec une bonne sensibilité et une bonne répétabilité (Balasubramanian & Panigrahi 2011). Cependant dans le cas d'analyse de mélanges complexes, pouvant contenir plus de cinquante espèces volatiles différentes, la quantification devient très difficile, le choix d'étalons devenant impossible compte tenu de l'hétérogénéité des familles chimiques présentes. En l'absence d'étalon, une quantification relative peut être envisagée, mais dans le cas de mélanges complexes la répétabilité des extractions peut être diminuée. En outre, la précision de la méthode SPME peut être affectée par une vingtaine de facteurs résumés par Balasubramanian & Panigrahi (2011), souvent maîtrisables par l'utilisation d'un passeur automatique d'échantillon.

De nombreuses applications ont été décrites utilisant la SPME, historiquement c'est surtout sur des prélèvements environnementaux pour le dosage des BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylène) que la technique a été utilisée (Arthur & Pawliszyn 1990; Zhang & Pawliszyn 1993). Un second type d'application est l'analyse de matrices alimentaires telles que fromages, charcuterie, vin, huile ou fruits et légumes (Balasubramanian & Panigrahi 2011). Parmi ces applications alimentaires des approches spécifiques ont été conduites sur le poisson l'une des premières décrites étant celle de Béné *et al.* (2001). Iglesias & Medina (2008) ont montré que la fibre CAR-PDMS était la plus appropriée pour étudier les composés volatils issus du poisson. C'est d'ailleurs ce type de fibre qui a été utilisé au laboratoire pour développer une méthode d'étude des composés volatils issus de la chair de plusieurs espèces de poissons, conditionnées sous diverses formes (Duflos *et al.* 2006; Duflos, Leduc, *et al.* 2010; Leduc, Krzewinski, *et al.* 2012).

#### **b. L'espace de tête dynamique**

La technique d'espace de tête dynamique, contrairement à l'headspace statique, est une méthode dans laquelle une partie de l'espace de tête est soustrait de manière continue, l'état d'équilibre entre phase gazeuse et solution n'étant donc jamais atteint. L'échantillon est placé dans un compartiment balayé par un flux de gaz inerte, chassant les composés volatils présents vers une zone contenant la phase adsorbante généralement composée de Tenax® (figure 3-5). Ensuite, certains extracteurs réalisent une purge « sèche » pour éliminer l'eau, puis la température est augmentée pour désorber les molécules, cryo-focalisées ensuite en tête de colonne (Pillonel *et al.* 2002; Leduc, Tournayre, *et al.* 2012).

La technique d'headspace dynamique a été utilisée pour de nombreuses applications sur les arômes des aliments comme les composés volatils issus du fromage, de viandes, de miel, d'huiles, de vins ou même de fruits (Qian *et al.* 2002; Rivas-Cañedo *et al.* 2011; Radovic *et al.* 2001; Reboredo-Rodríguez *et al.* 2012; Bicchi *et al.* 2004). Dans le domaine plus précis de l'analyse des composés volatils issus du poisson, plusieurs études ont également été menées en espace de tête dynamique. Ainsi, des profils aromatiques de différentes espèces de poisson comme le saumon, le cabillaud, le lieu noir ou encore le maquereau ont pu

être obtenus (Refsgaard *et al.* 1999). L'headspace dynamique a également permis de comparer les profils aromatiques de dorades sauvages et d'élevage et leurs évolutions lors de la conservation Alasalvar *et al.* (2005). Cette méthode d'extraction a également été utilisée pour étudier l'impact du temps de conservation de harengs sur la composition du volatilome enregistré après cuisson (Aro *et al.* 2003). Enfin, une approche récente a été réalisée par le laboratoire en collaboration avec l'INRA pour le suivi d'altération de bar. Cette étude a permis de définir des aromagrammes en fonction de l'état d'altération du bar et de trouver des marqueurs olfactifs en lien avec la fraîcheur et l'altération (Leduc, Tournayre, *et al.* 2012).

Dans le domaine de l'extraction des composés volatils de nombreuses techniques d'extractions existent comme l'headspace statique et l'headspace dynamique qui sont les plus utilisées. Il n'y a pas de consensus entre les auteurs pour savoir quelle méthode est la meilleure, cela dépend de l'application désirée et du type de composés à analyser. La méthode d'extraction dynamique offre une meilleure sensibilité par rapport à l'headspace statique et permet la détection efficace d'un nombre plus important de composés dont ceux de poids moléculaire élevés ou à l'état de traces (Overton & Manura 1995; Marsili 1999). D'autres auteurs notent que la SPME est plus simple, rapide et économique que la technique d'headspace dynamique, de plus elle serait plus précise pour une sensibilité équivalente (Marsili 1999; Pillonel *et al.* 2002). L'existence d'artefacts inhérents à l'utilisation de certains appareils d'headspace dynamique a été décrite comme un frein (Marsili 1999), cependant ce type d'inconvénient est aussi rencontré en SPME.

## **2. Séparation des composés volatils par chromatographie**

Après avoir extrait l'ensemble des composés retrouvés au sein du volatilome, il convient de tenter d'isoler chacun des composés. Cette séparation est réalisée par chromatographie et de fait pour les composés volatils par chromatographie en phase gazeuse (GC).

L'injection permet l'introduction de l'échantillon dans le système analytique. Il s'agit d'une chambre thermostatée balayée par un gaz vecteur et isolé de l'environnement par un septum. La désorption des composés est assurée par la hausse de la température de l'enceinte. En GC, l'injection peut être réalisée avec ou sans division (Rouessac & Rouessac 2000). Le choix du mode d'injection permet respectivement l'injection d'analytes concentrés ou en faibles quantités. Dans le cas de l'headspace dynamique, la cryofocalisation des composés volatils est un atout pour l'étude de composés extrêmement volatils (Pillonel *et al.* 2002).

La GC est avant tout une chromatographie d'affinité, utilisant majoritairement des colonnes capillaires recouvertes d'une phase solide pour assurer la séparation des composés. Ceux-ci se répartissent entre la phase mobile gazeuse et la phase stationnaire pour laquelle, chaque composé, a plus ou moins d'affinité. Le débit gazeux traversant la colonne ne joue pas un rôle primordial dans la séparation des composés. La nature de la phase de la colonne capillaire utilisée est en revanche un paramètre important de l'étape de séparation, plu-

Tableau III-I : Exemples de phases stationnaires de colonnes capillaires avec le type de polarité correspondant et des applications suggérées par des catalogues commerciaux.

Composition de la phase	Polarité	Applications possibles
PDMS	Apolaire	Hydrocarbures, Parfums, Arômes
Phényl/PDMS	Moyennement apolaire	Drogues, Pesticides, Stéroïdes
Polyéthylène glycol	Polaire	Alcools, Amines, Parfums, Huiles essentielles
Cyanopropylphényle/PDMS	Polaire	Esters d'acides gras, stéroïdes neutres

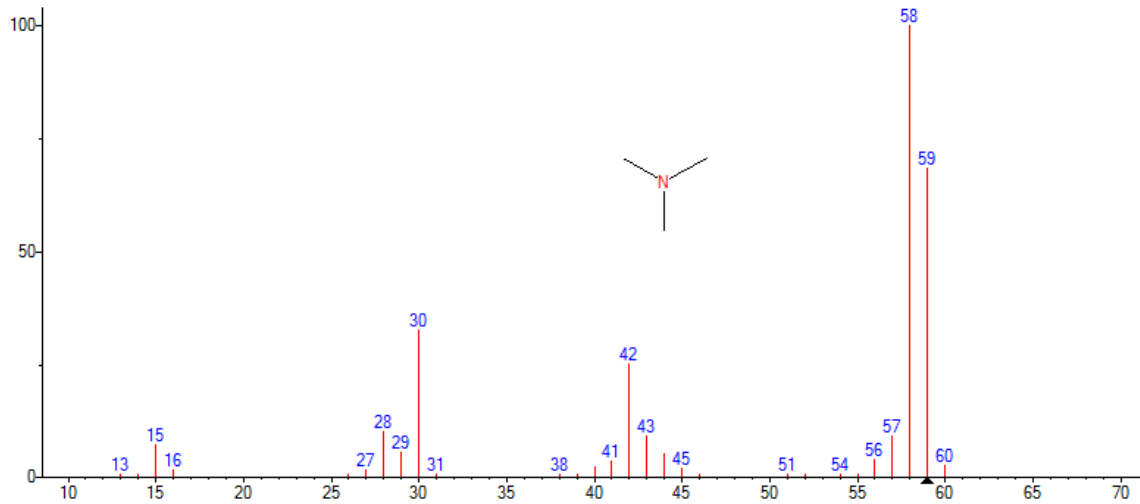


Figure 3-6 : Spectre de masse de la triméthylamine, issu de la base de données NIST08, obtenu avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

sieurs polarités existent (Tableau III-I), leur choix est gouverné par la polarité du ou des analyte(s). D'autres paramètres influencent la séparation des analytes dont notamment la taille et la température de la colonne (Tranchant *et al.* 1995; Rouessac & Rouessac 2000). La chromatographie bidimensionnelle associe des colonnes de polarités différentes afin d'améliorer le pouvoir de séparation des composés de mélanges complexes, augmentant la capacité de séparation évaluée entre 19 et 37% en GC simple (Cortes *et al.* 2009).

Après avoir vu l'étape de séparation des composés du volatilome, le prochain paragraphe permettra de voir un ensemble de méthodes d'identification existantes.

### **3. Méthodes de détection et d'identification des composés volatils**

Un grand nombre de méthodes de détection existent en GC, les techniques les plus utilisées pour la détection des composés volatils seront présentées.

#### **a. La spectrométrie de masse : un code barre pour la molécule**

Avec l'ionisation de flamme, la spectrométrie de masse compte désormais parmi les méthodes de détection standard en GC. Cette méthode permet de déterminer la masse, ainsi que le spectre de fractionnement spécifique (figure 3-6), d'un nombre important de molécules chimiques. Ce système est un détecteur attrayant en GC, puisqu'il permet une identification généralement convenable des composés séparés. Le nombre d'ions suivi gouverne la sélectivité et le sensibilité du signal (Gonçalves & Alpendurada 2004; Kuo & Ding 2004). Le spectromètre de masse est composé de différentes parties dont deux remarquables : l'ionisateur et l'analyseur. Pour être analysé, l'échantillon doit se trouver sous forme gazeuse ou nébulisée, pour ensuite subir une ionisation. Parmi les méthodes les plus utilisées sont retrouvées l'ionisation électronique (EI), l'ionisation par électrospray (ESI) et l'ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Chacune des méthodes possède des applications particulières, ainsi l'EI est généralement utilisée pour la GC/MS, l'ESI pour la chromatographie liquide et la MALDI pour les échantillons solides comme les protéines ou les bactéries (Pazos *et al.* 2011; Böhme *et al.* 2010). L'analyseur permet de discriminer les ions formés en fonction de leur rapport  $m/z$ . Différents types d'analyseurs existent dont le quadripôle et le temps de vol (TOF). L'analyseur quadripolaire est composé de quatre électrodes parallèles. L'application d'une différence de potentiel entre chaque paire d'électrode permet la séparation et la sélection d'ions en fonction de leur rapport  $m/z$ . L'analyseur en temps de vol (TOF) permet de mesurer le temps nécessaire aux ions pour parcourir une zone de vol avant d'aller percuter le détecteur ce temps est directement proportionnel au rapport  $m/z$ . L'analyseur TOF est celui possédant le meilleur pouvoir résolutif, il est particulièrement adapté aux sources pulsées (De Hoffmann *et al.* 1999).

Pour de nombreuses applications, deux appareils de masse sont couplés. A l'image de la GC bidimensionnelle cela permet d'améliorer la résolution de l'analyse, parmi les associations les plus répandues sont retrouvés le quadripôle/temps de vol et le quadripôle/piège ionique (De Hoffmann *et al.* 1999).

Tableau III-II : Exemples de seuils olfactifs humains pour certaines molécules retrouvées lors de l'altération du poisson ainsi que leurs valeurs limites d'exposition respectives dans l'atmosphère des lieux de travail.(Falcý & Malard 2005)

Composés volatils olfactifs	Limites olfactives (ppb)
Ethanol	84 000
Ammoniac	500
Diméthylamine	47
Sulfure d'hydrogène	8,1
Triméthylamine	0,2

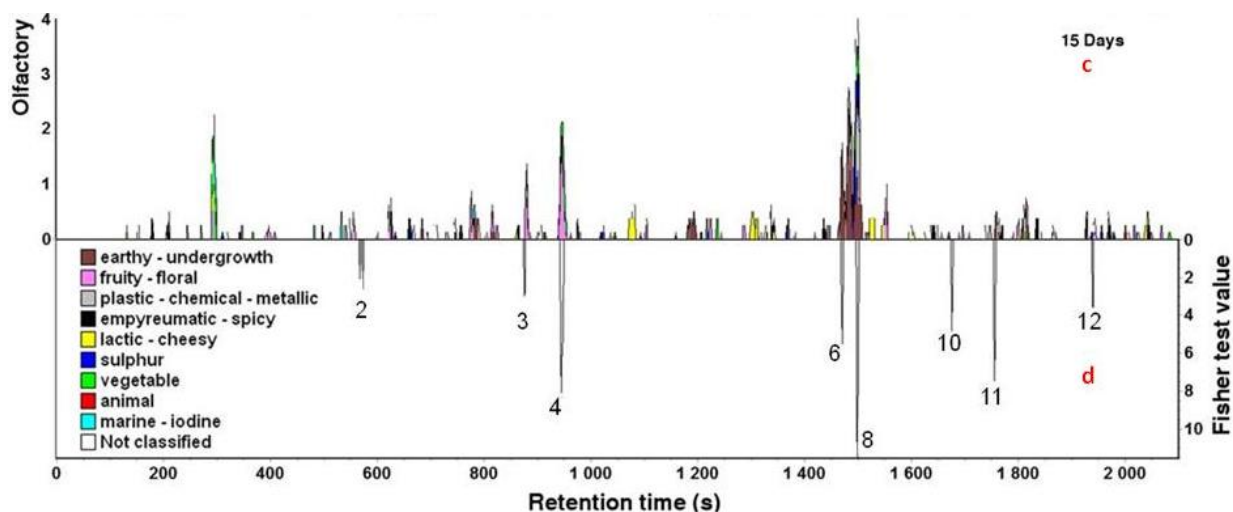


Figure 3-7 : Aromagrammes proposant les signaux olfactifs, classifiés et représentés par intensité, obtenus pour un bar commun altéré. (Leduc, Tournayre, *et al.* 2012)

**b. L'olfactométrie : implication du nez humain dans l'analyse**

Le nez humain, est un des meilleurs outil de détection des composés odorants et serait capable de discriminer près de mille milliards d'odeurs (Bushdid *et al.* 2014). Ainsi le nez humain est capable d'évaluer plusieurs paramètres d'une odeur tel qu'un seuil de perception ou sensibilité (Tableau III-II), une note (fruitée, boisée, empyreumatique<sup>1</sup>, etc.) et une intensité d'odeur évoluant de façon logarithmique avec la concentration du composé volatil odorant (Falcu & Malard 2005). L'olfactomètre peut être couplé à une GC/MS, il permet alors d'apporter une dimension nouvelle à l'analyse des composés volatils odorants, en leur associant des descripteurs (Curioni & Bosset 2002) permettant de dresser des aromagrammes. Ceux-ci permettent de visualiser les classes d'arômes enregistrées au cours du temps, ainsi que leurs intensités (figure 3-7) et ainsi d'identifier sur la totalité des composés extraits et séparés, ceux ayant une importance olfactive (Curioni & Bosset 2002).

L'olfactométrie s'est surtout développée dans le domaine de la caractérisation de matrices alimentaires. En effet, l'odeur y revêt un rôle important que ce soit pour le marketing, pour caractériser un produit dans le cadre d'appellation d'origine, pour caractériser les défauts d'un produit suite à un dysfonctionnement dans le processus de fabrication ou enfin caractériser l'altération du produit. Parmi les applications « alimentaires », celles sur le fromage sont nombreuses et consistent majoritairement à typer leurs arômes (Curioni & Bosset 2002). Les boissons fermentées ont également été étudiées, l'olfactométrie y est principalement utilisée pour trois raisons majeures : établir le lien entre les propriétés organoleptiques et composés volatils, typer les arômes des différentes boissons et identifier les composés responsables des odeurs non-désirées (Plutowska & Wardencki 2008). Dans le domaine des produits de la pêche, l'olfactométrie a également fait l'objet de développements comme la recherche des composés olfactifs à l'origine des arômes de sauces de poisson, l'évaluation des processus de filetage et de salage et enfin la recherche de marqueurs de fraîcheur ou d'altération (Giri *et al.* 2010; Jónsdóttir *et al.* 2011; Leduc, Tournayre, *et al.* 2012).

Bien qu'étant un outil performant le nez humain possède des limites : existence de seuil de détection élevé, absence de linéarité de la réponse des récepteurs olfactifs à la concentration de la molécule odorante et même saturation des récepteurs (Falcu & Malard 2005). Une dernière approche de caractérisation du volatilome d'une matrice a donc consisté à apprendre, à un automate, à « sentir les odeurs », il s'agit du nez électronique.

**c. Les nez électroniques : apprendre « l'odeur » à l'automate**

Plusieurs générations de nez électroniques existent, ce développement se focalisera sur les premières générations de nez ayant un système de détection vraiment spécifique, les dernières technologies n'apportant aucune innovation sur la partie capteur. En effet les nouvelles technologies se basent sur des mesures d'indice de rétention linéaire sur des colonnes de polarités différentes (Yoshida *et al.* 2012) ou à une simple détection en masse sans séparation préalable des composés volatils (Peris & Escuder-Gilabert 2009). Parmi les

---

<sup>1</sup> Odeurs âcres, fortes, dégagées par certaines matières organiques lors de leur combustion

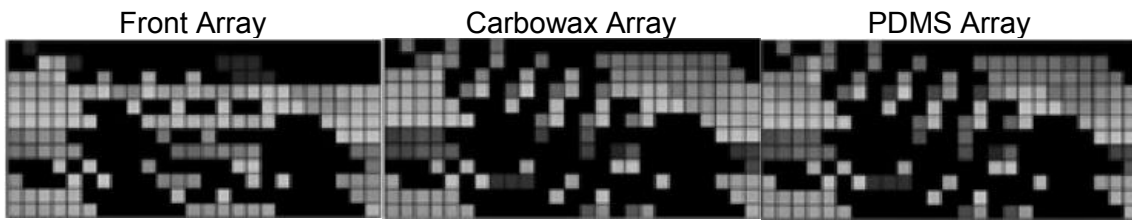


Figure 3-8 : Exemples de motifs enregistrés par les capteurs d'un système de nez électronique miniaturisé après l'analyse d'une huile essentielle de cannelle. (Che Harun, Taylor, *et al.* 2009)

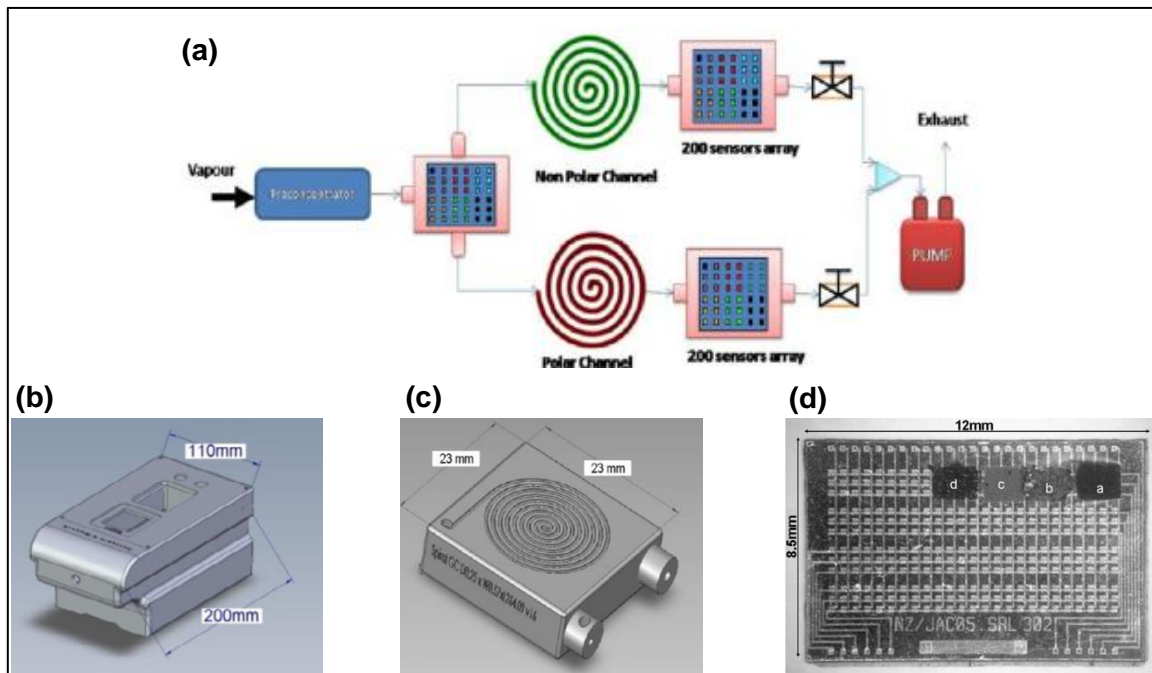


Figure 3-9 : Schéma fonctionnel de l'appareil e-mucosa (a) avec une représentation du boîtier de l'appareil (b), du canal de transfert (c) et d'une plaque de capteurs électrochimiques (d). (Che Harun, Covington, *et al.* 2009; Che Harun, Taylor, *et al.* 2009)

différents capteurs les plus utilisés sont retrouvés les capteurs piézoélectriques (utilisant la propagation d'ondes acoustiques), électrochimiques dont les plus connus sont les semi-conducteurs à oxydes métalliques (technologie MOS) ou encore les biocapteurs liant un élément réagissant avec une molécule cible et un transducteur (Peris & Escuder-Gilabert 2009). Les capteurs peuvent être spécifiques d'une molécule (CO, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub>), mais la plupart du temps ils sont non-sélectifs (Olafsdóttir *et al.* 2003). Le pendant de l'utilisation de ce type de capteur est l'utilisation de méthodes de « pattern recognition » ou reconnaissance de motifs, tels que ceux présentés sur la figure 3-8. Elles impliquent généralement l'utilisation de méthodes de réduction des informations générées par des approches dites non-supervisées comme l'ACP (*cf.* Chapitre 5) et la régression des moindres carrés partiels (PLS) et de méthodes supervisées se calquant sur un modèle très simplifié du fonctionnement du cerveau humain, utilisant une technique de calcul appelée réseau de neurones artificiels (Peris & Escuder-Gilabert 2009).

Cependant ces systèmes de détection possèdent des limites comme la vulnérabilité vis-à-vis de l'humidité, le risque de contamination des capteurs, l'existence dans certains cas de signaux non-linéaires ou encore le risque de voir certaines molécules prépondérantes au sein du volatilome, masquer le signal provenant de constituants minoritaires (Olafsdóttir *et al.* 2003; Peris & Escuder-Gilabert 2009).

Une des applications ultimes dans le domaine des nez électroniques a été la miniaturisation des composants ainsi Che Harun, Covington, *et al.* (2009) ont pu développer un nez électronique portable (figure 3-9) permettant d'embarquer près de 300 capteurs. Ce nez électronique a montré des profils de réponses distincts sur différentes huiles essentielles.

Sans surprise, le nez électronique a trouvé les mêmes applications que celles rencontrées dans le domaine de l'olfactométrie (Peris & Escuder-Gilabert 2009) et naturellement des applications concernant la fraîcheur ou le processus de conservation ont suscité un intérêt pour les produits de la pêche. Une première application du nez électronique, Freshsense, a montré une bonne capacité à prédire la valeur d'ABVT sur du capelan (*Mallotus villosus*) en cours d'altération (Olafsdóttir *et al.* 2000). Il a de plus été montré que la combinaison de deux nez électroniques (Freshsense et Libranose) utilisant des technologies de capteurs différentes permettait de réduire de façon très significative les erreurs d'évaluation, réduite à 4%, de la fraîcheur de filets de cabillaud (Di Natale *et al.* 2001). D'autres nez électroniques ont été utilisés plus récemment comme le PEN2 model et le ipNose, ils ont montré respectivement une efficacité à suivre le déclin de fraîcheur de bars stockés à 4°C (Limbo *et al.* 2009) et à prédire, à 1,5 jours près, la durée de conservation de filets de dorade (*Sparus aurata*), les trois premiers jours de stockage n'étant pas discriminés (Perera *et al.* 2010). Une étude a porté sur la conservation des thonidés et scombridés à l'aide du nez  $\alpha$ -Fox 2000 sans toutefois pouvoir clairement expliquer les différences observées (Miyasaki *et al.* 2011). Dernièrement, l'association d'un nez et d'une langue électronique s'est montré efficace pour



**Tableau III-III : Exemples d'aldéhydes retrouvés dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Pour chacun des aldéhydes les odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que les voies de synthèse supposées.**

Composés	Odeur(s) caractéristique(s)	Origine(s) supposée(s)
Acétaldéhyde	Fruité, pelure de pomme <sup>1</sup>	Via le 2,6-nonadiène produit par l'action de la 12-lipoxygénase sur l'EPA ou via le (E,Z)2,4-heptadiène issu de l'autoxydation de l'EPA <sup>13</sup>
Propanal	Solvant, âcre <sup>1</sup>	Via le 16-hydroperoxyde issu de l'autoxydation du méthyle linoléate ou le 15-hydroxypéroxyde issu de la photoxydation du méthyle linoléate <sup>14</sup>
(E)-2-Butenal	Âcre, éther, boisée <sup>1,2</sup>	Oxydation des acides gras polyinsaturés (n-3) <sup>2</sup>
2-Méthylpropanal	Fruits secs, malté, brûlé, verdure <sup>1</sup>	Catabolisme de la L-valine par les microorganismes <sup>15</sup>
Butanal	Âcre et verte <sup>2</sup>	Oxydation de l'oléate ou du linoléate <sup>2</sup>
3-Méthylbutanal	Maltée, Caramel <sup>3,4</sup>	Catabolisme de la L-leucine par les microorganismes <sup>15</sup>
2-Méthylbutanal	Maltée, amande <sup>1,3</sup>	Catabolisme d'acide aminé <sup>16</sup>
Pentanal	Âcre, amande, caoutchouc <sup>1</sup>	Oxydation des acides polyinsaturés (n-6) <sup>2</sup>
(E)-2-Pentenal	Herbacée, verte <sup>2</sup>	Oxydation d'acides gras <sup>14</sup>
(E)-2-Hexenal	Mousse, bois <sup>2</sup>	Via l'action de la 15-lipoxygénase sur l'EPA ou le (Z)3-hexenal <sup>13</sup>
Hexanal	Verdure, pommes, plantes, champignon <sup>3,5</sup>	Via le 13-hydroperoxyde issu de l'oxydation du linoléate ou la dégradation de composés volatils (2,4-decadiène, 2-octène) <sup>14, 17, 18</sup>
(E, E)-2,4-Hexadiène	Verdure <sup>6</sup>	Oxydation des lipides induite par la lipoxygénase <sup>19</sup>
(E, E)-2,4-Heptadiène	Odeur de poireau, d'oignons frits <sup>4,7</sup>	Via l'autoxydation de l'EPA ou le 12-hydroperoxyde issu de l'oxydation du linoléate <sup>13, 20</sup>
(Z)-4-Heptenal	Carton, Pommes de terre, biscuit, carton, peinture <sup>1, 3, 28</sup>	Via le 2,6-nonadiène produit par l'action de la 12-lipoxygénase sur l'EPA <sup>13</sup>
(E)-2-Heptenal	Verdure, gras, fruité, amande <sup>8</sup>	Autoxydation de l'arachidonate <sup>21</sup>
Heptanal	Graisse, jambon, rance <sup>8</sup>	Autoxydation d'acides gras monoinsaturé (n-9) et des acides gras polyinsaturés (n-6) <sup>22, 23</sup>
Benzaldéhyde	Amande amère, pénétrante, boisée <sup>1,8</sup>	Catabolisme de la L-phenylalanine par bactéries lactiques ainsi que le tryptophane <sup>15, 24</sup>
Octanal	Fruité, Citron, Sucrierie, zeste d'orange <sup>1,5</sup>	Corrélaté à l'oxydation du linoléate <sup>25</sup>
Benzèneacétaldéhyde	Mousse, solvant <sup>9</sup>	Catabolisme de la phenylalanine par bactéries lactiques ainsi que le tryptophane <sup>24, 26</sup>
(E, Z)-2,6-Nonadiène	Concombre <sup>10</sup>	Via le 9-hydroperoxyde issu de l'oxydation du linoléate <sup>14, 21</sup>
(E)-2-Nonenal	Empyreumatique, carton, cire, concombre <sup>5, 8, 10</sup>	Via l'action de la 12-lipoxygénase sur l'acide arachidonique ou du 9-hydroperoxyde issu de l'oxydation du linoléate <sup>14, 20</sup>
Nonanal	Graisse, verdure, citron, rance <sup>2, 8</sup>	Via le 9-hydroperoxyde issu de l'oxydation de l'oléate <sup>20</sup>
(E)-2-Decenal	Graisse <sup>10</sup>	Via le 9-hydroperoxyde issu de l'oxydation de l'oléate <sup>20</sup>
Decanal	Citron, cire <sup>8</sup>	Via le 8-hydroperoxyde issu de l'oxydation de l'oléate <sup>27</sup>
Undecanal	Âcre, verdure <sup>11</sup>	Via le 8-hydroperoxyde issu de l'oxydation de l'oléate <sup>20</sup>
Dodecanal	Cire <sup>12</sup>	
Tetradecanal	Florale, cire <sup>12</sup>	

[1] Giri *et al.* (2010), [2] Varlet *et al.* (2007), [3] Olafsdóttir & Fleurence (1997), [4] Jónsdóttir *et al.* (2011), [5] Leduc, Tournayre, *et al.* (2012), [6] Qian & Reiniccus (2003), [7] Nielsen & Poll (2004), [8] García-González *et al.* (2008), [9] Varlet *et al.* (2006), [10] Triqui & Bouchriti (2003), [11] Aparicio *et al.* (2000), [12] Chisholm *et al.* (2003), [13] Kawai & Sakaguchi (1996), [14] R.J. Hsieh & Kinsella (1989), [15] Sinz & Schwab (2012), [16] Jaffrès *et al.* (2011), [17] Josephson & Lindsay (1987), [18] Iglesias & Medina (2008), [19] Fu *et al.* (2009), [20] Frankel (1983), [21] Grosch (1987), [22] Meynier *et al.* (1998), [23] Duflos *et al.* (2006), [24] McSweeney & Sousa (2000), [25] Grigorakis *et al.* (2010), [26] Kanehisa *et al.* (2012), [27] Ho & Chen (1994), [28] Olafsdóttir & Jonsdottir (2010)

suivre le stockage de grogneur (*Larimichthys crocea*) à 4°C (Han *et al.* 2014).

De nombreux outils, spécifiques, permettent la caractérisation du volatilome, une deuxième partie de ce développement va s'intéresser à décrire l'ensemble des composés volatiles et leurs origines supposées dans le cas des matrices de poissons.

## II. Le volatilome des matrices à base de poisson

Le volatilome d'un aliment est « pluriel », *i.e* il est le fruit d'un mélange de composés volatils issus de diverses familles. Une liste non-exhaustive des composés sera présentée en fonction des différentes formes de poisson : cru ou transformé. Les composés décrits reflètent ce qui est généralement rapporté dans la littérature.

### 1. Une famille de volatils au rôle prépondérant : les aldéhydes

Les aldéhydes sont des molécules chimiques caractérisées par la présence d'un groupement carbonyle (-CHO) rattaché à une chaîne carbonée. Dans le poisson, des aldéhydes simples allant du C<sub>2</sub> au C<sub>14</sub> (acétaldéhyde au tétradécanal) ont pu être décrits dans différentes études (Olafsdottir *et al.* 2005; Alasalvar *et al.* 2005; Varlet *et al.* 2007; Leduc 2011), l'hexanal étant présent en quantité importante. D'autres types d'aldéhydes sont rencontrés comme ceux possédant des groupements méthyles (2-méthylbutanal) ou étant pourvus d'insaturations (2-pentenal, 2,4-nonadienal). Comme le montre le [Tableau III-III](#), d'un point de vue métabolique, les aldéhydes proviennent en grande majorité de l'oxydation des lipides, pouvant être le fruit de la dégradation d'hydroperoxydes comme le nonanal ou le decanal ou de celle d'autres aldéhydes comme l'hexanal pouvant être issu de la dégradation du 2,4-decadienal. D'autres aldéhydes proviennent du catabolisme d'acides aminés comme les 2- et 3-méthylbutanal ou les aldéhydes possédant un cycle aromatique comme le benzaldéhyde. Comme le notent [Giri \*et al.\* \(2010\)](#), d'un point de vue olfactif, les arômes correspondant aux aldéhydes contribuent de façon ambivalente à l'odeur globale avec des arômes attirants et repoussants. Ces notes olfactives peuvent être majoritairement classées en odeurs sucrées (sucrierie, caramel, amande), de verdure (herbacé, fruitée, mousse, bois) et de graisses (graisse, cire, rance). [Alasalvar \*et al.\* \(2005\)](#) notent que les aldéhydes ont tendance à « étouffer » les arômes des autres composés, même à l'état de trace, ceci s'expliquant par leur faible seuil de détection ([Giri \*et al.\* 2010](#); [Olafsdottir & Jonsdottir 2010](#)).

Dans le domaine des produits de la pêche, les aldéhydes peuvent servir d'indicateur pour différentes applications. Ainsi [Leduc, Krzewinski, \*et al.\*\(2012\)](#) ont montré que quatre composés dont deux aldéhydes étaient de potentiels marqueurs de différenciation entre un poisson frais et un poisson frais issu de décongélation (frais/décongelé). Pour certains aldéhydes, comme le 2,6-nonadienal ou l'heptanal c'est la teneur qui définit le ressenti ; odeur attirante de poisson frais à faibles concentrations ou odeurs désagréables en plus fortes quantités ([Olafsdottir & Jonsdottir 2010](#)). [Duflos, Leduc, \*et al.\* \(2010\)](#), dans une étude sur l'altération de merlan, ont montré que le 4-heptenal et le 2,4-heptadienal étaient des marqueurs

Tableau III-IV : Exemples de cétones retrouvées dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Pour chacune des cétones les odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que les voies de synthèse supposées.

Composés	Odeur(s) caractéristique(s)	Origine(s) supposée(s)
<b>2,3-Butanedione</b>	Vanille, caramel, beurre <sup>1,2</sup>	Produit du métabolisme des microorganismes <sup>9,10</sup>
<b>Butyrolactone</b>	Odeur « rassi », fromagère, brûlé, sucre <sup>3,4</sup>	Produit du métabolisme des microorganismes <sup>11</sup>
<b>2-Butanone</b>	Solvant, chimique <sup>5,6</sup>	Produit de la conversion de la 2,3-Butanedione <sup>12</sup>
<b>3-Hydroxy-2-butanone</b>	Douce, aigre <sup>21</sup>	Catabolisme du diacetyl par les microorganismes <sup>6</sup>
<b>3-Methyl-2-butanone</b>		
<b>2-Pentanone</b>	Sucrée, fruitée, verdure <sup>1,6</sup>	Produit probable de l'oxydation des lipides <sup>13</sup>
<b>3-Pentanone</b>	Douce, caramel <sup>21</sup>	
<b>2,3-Pentadione</b>	Beurre, amande, fruitée <sup>2,6</sup>	Produit du métabolisme des microorganismes <sup>14,15</sup>
<b>2,3-Hexanedione</b>		
<b>3-Hexanone</b>		
<b>3-Heptanone</b>	Douce <sup>7</sup>	
<b>2-Heptanone</b>	Epicée, gland, fromages à pâte persillée <sup>1</sup>	oxydation des acides gras par voie enzymatique <sup>16,17,22</sup>
<b>2-Ethylcyclohexanone</b>		
<b>1-Octen-3-one</b>	Champignons <sup>2,8</sup>	Autoxydation du linoléate et de l'arachidonate <sup>18</sup>
<b>(E, E)-3,5-Octadien-2-one</b>	Boisée, champignon, fraiche, foin <sup>6</sup>	Autoxydation de l'EPA et du linoléate <sup>18,19</sup>
<b>2,3-Octanedione</b>	Concombre <sup>5</sup>	Produit de l'oxydation des lipides <sup>20,22</sup>
<b>6-Methyl-2-heptanone</b>	Fraîche, douce <sup>7</sup>	
<b>6-Methyl-5-heptene-2-one</b>	Florale <sup>21</sup>	Dérivé de caroténoïdes <sup>21</sup>
<b>2-Octanone</b>	Savon, florale, moisi, fromage <sup>6</sup>	Produit probable de l'oxydation des lipides <sup>13</sup>
<b>Acetophenone</b>	Colle, mousse <sup>5</sup>	
<b>2-Nonanone</b>	Florale, fruité, fromages à pâte persillée <sup>1</sup>	Produit de l'oxydation des lipides <sup>22</sup>
<b>2-Undecanone</b>	Suif, mousses, verdure <sup>6</sup>	

[1] García-González *et al.* (2008), [2] Triqui & Bouchriti (2003), [3] Villberg & Veijanen (2001), [4] Selli *et al.* (2007), [5] Olafsdóttir & Fleurence (1997), [6] Giri *et al.* (2010), [7] Venkateshwarlu *et al.* (2004), [8] Leduc, Tournayre, *et al.* (2012), [9] Yaylayan & Keyhani (1999), [10] Álvarez-Martín *et al.* (2008), [11] Kato *et al.* (2007), [12] McSweeney & Sousa (2000), [13] Berdagué *et al.* (1993), [14] Iglesias & Medina (2008), [15] Barrière *et al.* (2001), [16] Montel *et al.* (1998), [17] Joffraud *et al.* (2001), [18] Grosch (1987), [19] Kawai & Sakaguchi (1996), [20] Young *et al.* (1997), [21] Olafsdottir & Jonsdottir (2010), [22] Drumm & Spanier (1991)

d'altération du poisson frais. Concernant la transformation de produits de la pêche, les notes de graisse et de verdure ont été décrites comme de potentiels marqueurs de maturation, notamment dans le cas de la maturation enzymatique d'anchois (Besteiro *et al.* 2000). Triqui & Reineccius (1995) ont d'ailleurs décrit le 2,4-heptadienal comme l'un des marqueurs de la maturation d'anchois. Dans le cadre de la salaison de poisson et plus particulièrement celui de la morue Olafsdottir & Jonsdottir (2010) ont décrit une odeur de pomme de terre bouillie, de rance et de concombre après la salaison de morue établissant un lien entre ces notes olfactives et la présence de 4-heptenal, d'heptanal et de 2,6 nonadienal au sein du volatilome. Du point de vue de la cuisson, les notes olfactives de pomme de terre, douces, de verdure, de graisse ont également été décrites pour la caractérisation de cabillaud bouilli et du saumon cuit. Au cours des mêmes études l'heptanal, le 4-heptenal, le 2-nonenal ou encore le 2,4 heptadienal ont été associés à ces notes olfactives (Olafsdottir & Jonsdottir 2010). Aro *et al.* (2003) ont travaillé sur le volatilome du hareng cuit, il a été noté que la cuisson de harengs frais conduit au développement d'aldéhydes tels que le 2-méthylbutanal, le 3-méthylbutanal et l'hexanal. Plus la durée de conservation augmente plus l'apparition d'autres aldéhydes comme le 4-heptenal ou l'heptanal est enregistrée.

Les aldéhydes ont été décrits comme des marqueurs de différents processus, comme l'altération de poissons, la transformation et enfin la cuisson. D'autres composés sont également impliqués comme, par exemple, les cétones.

## **2. Une seconde famille de volatils aux odeurs diverses : les cétones**

Les cétones sont des molécules chimiques caractérisées par la présence d'un groupement carbonyle entouré de deux chaînes carbonées ( $R_1-CO-R_2$ ). Elles sont également retrouvées en quantité importante dans le volatilome des matrices à base de poisson. Des cétones allant du  $C_4$  au  $C_{11}$  ont été décrites dans les matrices à base de poisson (Giri *et al.* 2010; Olafsdottir & Jonsdottir 2010; Leduc 2011). Comme le montre le Tableau III-IV, les cétones proviennent aussi bien du métabolisme de microorganismes que de l'oxydation des acides gras. Du point de vue olfactif, les cétones retrouvées dans les produits à base de poisson offrent un panel large d'odeurs, avec, en suivant la classification de Leduc, Tournayre, *et al.* (2012) des notes empyreumatiques/épiciées, lactiques/de fromages, terreuse/de sous-bois et florales/végétales. Comme les aldéhydes, ces molécules sont caractérisées par des seuils de détection très bas (Olafsdottir & Jonsdottir 2010).

Les cétones sont également de potentiels marqueurs de processus de transformation des matrices à base de poisson. Ainsi la 2,3-butanedione a été décrite par Duflos *et al.* (2010) comme un marqueur potentiel de la fraîcheur du merlan. D'autres cétones, comme la 3-hydroxy-2-butanone également appelée acétoïne, la 2-butanone ou encore la 3-pentanone ont été associées à l'altération de filets de poissons, églefin et cabillaud, conservés en barquette (Olafsdottir & Jonsdottir 2010). En outre, la production d'acétoïne serait liée à la croissance de *P.phosporeum* et présenterait l'intérêt d'être synthétisée de façon plus précoce que

**Tableau III-V : Exemples d'alcools retrouvés dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Pour chacun des alcools, les odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que les voies de synthèse supposées.**

<b>Composés</b>	<b>Odeur(s) caractéristique(s)</b>	<b>Origine(s) supposée(s)</b>
<b>Ethanol</b>	Solvant <sup>1</sup>	Métabolite des hexoses fermentés par la flore microbienne
<b>2-Methylpropanol</b>	Vin, pénétrante, glue <sup>2,3</sup>	Métabolite de la dégradation de la valine <sup>9</sup>
<b>1-Penten-3-ol</b>	Soufrée, épicée, plastique, viande <sup>3,4</sup>	Action de la 15-lipoxygénase sur l'EPA <sup>10</sup> Métabolisme des microorganismes <sup>18</sup>
<b>3-Methylbutanol</b>	Florale, rance, âcre, balsamique <sup>3,5</sup>	Désamination oxydative de la leucine par la voie d'Ehrlich <sup>3</sup>
<b>2-Methylbutanol</b>	huile, oignon mûr, malté <sup>3</sup>	Métabolisme des microorganismes <sup>3</sup>
<b>2,3-Butanediol</b>	Fruité, oignon <sup>3</sup>	Catabolisme du diacetyl par les microorganismes <sup>3</sup>
<b>1-Pentanol</b>	Acre, forte, balsamique, cire, verte <sup>2,3</sup>	Oxydation des lipides <sup>16</sup>
<b>(Z) 2-Penten-1-ol</b>	Amande <sup>6,7</sup>	Hydroxylation ou dimérisation de radicaux formés à partir du 13-hydropéroxydes par voie enzymatique <sup>11</sup>
<b>1-Hexanol</b>	Sous-bois <sup>8</sup>	Bioconversion de l'hexanal par l'action d'une alcool déshydrogénase <sup>12,13</sup>
<b>1-Heptanol</b>	Pommes de terre, fraîche, fruits secs <sup>3,4</sup>	Bioconversion de l'heptanal <sup>14</sup>
<b>1-Octen-3-ol</b>	Terreux, champignons <sup>1,8</sup>	Action de la 12-lipoxygénase sur l'arachidonate <sup>15</sup>
<b>1,5-Octadiene-3-ol</b>	Terreuse, champignons <sup>1</sup>	Action de la 12-lipoxygénase sur l'EPA <sup>10</sup>
<b>2-Ethylhexanol</b>	Verte, rose <sup>3</sup>	Métabolisme des microorganismes <sup>17</sup>
<b>3,6-Nonadienol</b>	Concombre, melon <sup>1</sup>	Action de la 12-lipoxygénase sur l'EPA <sup>10</sup>
<b>1-Nonen-3-ol</b>	Champignons <sup>8</sup>	Oxydation des lipides <sup>8</sup>

[1] Olafsdóttir & Fleurence (1997), [2] García-González *et al.* (2008), [3] Giri *et al.* (2010), [4] Varlet *et al.* (2007), [5] Jónsdóttir *et al.* (2011), [6] Angerosa *et al.* (2000), [7] Angerosa *et al.* (2001), [8] Leduc, Tournayre, *et al.* (2012), [9] Olafsdóttir *et al.* (2005), [10] Kawai & Sakaguchi (1996), [11] Angerosa *et al.* (1998), [12] Gargouri *et al.* (2008), [13] Salas & Sánchez (1999), [14] Verma *et al.* (2010), [15] Hsieh & Kinsella (1989), [16] Van Ruth *et al.* (2000), [17] Nalli *et al.* (2006), [18] Miller, Scanlan, Lee, Libbey, *et al.* (1973)

la TMA (Olafsdottir *et al.*, 2005). Une autre étude sur des filets de cabillaud a identifié la production 2,3-pentanedione et de 6-méthyl-5-heptenone lors du processus d'altération de filet de cabillaud. Du point de vue de la transformation des matières premières, les cétones semblent être de moins bons indicateurs de changement, en comparaison avec les aldéhydes. Triqui & Reineccius (1995) notent tout de même que la 3,5-octadien-2-one est un bon indicateur de maturation d'anchois ayant subi une maturation au sel. Parmi les autres types de transformation du poisson comme la cuisson ou le fumage, les cétones ne possèdent pas un rôle majeur dans l'odeur caractéristique des produits. Seules quelques cétones, comme la 2-heptanone dans le cas du cabillaud bouilli ou la 2-butanone et la 2-pentanone dans celui du saumon fumé, sont corrélées à l'altération de ces matrices (Olafsdottir & Jonsdottir 2010).

Le paragraphe suivant va s'attacher à montrer l'impact de la troisième grande famille de composés volatils dans les matrices à base de poissons : les alcools.

### **3. Les alcools : essentiellement des marqueurs d'altération**

Les alcools sont des molécules chimiques caractérisées par la présence d'un groupement hydroxyle (-OH) rattaché à un atome de carbone. Les principaux alcools retrouvés au sein des matrices à base de poisson comptent entre deux et neuf atomes de carbone. Certains possèdent des insaturations comme le 1,5-octadiène-3-ol ou le 2-penten-1-ol, d'autres des ramifications comme le 3-méthylbutanol ou le 2-éthylhexanol (Tableau III-V). Les alcools proviennent essentiellement de l'activité de microorganismes et de l'oxydation des lipides, de façon plus secondaire quelques alcools sont produits à partir d'aldéhydes (Tableau III-V). Du point de vue des odeurs associées à ce type de composés, des notes chimiques de solvant, végétales/florales et terreuses/boisées caractérisent la majorité des alcools retrouvés. Contrairement aux aldéhydes et aux cétones, les alcools n'ont qu'un faible apport à la note olfactive globale d'une matrice à base de poisson, compte tenu de leurs seuils de perception élevés (Leduc 2011), quelques exceptions subsistent notamment dans le cas des alcools insaturés et de l'éthanol. L'éthanol a d'ailleurs été utilisé comme un indicateur de la qualité de conserve de poissons tels que le thon et le saumon (Olafsdóttir & Fleurence 1997; Huss 1999). Au sein du poisson frais, l'éthanol est présent en quantité importante dans les premiers stades d'altération avant de décliner, d'autres alcools, notamment le 2-méthylpropanol, le 1-penten-3-ol ou le 3-méthylbutanol, voyant leurs quantités augmenter pendant le stockage (Aro *et al.* 2003; Alasalvar *et al.* 2005; Olafsdottir & Jonsdottir 2010). L'éthanol serait le marqueur d'une utilisation initiale des sucres par la flore d'altération avant l'utilisation des acides aminés conduisant à la production d'alcools ramifiés et insaturés (Olafsdottir & Jonsdottir 2010). Miller, Scanlan, Lee, Libbey, *et al.* (1973) ont d'ailleurs montré que l'inoculation de filets de sébastes (*Sebastes melanops*) par *Pseudomonas* conduit à la formation de composés volatils dont le 3-méthyl-butanol et vraisemblablement le 1-penten-3-ol. D'autres alcools contribuent à l'odeur du poisson, comme le pentanol, l'hexanol, le 1-octen-3-ol et le 1-nonen-3-ol, ce dernier étant d'ailleurs proposé comme un marqueur de

Tableau III-VI : Exemples de composés soufrés et azotés retrouvés dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Pour chacun des composés, les odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que les voies de synthèse supposées.

Composés	Odeur(s) caractéristique(s)	Origine(s) supposée(s)
Hydrogen sulfure	Soufrée, œufs bouillis <sup>1</sup>	Dégradation microbienne de la cystéine <sup>2,5</sup>
Carbonyl sulfide		Produit final du catabolisme de la méthionine <sup>6</sup>
Carbon disulfide		Environnement <sup>7</sup>
Methanethiol	Chou pourri <sup>1</sup>	Dégradation microbienne de la méthionine et de la cystéine <sup>2,5</sup> Chaîne trophique, biodégradation du diméthylesulfoniopropionate ou dégradation (enzymatique ou thermique) du diméthyle-β-propiothetin <sup>8,9</sup>
Dimethylsulfure	Produits pétroliers <sup>1</sup>	Oxydation du méthane <sup>2,10</sup>
Dimethyldisulfure	Oignons <sup>2</sup>	Oxydation du méthane <sup>2,11</sup>
Dimethyltrisulfure	Soufrée, poisson, oignons cuits <sup>2,3,4</sup>	Suite à l'oxydation du méthane et en présence de H <sub>2</sub> S <sup>2,11,12</sup>
Tiophene	Légumes cuits, soufrée <sup>3</sup>	
Ammoniac	Ammoniacale <sup>1</sup>	Métabolisme des microorganismes
Dimethylamine		Catabolisme de l'OTMA par voie enzymatique (endogène) <sup>13</sup>
Trimethylamine	Poisson, ammoniacale <sup>1,4</sup>	Réduction de l'OTMA par voie enzymatique (flore bactérienne) <sup>9,13</sup>

[1] Olafsdóttir & Fleurence (1997), [2] Olafsdóttir & Jonsdóttir (2010), [3] Leduc, Tournayre, *et al.* (2012), [4] Giri *et al.* (2010), [5] Herbert *et al.* (1975), [6] McSweeney & Sousa (2000), [7] Khalil & Rasmussen (1984), [8] Levasseur *et al.* (1994), [9] Duflos *et al.* (2006), [10] Miller *et al.* (1973), [11] Miller, Scanlan, Lee, Libbey, *et al.* (1973), [12] Landaud *et al.* (2008), [13] Sotelo & Rehbein (2000)

qualité pour le bar (Duflos, Leduc, *et al.* 2010; Leduc, Tournayre, *et al.* 2012). Dans le domaine de la cuisson des poissons, les alcools ne semblent pas jouer un rôle important dans l'odeur du poisson venant d'être cuit, en revanche le 1-penten-3-ol et 3-methylbutanol sont des marqueurs d'altération de cabillaud cuit conservé à 6°C (Olafsdottir & Jonsdottir 2010). Dans le cas du saumon fumé, ces mêmes composés sont également des marqueurs d'altération, le 1-penten-3-ol participant outre l'odeur de fumée à l'odeur de caractéristique de poisson (Joffraud *et al.* 2001). Le 1-octen-3-ol, issu de l'oxydation des lipides (Tableau III-V), est un composé important des matrices comme le saumon fumé ou la morue, responsable d'une odeur de champignon (Olafsdottir & Jonsdottir 2010). Le développement suivant va s'intéresser à deux classes de familles chimiques : les composés soufrés et azotés, regroupés compte tenu de leurs impacts olfactifs similaires sur le volatilome issu du poisson.

#### **4. Rôle des composés soufrés et azotés dans les mauvaises odeurs**

Les composés soufrés et azotés sont comme leurs noms l'indiquent des composés possédant respectivement un ou plusieurs atome(s) de soufre et d'azote. Le Tableau III-VI centralise la plupart des composés appartenant à ces familles ayant été décrits pour le poisson. Ces composés sont majoritairement de petites molécules issues du métabolisme des acides aminés par les microorganismes ou de l'oxydation de ces produits *a posteriori* (Tableau III-VI). Quelques composés dont le sulfure de carbone ou le sulfure, dimethyl- auraient une origine environnementale. Ces composés olfactifs sont marqués par des seuils de détections très faibles compris entre 0,5 et 50 ppb pour la majorité d'entre eux (Olafsdóttir & Fleurence 1997; Falcy & Malard 2005). En suivant la classification de Leduc, Tournayre, *et al.* (2012) les composés se classent dans les catégories des odeurs marines, soufrées et de légumes. TMA et DMA sont des marqueurs de la qualité du poisson (Chapitre 2. II. 2. a.), la DMA ayant plus précisément été décrite comme un marqueur de la fraîcheur du poisson compte tenu de sa formation rapide après la capture du poisson (Olafsdottir & Jonsdottir 2010). La DMA n'a pas de réelle odeur caractéristique décrite dans la littérature, elle participerait à l'odeur globale du poisson en combinaison avec les autres composés du volatilome (Olafsdottir & Jonsdottir 2010). La TMA imprime en revanche une odeur caractéristique de poisson altéré, qui potentialiserait les odeurs d'autres composés comme les aldéhydes, les acides carboxyliques ou les composés soufrés par effet synergique (Kawai & Sakaguchi 1996 ; Olafsdóttir & Fleurence 1997 ; Olafsdottir & Jonsdottir 2010). Les composés soufrés contribuent en grande majorité aux arômes putrides de l'altération (Olafsdóttir & Fleurence 1997 ; Olafsdottir & Jonsdottir 2010). Le paramètre de la concentration des composés soufrés est important, en effet comme le notent Olafsdóttir & Fleurence (1997), citant Shewan (1976), le méthaneithiol possède une odeur plaisante à très faibles concentrations qui se transforme rapidement en odeurs déplaisantes avec l'augmentation de la concentration. Si les composés soufrés participent surtout aux mauvaises odeurs du poisson, quelques composés pourraient servir de marqueurs. Ainsi le dimethylsulfure a été décrit comme un mar-



Tableau III-VII : Exemples de composés secondaires retrouvés dans le volatilome de poissons ou de produits à base de poisson. Les composés sont classés par familles chimiques, leurs odeurs caractéristiques décrites dans la littérature sont communiquées ainsi que leurs voies de synthèse supposées.

Composés	Odeur(s) caractéristique(s)	Origine(s) supposée(s)
<b>Furanes</b>		
2-Methylfuran	Colle <sup>1</sup>	Réaction de Maillard et Strecker <sup>14</sup>
2-Ethylfuran	Caoutchouc, âcre <sup>2</sup>	Via l'oxydation du linoléate, de l'EPA, ou du DHA <sup>15</sup>
Benzofuran	Pourriture <sup>25</sup>	Contaminant de l'environnement
2-Pentylfuran	Fruits verts, haricots verts <sup>2,3</sup>	Via le 9-hydroperoxyde issu de l'oxydation du linoléate <sup>16</sup>
<b>Esters</b>		
Methyl acetate	Solvant, colles	Voie microbienne, similaire à l'acétate d'éthyle
Ethyl acetate	Fruité, beurre, orange <sup>2</sup>	Estérification par voie microbienne <sup>17,18</sup>
Ethyl propanoate	Fruits juteux <sup>4</sup>	Estérification par flore bactérienne <sup>19</sup>
Ethyl isobutyrate	Fruité <sup>5</sup>	Estérification par flore bactérienne <sup>19</sup>
2-Methyl-1-propylacetate,	Banane, Fruité <sup>2</sup>	Estérification par flore bactérienne <sup>19</sup>
Ethyl butanoate	Banane, Fruité <sup>6,7</sup>	Estérification par flore bactérienne <sup>19</sup>
Ethyl-2-butoate	Florale <sup>8</sup>	Estérification par flore bactérienne <sup>19</sup>
Ethyl-2-methyl-butyrate	Fruité <sup>5</sup>	Estérification par flore bactérienne <sup>19</sup>
Ethyl-3-methyl-butyrate	Fruité, pomme <sup>4</sup>	Estérification par flore bactérienne <sup>19</sup>
Ethyl hexanoate	Fruité et terreuse <sup>2,6</sup>	Estérification par flore bactérienne <sup>19</sup>
Ethyl decanoate	Fruité <sup>2,4</sup>	Estérification par enzyme microbienne <sup>20</sup>
<b>Acides carboxyliques</b>		
Acetic acid	Piquante, Vinaigre <sup>1</sup>	Métabolite du lactate <sup>21</sup>
Propanoic acid	Âcre, piquante et moisissure <sup>9</sup>	Catabolisme des acides-aminés et glycolyse par les bactéries <sup>22</sup>
<b>Terpènes</b>		
Pinène, alpha-Limonène	Pin, aiguille, résineux <sup>3,10</sup>	Accumulation via la chaîne trophique <sup>14</sup>
Sabinène	Verdure, citron, fraîche <sup>3,10,11</sup>	Accumulation via la chaîne trophique <sup>14</sup>
p-Cymène	Boisée <sup>10</sup>	Accumulation via la chaîne trophique <sup>14</sup>
Camphre	Carotte <sup>10</sup>	Accumulation via la chaîne trophique <sup>14</sup>
	Médicale, bois <sup>10</sup>	Accumulation via la chaîne trophique <sup>14</sup>
<b>Composés organiques volatils</b>		
Benzène	Colle <sup>1</sup>	Contaminant de l'environnement <sup>23</sup>
Toluène	Fruité <sup>6</sup>	Contaminant de l'environnement <sup>23</sup>
Benzène, ethyl-m-Xylène	Colle, sèche, déplaisante, éther <sup>2,3</sup>	Contaminant de l'environnement <sup>23</sup>
Styrène	Plastique <sup>12,13</sup>	Contaminant de l'environnement <sup>23</sup>
	Douce, balsamique, florale <sup>13</sup>	Produit du catabolisme de la phénylalanine <sup>24</sup>

[1] Hartvigsen *et al.* (2000), [2] Giri *et al.* (2010), [3] García-González *et al.* (2008), [4] Lee & Noble (2003), [5] Ong & Acree (1999), [6] O'Riordan & Delahunty (2001), [7] Qian *et al.* (2002), [8] Komes *et al.* (2006), [9] Morales *et al.* (2005), [10] Qian & Wang (2005), [11] Varlet *et al.* (2007), [12] Mebazaa *et al.* (2011), [13] Bach *et al.* (2012), [14] Alasalvar *et al.* (2005), [15] Medina *et al.* (1999), [16] Frankel (1983), [17] Bartowsky & Henschke (2008), [18] Jaffrès *et al.* (2011), [19] Olafsdottir & Jonsdottir (2010), [20] Abbas & Comeau (2003), [21] Gram & Dalgaard (2002), [22] Kanehisa *et al.* (2012), [23] Osu Charles & Asuoha Adaku (2010), [24] Shimada *et al.* (1992), [25] Varlet *et al.* (2006)

Tableau III-VIII : Douzes composés phénoliques issus de la fumée participant à l'odeur global de fumé dans du saumon fumé au bois de hêtre (Varlet *et al.* 2006). Les odeurs caractéristiques et l'origine supposée de ces composés sont également renseignés

Composés	Odeur(s) caractéristique(s)	Origine supposée
p-Cresol	Marine, vinaigre, métallique, soufrée <sup>1</sup>	
o-Cresol	Fumé, brûlé, caoutchouc <sup>1</sup>	
Guaiacol	Fumé, épicé <sup>1,2</sup>	
4-Methyl guaiacol	Phénol, fumé, plastique <sup>1</sup>	
Thymol	Epicée, chimique, médicale <sup>1</sup>	
4-Ethyl guaiacol	Epicé, fumé <sup>2</sup>	
4-Vinyl guaiacol	Médicale, boisée, épicé, fumé <sup>1</sup>	Dégradation thermique de la lignine du bois par pyrolyse <sup>1</sup>
4-Propyl guaiacol	Clou de girofle, marine, vanille, épicé <sup>1</sup>	
Syringol	Epicé, fumé <sup>1</sup>	
Eugenol	Vanille, clou de girofle, caoutchouc brûlé <sup>1</sup>	
(Z)-Isoeugenol	Clou de girofle, épicé, café, brûlé <sup>1</sup>	
(E)-Isoeugenol	Clou de girofle, fruité, cannelle, graisse <sup>1</sup>	

[1] Varlet *et al.* (2006), [2] Lee & Noble (2003)

queur de poissons frais issu de décongélation (Leduc, Krzewinski, *et al.* 2012), de même le tiophène et le dimethyltrisulfure seraient des marqueurs de la qualité du bar (Leduc, Tournayre, *et al.* 2012).

### **5. Les composés volatils d'importance secondaire**

Parmi les composés du volatilome, sont également rencontrés des composés de moindre importance, c'est le cas pour les composés présentés dans le [Tableau III-VII](#). Ces derniers proviennent d'origines diverses : les esters et les acides carboxyliques issus de l'action de la flore bactérienne et les furanes sont majoritairement issus de l'oxydation des lipides. Les terpènes et les composés organiques volatils proviennent de l'environnement, les premiers à travers la chaîne trophique (Alasalvar *et al.* 2005) et les seconds sont vraisemblablement la trace de la pollution de l'environnement, en atteste la présence de BTEX dans la chair de nombreux poissons. Parmi tous ces composés, les esters peuvent tout de même jouer un rôle dans l'évaluation de la qualité du poisson ainsi la quantité d'éthylacétate a tendance à augmenter lors du stockage de filets de poisson en barquette, mais également lors de la congélation (Olafsdottir & Jonsdottir 2010; Leduc, Krzewinski, *et al.* 2012). Un second ester revêtant un intérêt potentiel est l'éthylbutanoate ayant aussi tendance à augmenter au cours de la conservation de filets de poisson en barquette (Olafsdottir & Jonsdottir 2010), en outre c'est un composant odorant de la chair du bar (Leduc, Tournayre, *et al.* 2012).

### **6. Le processus de fumaison : synthèse de composés phénoliques**

Les composés phénoliques possèdent la caractéristique d'être spécifiquement associés au processus de fumage, notamment lors de la fumaison des filets de poisson. Un nombre important de composés a été décrit dans la littérature, Toledo (2007) estime à près de 400 le nombre de molécules présentes au sein de la fumée, pourtant comme le figure le [Tableau III-VIII](#), seuls douze composés phénoliques contribueraient à l'odeur globale de saumon fumé (Varlet *et al.* 2006). Toledo (2007) note tout de même un point essentiel : l'essence du bois utilisé pour le fumage influence grandement la composition de la fumée. Les odeurs associées aux composés phénoliques sont de façon quasi exclusive caractérisées par des notes épicées ou empyreumatiques. Outre les propriétés olfactives, les composés phénoliques revêtent également un rôle important pour un autre paramètre organoleptique : la coloration des chairs notamment lors du fumage à froid. Enfin, les composés phénoliques jouent également un rôle en terme de sécurité sanitaire des aliments assurant en combinaison avec d'autres substances de la fumée une action bactéricide notamment sur *S. aureus*, *E. coli* ou encore *L. monocytogenes* (Toledo 2007).

### **7. Des volatils issus du processus de cuisson**

La cuisson conduit à la production de nombreux composés volatils issus de l'oxydation des lipides, parmi lesquels sont retrouvées plusieurs familles de composés ([Mot-](#)

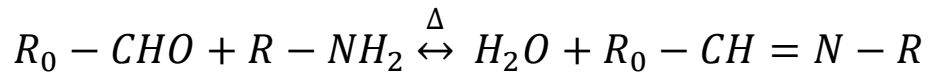


Figure 3-10 : Réaction de formation d'une base de Schiff en présence d'un groupement carbonylé et d'une amine.

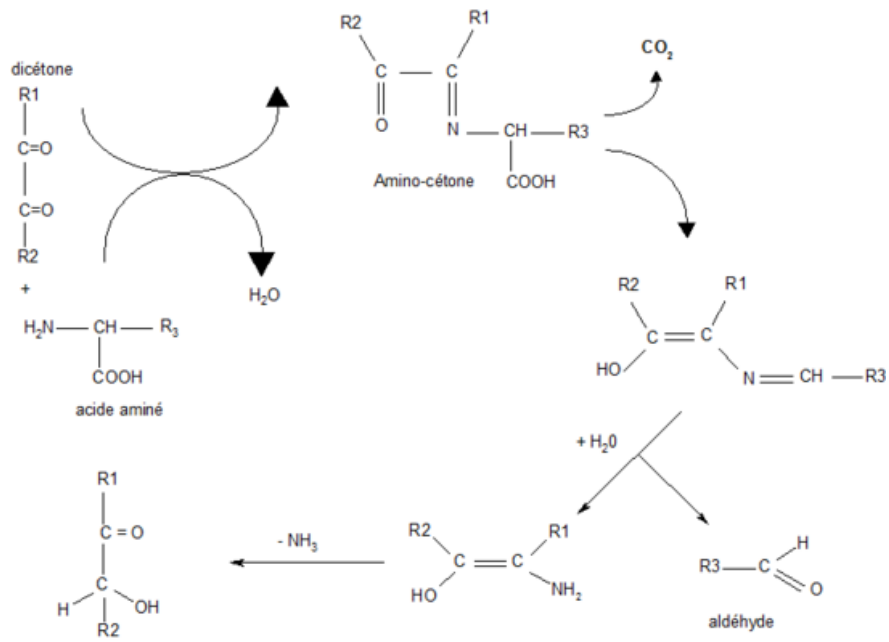


Figure 3-11 : Réactions chimiques ayant lieu lors de la dégradation de Strecker (Bouquelet 2008)

tram 1998 ; Methven *et al.* 2007). Certaines familles ne peuvent être retrouvées qu'après ce processus de cuisson, leur synthèse ayant lieu à des températures élevées. Le motif de base est un composé hétérocyclique variant par la présence d'un atome d'oxygène (furanes), d'un atome de soufre (thiophènes), d'un atome d'azote (pyrazines), de deux atomes d'azote (pyridines) ou d'un atome d'azote et d'un de soufre (thiazoles). Ces molécules ont été décrites dans le cadre de de la cuisson du saumon (Methven *et al.* 2007).

De nombreuses molécules sont issues des réactions de Maillard, qui après chauffage, conduisent à une réaction entre les sucres et les acides aminés (Maillard 1912). Il a été démontré qu'il existe plusieurs réactions de Maillard, elles débutent en présence d'un groupement carbonyle et d'un groupement amine qui forment une base de Schiff lors d'une étape initiale de condensation (figure 3-10). La base de Schiff, composé instable, subit ensuite des réarrangements, appelés produits d'Amadori (cétosylamine ou aldosylamine), permettant la synthèse de différents composés suivant plusieurs types de réactions.

Dans un premier type de réaction, celle d'énolisation après déshydratation modérée des produits d'Amadori, des réductones et des produits mono et dicarbonylés sont produits. Dans un second type de réaction, une déshydratation plus forte des produits d'Amadori est enregistrée surtout dans le cas des cétosamines et conduit à la production de réductones de furfuraldéhydes et d'hydromethyl furfural. Un troisième type de réaction consiste en des  $\beta$ -scission des produits d'Amadori et conduit à la synthèse de produits divers. Enfin un dernier type de réaction, la dégradation de Strecker, conduit à la formation d'aldéhydes, de réductones et de pyrazines (figure 3-11).

La synthèse de pyridines, notamment alkylées et de thiophènes pourrait découler de l'interaction entre des aldéhydes de Strecker et l'ammoniac ou le sulfure d'hydrogène (Mottram 1998). Les thiazoles proviendraient de la dégradation de la cystéine via la dégradation de Strecker (Methven *et al.* 2007). Dans beaucoup de cas, la présence de groupements alkyles associés molécules résulterait de la réaction de produits intermédiaires avec d'autres aldéhydes et des molécules simples comme le  $\text{NH}_3$  et l' $\text{H}_2\text{S}$  (Mottram 1998). Les furanes sont également issus des cuissons et pour partie des réactions de Maillard, ainsi furane et Methylfurane pourraient être formés par recombinaison du squelette carboné des sucres ou via la formation des aldéhydes de Strecker issus d'acides aminés (Limacher *et al.* 2008).

Il existe peu d'études sur les composés de la cuisson des produits de la pêche. Cinq classes de poissons ont été décrites en fonction des volatils émis lors de la cuisson (Josephson 1991). Des différences ont été montrées entre les poissons blancs d'eau de mer et d'eau douce, les scombridés, les truites et le saumon Pacifique. Cependant l'auteur reste relativement évasif sur les composés à l'origine des différences, outre les aldéhydes il note seulement que le 2-Methyl-3-furanthiol est à l'origine de l'odeur de bœuf ressentie pour le thon en boîte. Methven *et al.* (2007) ont recensé une centaine de composés issus de la cuisson, dont certains sont le fruit des réactions de Maillard, en outre les auteurs montrent que la synthèse

de ces derniers est directement impactée par les teneurs en méthionine et cystéine. [Milo & Grosch \(1993\)](#) ont montré que la grande majorité des composés issus de la cuisson de la truite arc-en-ciel appartiennent aux familles des cétones et des aldéhydes. De façon générale, la cuisson des poissons produit moins de composés issus des réactions de Maillard que la viande, ceci pourrait s'expliquer par la plus faible teneur en sucres dans la chair de poisson ([Methven et al. 2007](#)). Une seconde explication serait l'importante teneur en phospholipides dans la chair de poisson qui contrôlerait la synthèse des produits des réactions de Maillard ([Mottram 1998](#)).

Le présent chapitre s'est intéressé à une des conséquences de la transformation de la matrice du poisson : la production de composés volatils, suite à des processus d'altération ou de transformation de la chair. Le prochain développement se concentrera sur une des causes de la synthèse de TMA, lors de l'altération du poisson et sur des méthodologies permettant détecter des régions spécifiques de l'ADN.

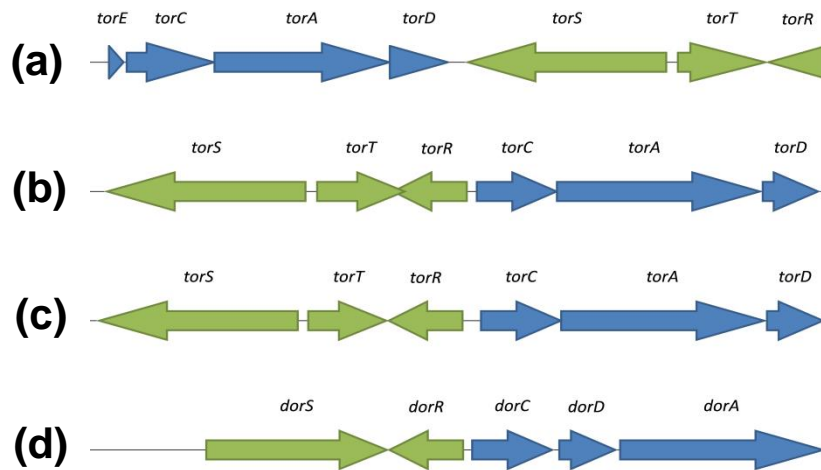
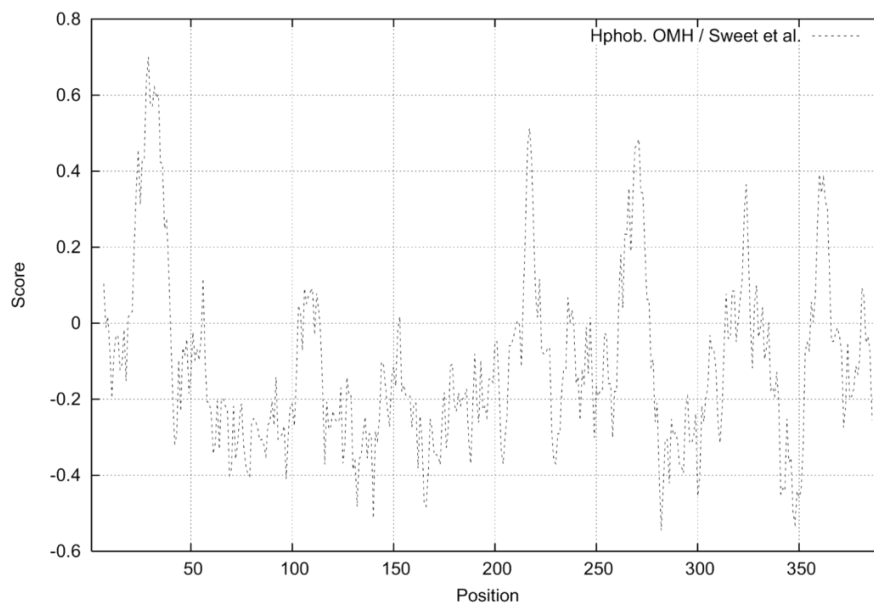


Figure 4-1 : Représentation schématique de l'organisation génétique du système TMAO réductase de *Shewanella oneidensis* MR-1 (a), *E.coli* (b), *Salmonella enterica* (c) et *Rhodobacter sphaeroides* (d). En bleu sont représentés les gènes de structure et en vert les gènes de régulation. (Dos Santos 1999; Oberto 2008)



```

10      20      30      40      50      60
MKWLTNLWRT LNKPTKALTL GAVSISAFIM GIIFWGGFNT ALEATNTEAF STSCSMESK
70      80      90      100     110     120
PYQELQETVH WSNHSGVRAT CPDCHVPHNW SRKIARKMEA SHDVWGWLFN TVNTPKFEA
130     140     150     160     170     180
KRLEMASREW KRFRDRNSLA SKNCHNYNSM KWEAMSPLAQ QSMSTDCKGII
190     200     210     220     230     240
AHLPEMGTA RAPELIAEVG SGVSSVETNQ TYYSALTKPL FFTDKGDVEA GTLNVA TKVK
250     260     270     280     290     300
VLETQ GKRIK IGIDGWRKKI GAGRVIYMDF GVNILSAQLT KDAAE TEGVI QTFE EKEDPM
310     320     330     340     350     360
TGLKWQRIEA QIWTDKDYLL TELQPLWGYA RDTFRSS STSC STSCTQPDEAHF DANTWPGMFF
370     380     390
GMLAFVNMDQ DTQALVQKYI QEHSSTFVKK EH

```

Figure 4-2 : Profil d'hydrophobicité de la protéine TorC de *S. baltica* obtenu à l'aide de l'outil ProtScale (ExPASy) et séquence d'acides aminés de cette même protéine. Les zones surlignées en vert correspondent aux motifs C-X-X-C-H caractéristiques des sites de liaison à l'hème.

---

## Chapitre 4. Détection du gène *torA*, potentiel marqueur d'altération du poisson

### I. Le gène *torA*, un potentiel marqueur de l'altération du poisson ?

Comme vu précédemment au sein du [Chapitre 2.1.4](#), la réduction de l'OTMA conduit à la formation de TMA en partie sous l'action de l'OTMA réductase de la flore d'altération. L'OTMA réductase fait partie de la famille de la diméthyl sulfoxyde (DMSO) réductase, cependant contrairement à la DMSO réductase capable de réduire de nombreux oxydes de soufre et d'azote, dont l'OTMA, l'OTMA réductase possède une spécificité de substrat vis-à-vis de l'oxyde de triméthylamine. En outre, chez *E.coli*, l'OTMA réductase assure la plus grande partie de la réduction de l'OTMA, le reste étant réalisé par la DMSO réductase ([Czjzek et al. 1998](#)). Le gène codant pour cette enzyme, *torA*, est compris au sein de l'opéron *torECAD* dont l'organisation génétique est illustrée sur la [figure 4-1](#).

#### 1. Présentation de l'opéron *tor*

Le locus *tor* a été décrit dans la littérature notamment chez *E.coli* ainsi qu'au sein du genre *Shewanella*. Plusieurs gènes de structure et de régulation sont présents au niveau de ce locus ([figure 4-1](#)), ils seront présentés dans ce paragraphe. En outre, il a été montré dans la littérature que les gènes de structures sont regroupés au sein de l'opéron *torCAD* qui constitue une unité transcriptionnelle dépendante de la présence d'OTMA chez *E.coli* ([Méjean et al. 1994](#)) en condition aérobie et anaérobie ([Ansaldi et al. 2007](#)).

##### a. Quatre gènes de structure dans le système OTMA réductase

- *torE*, gène au rôle méconnu

Il existe peu d'informations sur le gène *torE*, d'autant que ce gène n'est pas présent au sein de l'opéron *tor* de *E.coli*, ou de ceux des genres *Rhodobacter* ou *Salmonella* ([figure 4-1](#)). [Dos Santos et al. \(1998\)](#) notent qu'il coderait pour une protéine membranaire homologue à une petite protéine membranaire d'une soixantaine d'acides aminés, NapE, qui assure un rôle dans un système de nitrate réductases périplasmiques présent chez de nombreuses protéobactéries ([Sears et al. 2000](#)). Comme le note [Dos Santos \(1999\)](#), TorE pourrait faciliter l'interaction entre TorC et les quinones ([figure 4-3](#)).

- *torC*, gène codant pour un cytochrome C

*torC* est un gène codant pour un cytochrome C de 46 kDa, composé de 392 acides aminés chez *Shewanella baltica* ([figure 4-2](#)) et dont le nombre d'acides aminés peut varier en fonction des espèces bactériennes ([Dos Santos et al. 1998](#)). Une première caractéristique de TorC est la présence d'une zone hydrophobe en région N-terminale ([figure 4-2](#)), entre les résidus 18 et 38, qui permettrait l'ancrage de la protéine au sein de la membrane interne, du côté périplasmique ([Dos Santos et al. 1998](#); [Theraulaz 2007](#)). Une seconde caractéristique de TorC est la présence de cinq sites de liaison à l'hème composés du motif C-

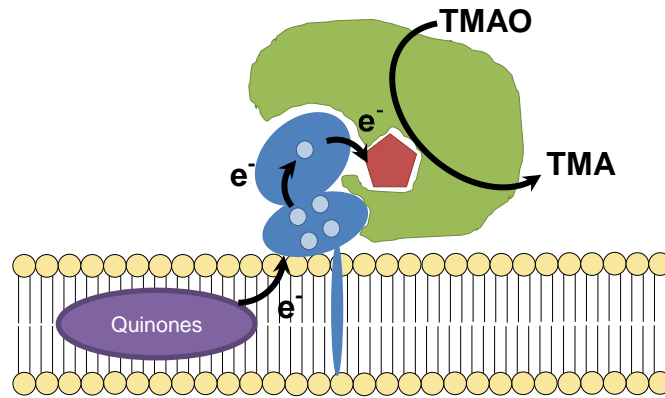


Figure 4-3 : Représentation schématique de la chaîne de transfert d'électrons des quinones vers TorA (en vert) en passant par TorC (en bleu). (Gon, Giudici-Ortoni, *et al.* 2001)

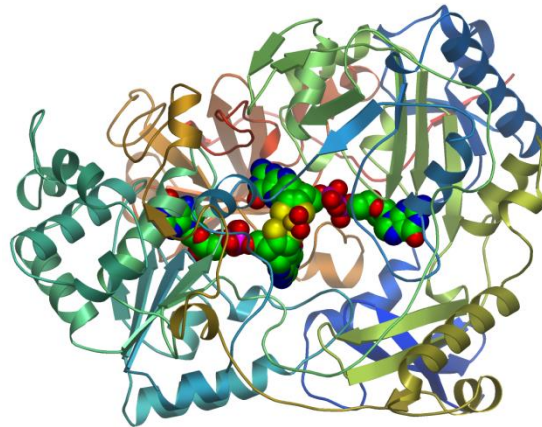


Figure 4-4 : Représentation Ribbon de la protéine TorA de *S. baltica* réalisée à l'aide de l'outil Swiss-Model (ExPASy). Le cofacteur de l'enzyme est visible dans la zone centrale de la représentation.

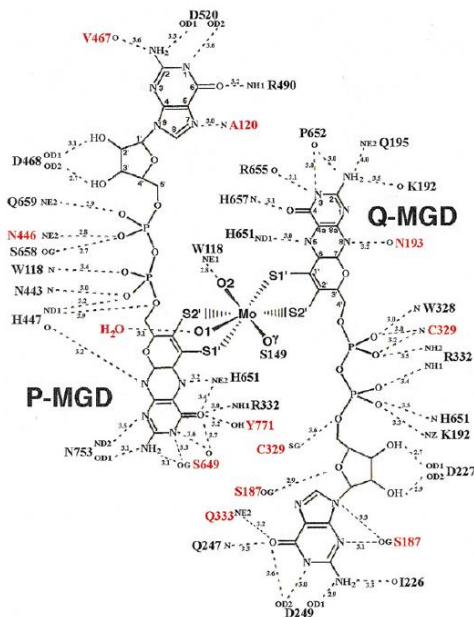


Figure 4-5 : Représentation des interactions entre les MGD du moco et l'atome de molybdène ainsi que les possibles liaisons faibles permettant de lier la protéine au moco. (Czjzek *et al.* 1998)



X-X-C-H. Ces motifs permettent une liaison de l'hème à la protéine grâce à l'établissement de deux liaisons thioesters entre les cystéines et les groupements vinyls de l'hème (Allen *et al.* 2005). Comme le montre la figure 4-2, quatre sites de fixation de l'hème sont présents sur la première moitié de la protéine, le dernier étant situé dans la région C-terminale. Les quatre hèmes de la première partie possèdent un bas potentiel rédox (deux à -177 mV et deux à -98 mV) alors que l'hème de la seconde moitié de la protéine possède un potentiel de +120 mV (Gon, Giudici-Ortoni, *et al.* 2001; Theraulaz 2007). En outre, il a été montré chez *E.coli*, que TorC assure un transfert d'électrons vers TorA via sa région C-terminale alors qu'une interaction TorC/TorA aurait lieu en région N-terminale (Gon, Giudici-Ortoni, *et al.* 2001). Le rôle de la protéine TorC serait donc de réaliser un transfert d'électrons vers la protéine TorA, ce transfert étant réalisé de la région N-terminale recevant des électrons, vraisemblablement des quinones, vers la région C-terminale grâce à la différence de potentiel rédox (figure 4-3).

- *torA*, le gène de l'OTMA réductase

Le gène *torA* code pour une protéine de 829 acides aminés dont une représentation tridimensionnelle est proposée sur la figure 4-4. Cette protéine est composée de plusieurs hélices alpha et feuillet bêta organisés en quatre domaines (Czjzek *et al.* 1998). Cette protéine est une enzyme catalysant la réaction illustrée sur la figure 2-6, elle fait partie de la famille des molybdoenzymes utilisant, comme son nom l'indique, une molécule liant le molybdène comme cofacteur. Cette molécule est généralement abrégée sous l'acronyme « moco » correspondant au terme anglo-saxon molybdenum cofactor. Le moco de l'OTMA réductase est une paire de molybdopterin guanine dinucleotide (MGD) visible au centre de la figure 4-4 (Czjzek *et al.* 1998; Theraulaz 2007). Les deux sous-unités MGD ont été nommées P-MGD et Q-MGD, elles permettent la liaison de l'atome de molybdène via sept ligands dont quatre ligands sulfido et trois ligands oxo (figure 4-5). Le moco est lui-même lié à l'OTMA réductase via des liaisons faibles comme l'ont montré Czjzek *et al.* (1998). Enfin il a été montré par Theraulaz (2007) que le moco est une molécule pouvant être présente à l'état oxydée ou réduite lui conférant une possible propriété de transfert d'électron.

TorA est une réductase périplasmique d'une taille proche de 90 kDa. L'apoprotéine TorA suit en premier lieu une étape de maturation au niveau cytoplasmique, puis dans un second temps, elle subit une translocation membranaire réalisée au niveau d'un système Tat (figure 4-6). D'un point de vue structurel, TorA possède deux motifs remarquables en région N-terminale (figure 4-7). Tout d'abord la présence d'une séquence R-R-X-F-L-K est retrouvée chez de nombreuses protéines utilisant des cofacteurs rédox comme le note Berks (1996) cité par Dos Santos *et al.* (1998). La seconde structure est un motif A-X-A correspondant au site de clivage de la séquence signal de la protéine (Méjean *et al.* 1994; Dos Santos *et al.* 1998) composée de 31 acides aminés pour la protéine TorA de *S. baltica* (figure 4-7). Après une phase de maturation consistant essentiellement à l'ajout du moco, la protéine maturée TorA est transloquée au niveau périplasmique via la voie « twin-arginine translocation »

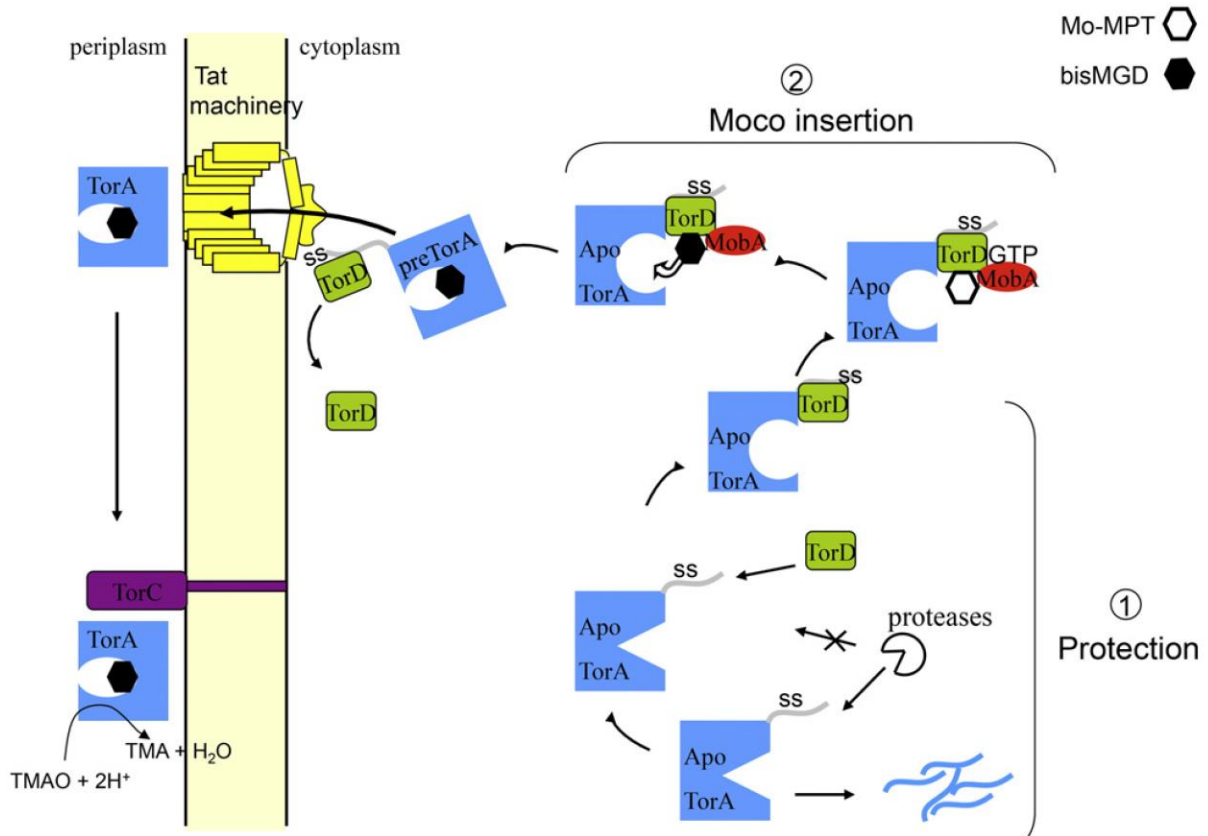


Figure 4-6 : Modèle TorD-dépendant de la synthèse, de la maturation cytoplasmique et de translocation de la molybdoenzyme TorA. (lobbi-Nivol & Leimkühler 2013)

10                      20                      30                      40                      50                      60  
 MNRRDFLKI ASSSFVVLGG SSVLAPLNAL AKAGINEDEW LTTGSHFGAF KMKRKNGVIA  
 70                      80                      90                      100                      110                      120  
 EVKPFDLKY PTDMINGIRG MVYNPSRVRY PMVRLDFLLK GHKSNTHQRG DFRFVRVTWD

Figure 4-7 : Séquence des 120 premiers acides aminés de la protéine TorA de *S. baltica*.

(Tat) (Ibbi-Nivol & Leimkühler 2013) qui reconnaît, comme son nom l'indique, l'enchaînement de deux résidus arginines au sein de la séquence R-R-X-F-L-K précédemment décrite. TorA est ensuite associée à TorC au niveau périplasmique.

- *torD*, gène codant une protéine chaperone

Le gène *torD* code pour une protéine cytoplasmique possédant une taille d'environ 200 acides aminés et d'un poids moléculaire de 22,5 kDa (Dos Santos 1999). Il a été montré d'un point de vue expérimental, chez *E.coli* que l'absence de la protéine TorD conduit à une réduction de la stabilité et de la quantité de protéine TorA (Ibbi-Nivol & Leimkühler 2013) avec une baisse de production comprise entre 70 et 80%. De façon plus spécifique, TorD jouerait un rôle de protéine chaperone de l'apoprotéine TorA en participant à sa maturation.

Une première action de TorD décrite dans la littérature est sa capacité à protéger la séquence signal de l'apoprotéine TorA de toute dégradation par les protéases (Genest *et al.* 2006). Cette protection du site de clivage protéique serait assurée par un phénomène de masquage par TorD ou à cause d'un encombrement stérique. Genest *et al.* (2006) notent que la quantité de TorD présente au sein de la cellule joue un rôle important dans le niveau de protection de l'apoprotéine. Comme le montre la figure 4-6, en l'absence de TorD la séquence signal de l'apoprotéine TorA est clivée, commençant par le résidu arginine du site de clivage A-X-A (Genest *et al.* 2006), puis dégradée via l'action de protéases cytoplasmiques (Ibbi-Nivol & Leimkühler 2013).

Le second rôle de TorD chez *E.coli* est son rôle dans l'insertion du moco au sein de l'apoprotéine TorA. Ilbert *et al.* (2003) ont mis en évidence que l'apoprotéine TorA est capable d'être faiblement activée *in vitro* en présence du moco de l'ordre de 20%, cependant l'addition de TorD dans le mélange réactionnel quadruple le niveau de maturation de l'apoprotéine TorA. Aux mêmes auteurs de montrer que la protéine TorD permettrait de modifier la conformation de l'apoprotéine TorA la rendant compétente à la réception du moco.

Un troisième rôle de TorD consisterait à faciliter la synthèse du moco par l'enzyme MobA (Ibbi-Nivol & Leimkühler 2013). La protéine TorD possède des capacités d'interaction avec MobA, ainsi que d'adhésion à différents substrats comme le MGD, le précurseur de la molybdène-molybdopterin (Mo-MPT), ou encore la guanosine triphosphate (GTP) (Hatzixanthi *et al.* 2005; Ibbi-Nivol & Leimkühler 2013). La protéine TorD assurerait un rôle de stabilisateur lors de cette étape permettant la biosynthèse de la paire de MGD et la mise en présence de l'apoprotéine TorA et de MobA pour l'insertion du moco au sein de TorA en phase ultime de maturation (figure 4-6).

L'ultime rôle, probable, de la protéine chaperone est l'adressage de la protéine TorA mature au système Tat, pour ce faire, plusieurs hypothèses ont été formulées. Des protéines de la famille TorD ont montré une capacité d'interaction avec des protéines du système Tat. L'insertion du moco modifierait la conformation du complexe TorD-TorA fragilisant la liaison entre la protéine chaperone et la séquence signal de TorA rendant possible une compéti-

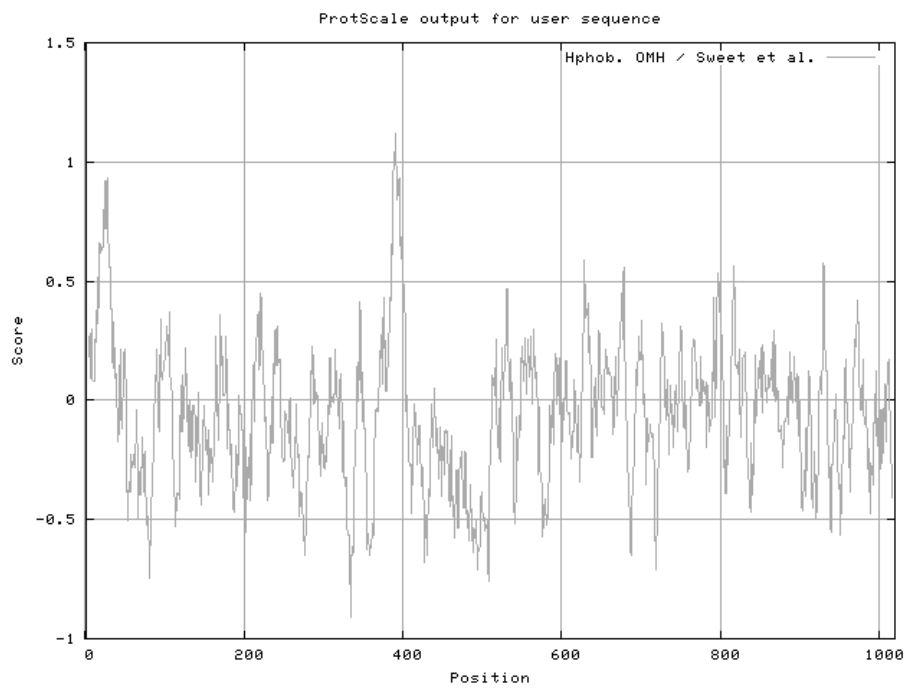


Figure 4-8 : Profil d'hydrophobicité de la protéine TorS de *S. baltica* obtenu à la l'aide de l'outil ProtScale (ExpASy).

tion entre TorD et le système Tat pour la liaison à la séquence signal (Iobbi-Nivol & Leimkühler 2013). Hatzixanthis *et al.* (2005) indique que la liaison entre TorD et la séquence signal de TorA permet une forte affinité vis-à-vis de la GTP qui gouvernerait le phénomène de liaison/libération du complexe lors de l'étape de relecture par le système Tat.

**b. Trois gènes à l'origine de la régulation de l'opéron *tor* ECAD**

- *torS*, gène codant une protéine senseur

*torS* fait partie comme *torR* d'un système de régulation à deux composants de la famille de l'*OmpR* (Kanehisa *et al.* 2012). *torS* code pour une protéine périplasmique, d'une taille de 99,5 kDa chez *E.coli*, appartenant à la famille des histidines kinases et caractérisée par l'existence de deux zones fonctionnelles (Theraulaz 2007).

Tout d'abord cette protéine forme une boucle dans sa zone N-terminale au niveau de l'espace périplasmique (Theraulaz 2007), ceci est illustré sur la figure 4-8 avec l'existence de deux régions hydrophobes, des hélices-alpha transmembranaires (Moore & Hendrickson 2009), dans les 400 premiers acides aminés de la protéine. Cette zone N-terminale est la région de TorS impliquée dans la détection de l'OTMA via son interaction avec TorT (*cf.* paragraphe suivant).

La région C-terminale de la protéine, cytoplasmique, est celle qui va assurer la transduction du signal vers la protéine TorR à travers l'intervention d'un phosphorelais en cas de présence d'OTMA. Cette zone est constituée de deux domaines transmetteurs H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub> et d'un domaine receveur D<sub>1</sub> (Jourlin *et al.* 1997). Dans un premier temps, il y a phosphorylation du résidu histidine en position 443 du domaine H<sub>1</sub> composé d'un motif consensus de liaison à l'ATP. Le groupement phosphate est ensuite transmis par relais vers l'aspartate 723 du domaine D<sub>1</sub> puis à l'histidine 850 du domaine H<sub>2</sub>. C'est de ce domaine qu'est réalisé le transfert du groupement phosphate vers le régulateur de la réponse TorR. En outre, en absence d'OTMA, la déphosphorylation de TorR est réalisée grâce au mécanisme inverse avec un relargage de phosphate inorganique au niveau du domaine D<sub>1</sub> (Ansaldi *et al.* 2001).

- *torT*, gène impliqué dans le processus de détection de l'OTMA

Le gène *torT* code une protéine périplasmique de 35,7 kDa chez *E.coli* dont la présence est nécessaire pour l'induction de l'expression de l'opéron *torCAD* (Jourlin *et al.* 1996). Il a été montré que TorT est capable de se lier à l'OTMA, la formation de ce complexe induisant un changement conformationnel de la protéine chez *E.coli* (Baraquet *et al.* 2006). Cette interaction permet la protection de TorT vis-à-vis de l'action de l'endoprotéinase GluC. La même étude a permis de montrer que le complexe OTMA-TorT est capable de se lier au domaine périplasmique de TorS, induisant une augmentation de la protection de TorS vis-à-vis de GluC et surtout l'activation la protéine TorS, conduisant à une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de TorR.

- *torR*, gène à l'origine du processus de régulation de l'opéron

*torR* code pour un protéine cytoplasmique de 236 acides aminés chez *E.coli* et *S.bal-*



*tica* (Dos Santos 1999; Oberto 2008) pour une poids de 25 kDa (Simon *et al.* 1994), qui constitue le second composant du système de régulation de l'expression du système de l'OTMA réductase. Comme vu précédemment, l'activation de TorR est le résultat d'un transfert de groupement phosphate depuis TorS. Ce groupement phosphate est vraisemblablement greffé sur le résidu aspartate en position 53 dans la région N-terminale de la protéine (Simon *et al.* 1994; Dos Santos 1999; Theraulaz 2007). En région C-terminale se situe la zone effectrice de la protéine qui interagit avec l'ADN.

La protéine TorR est capable, chez *E.coli*, de se fixer à plusieurs zones de l'ADN appelée boîtes *tor* (Simon *et al.* 1994), comme le montre la figure 4-9. Les premières boîtes décrites, l'ont été au niveau de l'espace intergénique *torR/torC* de *E.coli* (Simon *et al.* 1994; Ansaldi *et al.* 2000). Elles sont caractérisées par la présence d'un motif TTCAT relativement conservé. Deux cas de figures co-existent concernant l'interaction entre TorR et l'ADN. Premièrement lorsque la protéine TorR n'est pas phosphorylée, elle pourrait uniquement se fixer aux boîtes 1 et 2, sites de haute affinité chevauchant la zone de transcription de *torR* et exerçant *de facto* une autorégulation négative sur son expression et son maintien en faible quantité quelques soient les conditions biotiques (Ansaldi *et al.* 2000). Ensuite, en présence d'OTMA, la phosphorylation de TorR conduit à sa multimérisation en tétramères qui peuvent se fixer aux boîtes 3 et 4 induisant la transcription de l'opéron *torCAD* (Theraulaz 2007).

Pour les espèces du genre *Shewanella*, l'organisation des gènes est différente notamment entre les gènes de structures et les gènes de régulation (figure 4-1), cependant des boîtes *tor* similaires à celles de *E.coli* ont pu être mises en évidence notamment pour *S.oneidiensis*, *S. baltica* (figure 4-9) et *S.massilia* (Dos Santos 1999). D'autres structures, similaires, porteuses du motif TTCAT ont également pu être mises en évidence en amont du gène *torR* chez *S.oneidiensis*, elles ont été nommées boîtes 1' et 2' (Dos Santos 1999). Une recherche sur l'outil Bacterial and Archeal Gene Exploration Tool (BADGET) (Oberto 2008) a permis de mettre en évidence les mêmes boîtes, extrêmement conservées, pour d'autres espèces du genre *Shewanella* : *S. baltica* et *S.frigidimarina*. Au sein du genre *Shewanella*, les boîtes 1, 2, 3 et 4 permettraient ainsi l'induction de l'opéron *torECAD* et les boîtes 1' et 2' l'autorégulation négative de *torR*.

Concernant *Vibrio*, il a été noté que contrairement à *E.coli* ou aux espèces du genre *Shewanella*, il n'y avait pas de regroupement des gènes structuraux et de régulation en un lieu unique, mais ces derniers étaient regroupés par paire (Baraquet *et al.* 2006). Ainsi les auteurs notent l'existence d'une paire *torT/torS*, d'une paire *torD/torR* et d'une paire *torC/torA*. Cette dernière paire correspond vraisemblablement plus à un triplet *torE/torC/torA* comme cela est visible sur la figure 4-10. L'identification de *torE* est suggérée de par sa petite taille en amont des gènes *torC* et *torA*, similaires aux structures observées chez *Shewanella* et son identification en tant que « *periplasmic nitrate reductase system* », sachant qu'une forte homologie existe entre *torE* et *napE*. Pour chacun des paires/triplets dé-

(a) *Vibrio vulnificus* CMCP-6

> Région amont du triplet *torE/torC/torA*

```
acacattgtgtatggtctaacattttgcattagatagtgttaaaagtttcatccgttgggggtggggc  
aactgaaattactaaatacaaaataggcaaatgtatgagt
```

> Espace intergénique *torR/torD*

```
gctcatttacacacacttcatgtcatttctgtctacacgggcagatattctattcataactagtaacat  
ttctagtcatacttcgtttgaaatgcaagtatcttgatttttattgattcaaaacaagcttaatatca  
agccattaacaagctcaaatatatttatatttttcttaacaataggcggtattgttattcatttttt  
tggttacacttataggagattgatttaggagcgataaatgatgcaagagataaaagcctttaatgaaa
```

> Espace intergénique *torT/torS*

```
caccatgcccgaattgacagaaagccagtagcaggtcttttaaatgtggataaatcgcacagagttttt  
ccgccgcataaacaggggtagaaaataggattggaaggaaagtggtaaagttttgcgcaaacagtg  
aaaaaagtgtgcttagtctttaacatgcagcaaggttcattggcatcgttggaagttacgtagcaga  
tatagcgtattctccccggcgaaccaatgctgatctgctggtttgccggttgtaaggttaagaaaaat  
atgtta
```

(b) *Photobacterium profunda* SS9

> Espace intergénique *torR/torC*

```
actcattttttatctctttttattgtgtttttttagcctgataaaacgtagcacatcccattaccattc  
acaattttttcataaacccgatgcttactgtaattcttgccgtaaccttattcacatcgtggacttat  
tatcaccataaaaaatttaactacctccgtactacggaggcaattcttattcatggaatattccac  
atatgaaa
```

Figure 4-11 : Identification d'hypothétiques zones de fixation de TorR contenant le motif TTCAT (surligné en vert) au voisinage des gènes structuraux et de régulation du système OTMA réductase pour *V.vulnificus* CMCP-6 (a) et *P.profunda* SS9 (b). La séquence codante du gène en aval est figurée en rouge et celle du gène en amont est figurée en vert le cas échéant.

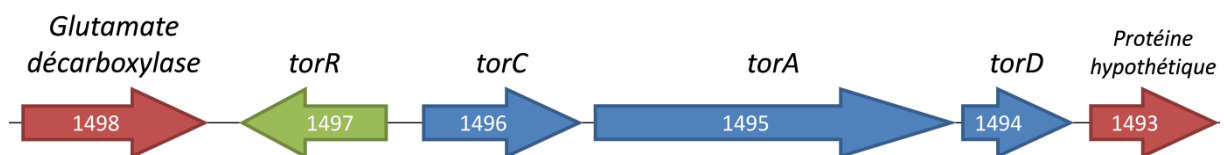


Figure 4-12 : Contexte génétique du gène *torA* pour *Photobacterium profunda* SS9 obtenu avec le serveur BADGET (Oberto 2008). Les numéros des gènes concernés sont indiqués au centre de chacune des flèches.



crits, des régions contenant des séquences TTCAT ont pu être identifiées (figure 4-11) permettant de formuler l'hypothèse qu'il s'agit de sites de fixation de TorR.

Enfin pour le genre *Photobacterium*, les informations ont été plus difficiles à retrouver compte tenu du fait que l'outil BADGET ne contient que les données relatives à une espèce *P. profunda* (figure 4-11). Néanmoins, il semblerait que l'organisation des gènes soit plus regroupée, par rapport à celle enregistrée pour *Vibrio*, à l'image de celle rencontrée pour le genre *Shewanella* ou *E.coli*. Il convient de noter que certains gènes ne sont pas retrouvés dans cette région comme *torS*, *torT* et *torE* (figure 4-12). Après consultation de Genbank et des données issues du séquençage du génome de *P. phosphoreum* ANT220 de 2014 (Zhang *et al.*, 2014), il semblerait que *torS* et *torT* soient comme pour *Vibrio* regroupés en paire. En outre, l'espace intergénique *torR/torC* laisse apparaître l'existence de potentielles boîtes *tor*, le motif TTCAT y étant rencontré à deux reprises.

### c. Régulation « annexe » du système OTMA réductase

En dehors de la régulation « intrinsèque » du système OTMA réductase par TorR deux systèmes de régulation négative annexes ont été décrits dans la littérature chez *E.coli*.

Le premier système fait intervenir la forme non mature de TorC ; en effet, l'apoprotéine TorC, lorsqu'elle est présente en quantité importante, a tendance à occasionner une baisse de la capacité à utiliser l'OTMA (Ansaldi *et al.* 1999). Gon, Jourlin-Castelli, *et al.* (2001) ont montré que l'apoprotéine TorC n'était pas capable d'interagir avec la protéine TorA. En revanche, il a été montré que la région N-terminale de la protéine immature était capable d'interagir avec la partie N-terminale de TorS, assurant le rôle de détection de l'OTMA.

Cela conduit à une régulation négative l'opéron *tor*. Theraulaz (2007) note que ce mécanisme de régulation pourrait éviter une saturation dans le processus de maturation de l'apocytochrome C.

Un second système a également été décrit chez *E.coli*, il fait intervenir une protéine de 66 acides aminés originaire d'un phage (Ansaldi *et al.* 2004). Les mêmes auteurs ont montré que la transcription de l'opéron *tor* est fortement diminuée en cas de surexpression de *torI*. Le mode d'action de TorI, en aval de TorS, fait intervenir une liaison de l'inhibiteur à la région effectrice de TorR tout en n'empêchant pas la liaison de TorR à l'ADN (Ansaldi *et al.* 2004). L'action inhibitrice de cette protéine résiderait donc dans sa capacité à prévenir la liaison de l'ARN polymérase au niveau de la région promotrice de l'opéron *tor*. La protéine TorI a été décrite chez *Escherichia coli* et *Photobacterium*, en revanche aucune donnée de Genbank ne fait état de la présence du gène pour *Shewanella* et *Vibrio*, cependant Ansaldi *et al.* (2004) notent que pour ce dernier genre des homologues de TorI y sont retrouvés.

Après avoir vu l'opéron *tor* et ses modes de régulations, le prochain développement s'attachera à décrire les flores bactériennes possédant un système OTMA réductase.

**Tableau IV-I : Similarités observées entre les séquences du gène *torA* de trois genres bactériens après alignement à l'aide de ClustalW2.**

<b>Séquence A</b>	<b>Taille (pb)</b>	<b>Séquence B</b>	<b>Taille (pb)</b>	<b>Similarité (%)</b>
<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	2462	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810	2463	86,27
<i>Shewanella massilia</i>	2490	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	2490	84,18
<i>Photobacterium phosphoreum</i> ANT220	2469	<i>Photobacterium damsela</i> e CIP 102761	2424	81,77
<i>Photobacterium damsela</i> e CIP 102761	2424	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	2462	78,22
<i>Photobacterium damsela</i> e CIP 102761	2424	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810	2463	77,64
<i>Photobacterium phosphoreum</i> ANT220	2469	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	2462	76,77
<i>Photobacterium phosphoreum</i> ANT220	2469	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810	2463	75,48
<i>Photobacterium damsela</i> e CIP 102761	2424	<i>Shewanella massilia</i>	2490	68,77
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810	2463	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	2490	68,37
<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	2462	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	2490	68,24
<i>Photobacterium damsela</i> e CIP 102761	2424	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	2490	68,23
<i>Photobacterium phosphoreum</i> ANT220	2469	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	2490	68,08
<i>Photobacterium phosphoreum</i> ANT220	2469	<i>Shewanella massilia</i>	2490	67,84
<i>Shewanella massilia</i>	2490	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	2462	67,51
<i>Shewanella massilia</i>	2490	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AQ3810	2463	67,19

## 2. Plusieurs flores du poisson impliquées dans la réduction de l'OTMA

Comme cela a pu être noté dans le paragraphe précédent, plusieurs genres bactériens possèdent un système OTMA réductase avec notamment des flores ayant été décrites comme de potentielles flores d'altération du poisson d'eau de mer : *Shewanella*, *Photobacterium* ou simplement présentes au sein de l'environnement du poisson comme *Vibrio*.

Le système OTMA réductase a été bien décrit en ce qui concerne *Shewanella* (Dos Santos *et al.* 1998) allant même jusqu'à l'obtention de la structure cristallisée de l'enzyme (Czjzek *et al.* 1998). Les données concernant les systèmes de *Vibrio* et *Photobacterium* sont moins importantes dans la littérature bien qu'une activité OTMA réductase ait été décrite pour ces deux genres bactériens (Unemoto *et al.* 1965; Proctor & Gunsalus 2000; Gram & Dalgaard 2002).

Ce gène est donc, pour plusieurs raisons, une cible d'intérêt pour suivre ces différentes souches dans le cadre de l'altération du poisson. Une première raison de ce ciblage préférentiel est que malgré des organisations génétiques différentes, il est retrouvé pour l'ensemble des genres bactériens d'intérêts présents dans l'environnement du poisson ou participant à son altération (figure 4-1, figure 4-10 et figure 4-12). Une seconde raison est que ce gène codant directement pour la triméthylamine réductase, il peut donc revêtir le rôle de marqueur indirect de l'état d'altération du poisson, partant du principe que plus le poisson est altéré, plus la charge bactérienne d'altération est importante et donc *de facto* plus le nombre de copies du gène présent au sein de la chair du poisson est important. En outre, la détection du gène *torA* au sein de la chair de poisson a déjà fait l'objet de différents travaux (*cf.* point II.3.). En revanche, suivre l'expression de ce gène en cours d'altération paraîtrait de prime abord moins intéressant compte tenu du fait qu'il a été montré que le niveau d'expression de *torA* n'est pas uniforme tout au long de la croissance bactérienne. En effet, comme l'ont illustré Ansaldi *et al.* (2007) le niveau d'expression est maximal durant la phase exponentielle, alors que les niveaux en fin de phase de latence et en début de phase stationnaire sont nettement plus faibles. Le Tableau IV-1 recense des résultats de comparaison des séquences du gène *torA* issues de deux espèces pour chacun des genres d'intérêts. Ces résultats sont une image de la variabilité observée et ne se veulent pas une représentation exhaustive de la variabilité intra et inter-genre. Néanmoins, ils montrent que les séquences sont relativement différentes entre les espèces bactériennes, mais également au sein d'un même genre. Ainsi la comparaison de deux séquences de *Vibrio* donne un pourcentage d'identité de séquence de 86,3% lorsque ce pourcentage n'est que de 81,8% pour deux séquences de *Photobacterium*. En comparant deux séquences issues de genres différents les différences s'accroissent puisque *Shewanella* partage entre 67,2% et 68,7% d'identité avec les séquences de *Vibrio* et *Photobacterium*. Ces mêmes genres possèdent des identités de séquences plus importantes ceci pouvant s'expliquer par le fait qu'il s'agit de membres de la même famille bactérienne : celle des *Vibrionaceae*. A plus grande échelle, la

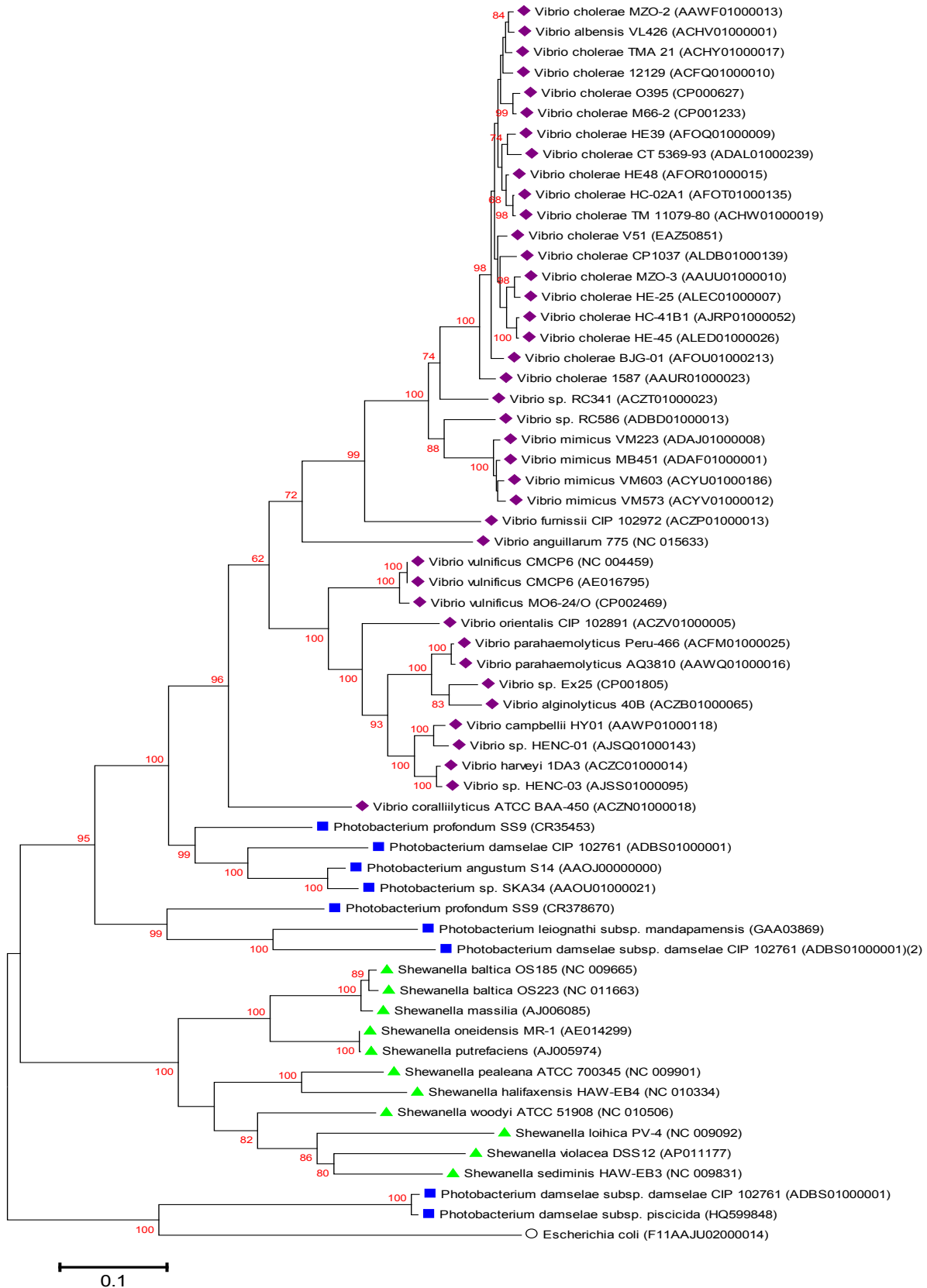


Figure 4-13 : Alignement de 2290 nucléotides provenant de 62 séquences du gène *torA* issues de trois genres bactériens, par la méthode du maximum de vraisemblance en utilisant le modèle de Kimura à deux paramètres. Le pourcentage indiqué représentant la vraisemblance des groupes formés après un test de bootstrap. Avec ■ représentant les *Photobacterium*, ◆ les *Vibrio*, ▲ les *Shewanella* et ○ la souche de *E.coli* servant de groupe externe. La distance indiquée par la barre illustre 10% de différence entre deux séquences. exponentielle, alors que les niveaux en fin de phase de latence et en début de phase stationnaire sont nettement plus faibles.

figure 4-13 propose un arbre phylogénétique de *torA*. Il apparaît que les séquences sont globalement regroupées par genre bactérien. Deux sous-groupes apparaissent au sein de *Vibrio* dont un est composé de *V.cholerae* et *V.mimicus*. Les séquences du gène *torA* au sein de *Vibrio* semblent être plus conservées que celles des genres *Shewanella* et *Photobacterium*. Ainsi, comme le montre la figure 4-13, les distances séparant les séquences des gènes *torA* des souches de ces genres bactériens sont plus importantes que celles observées au sein de *Vibrio*. Ce dernier point va à l'encontre de ce qui a été conjecturé sur la conservation des séquences de *torA* au sein du genre *Shewanella* (Dos Santos 1999). En outre l'ensemble des dissimilarités de séquence est répartie de façon relativement homogène tout au long de la séquence du gène *torA*.

Après avoir introduit le fonctionnement du système OTMA réductase et compte tenu du fait que le gène *torA* pourrait constituer un marqueur d'altération, il convient désormais de présenter les enjeux de la détection de gènes au sein de matrices alimentaires, ceci sera l'objet du prochain développement.

## II. Quantification de microorganismes dans les matrices alimentaires

Les techniques moléculaires sont utilisées dans le domaine de l'agroalimentaire et ce pour de nombreuses applications : détection d'OGM, authenticité des produits et enfin sécurité sanitaire des aliments avec la recherche de pathogènes (Rodríguez-Lázaro *et al.* 2013). Ce dernier développement est l'approche majoritaire décrite jusqu'à présent pour la quantification de microorganismes dans les matrices alimentaires.

### 1. Impacts de la matrice sur la méthode de détection et de quantification

La qPCR est une méthode reposant particulièrement sur le prérequis que la cible à détecter, *i.e* l'ADN, est présent en quantité et qualité suffisantes pour que le processus d'amplification puisse opérer (Postollec *et al.* 2011). Plusieurs étapes ont été identifiées comme jouant un rôle crucial dans la perturbation de l'amplification : l'inhibition de la lyse cellulaire lors de l'extraction de l'ADN, la dégradation des séquences nucléotidiques ou encore l'inhibition de la *taq* polymérase (Wilson 1997). Plusieurs composants peuvent ainsi jouer le rôle d'inhibiteur comme les constituants des aliments qui sont d'un point de vue biochimique des matrices complexes, les constituants des milieux de pré-enrichissement souvent utilisés dans le cadre de la recherche de pathogènes, des constituants cellulaires, mais également le matériel de laboratoire (Rossen *et al.* 1992; Wilson 1997).

#### a. Inhibiteurs retrouvés au cours du processus analytique

Comme le montre le Tableau IV-II de nombreux inhibiteurs potentiels ont pu être mis au jour, mais bien souvent la concentration nécessaire à l'obtention d'une inhibition effective, n'est pas atteinte au sein du mélange réactionnel (Rossen *et al.* 1992). En se basant sur le cas concret de la chair de poisson, au regard des données, seules les protéines, le NaCl et les graisses, dans le cas des poissons gras, peuvent *a priori* poser des problèmes d'inhibi-

Tableau IV-II : Liste recensant quelques constituants pouvant jouer le rôle d'inhibiteurs pour la réaction PCR d'après le travail de Rossen *et al.* (1992). Les données sont communiquées dans le cadre d'une PCR réalisée pour un volume final de 100 µL.

Constituants	Absence d'inhibition	Inhibition
<i>Constituants d'aliments/cellulaires</i>		
NaCl	0,6 mg	1 mg
Saccharose	5 µg	10 µg
Glucose	2 µg	n.d <sup>2</sup>
Hydrolysate de caséine	0,1 mg	1 mg
L-phénylalanine	0,5 mg	n.d
Ovalbumine	0,1 mg	0,25 mg
Phosphatidylcholine	10 mg	n.d
Sang <sup>3</sup>	2 µL	4 µL
Huile de poisson	50 µL	n.d
ADN	4 µg	0,4 mg
<i>Milieus de cultures</i>		
Eau peptonée	10 µL	n.d
Milieu LEB <sup>1</sup>	10 µL	n.d
Fraser	5 µL	10 µL
Milieu Rappaport	1 µL	10 µL
<i>Constituants de kit d'extraction</i>		
Phénol	0,1%	0,5%
Chloroforme	5%	n.d
SDS	0,0005%	0,01%
Tween 20	2%	10%
Triton X-100	1%	2%
Lysozyme	n.d	0,5 mg/mL
NaOH	5 mM	8 mM
Ethanol	2,5%	5%
EDTA	0,1 mM	1 mM
Protéinase K	0,5 mg/mL	n.d

<sup>1</sup> LEB : Listeria enrichment broth ; <sup>2</sup> nd : non-déterminé ; <sup>3</sup> Mercier *et al.* (1990)

tions. Pour les deux premiers il paraît difficile d'avoir des teneurs dépassant le seuil d'inhibition au sein du mélange réactionnel. Concernant l'impact de la teneur en composés gras, des phénomènes d'inhibitions ont pu être mis en évidence notamment sur des huiles d'olive, mais les teneurs en corps gras sont largement plus élevées que celles rencontrées dans le cadre du poisson. La présence d'enzymes endogènes, notamment de protéinases, a également montré des capacités à inhiber la réaction de PCR dans le cadre d'analyse de fromages. Dans ces deux cas, des traitements préalables des échantillons ont permis de surmonter les inhibitions comme cela est présenté dans le point 1.b.

Concernant les milieux de cultures, l'impact de ceux-ci est surtout observable dans le cadre de l'étape de pré-enrichissement. Celle-ci a pour but d'abaisser la sensibilité d'une méthode qPCR, notamment dans le cadre de la recherche de pathogènes, mais également de réduire l'impact d'éventuels inhibiteurs (Rodríguez-Lázaro *et al.* 2013). Rossen *et al.* (1992) notent que les milieux non-sélectifs, comme l'eau peptonée ou le LEB, sont peu enclins à inhiber la réaction de polymérisation en chaîne. En revanche, des milieux sélectifs comme les milieux rappaport ou fraser sont susceptibles de présenter des propriétés inhibitrices pour des volumes équivalents. La présence de sels biliaires, d'esculine ou encore de  $MgCl_2$  en quantités importantes pourrait expliquer les inhibitions observées. De façon générale, il convient donc d'utiliser des milieux non-sélectifs sur une période d'incubation longue pour l'étape de pré-enrichissement (Kuchta 2013).

Une dernière étape pouvant jouer un rôle dans l'inhibition est l'extraction. En effet, de nombreux composés sont utilisés pour cette étape. Les détergents comme le Tween 20 ou le Triton X100 n'ont vraisemblablement que peu d'impact sur l'inhibition compte tenu des teneurs nécessaires à l'inhibition et celles rencontrées dans les différents protocoles d'extraction. Les enzymes telles que le lysozyme ou la protéinase K peuvent poser quelques problèmes notamment sur la dégradation de la taq polymérase. Le sodium dodecyl sulfate (SDS), l'hydroxyde de sodium et l'EDTA sont, quant à eux, présents à des niveaux bien supérieurs à la concentration inhibitrice, dans les solutions d'extraction : leur élimination est donc cruciale. Le SDS et l'hydroxyde de sodium peuvent vraisemblablement agir sur la dénaturation des protéines, la seconde molécule pouvant également atteindre l'intégrité de l'ADN. L'EDTA étant un agent chélateur, il participerait au blocage des ions  $Mg^{2+}$  jouant un rôle de cofacteur pour la taq polymérase (Rossen *et al.* 1992). Le risque concernant l'éthanol est de précipiter l'ADN stoppant *de facto* la réaction de PCR, cependant compte tenu des concentrations rencontrées le risque paraît relativement faible.

De nombreux inhibiteurs de la réaction de PCR sont identifiés, d'autres n'ont pas été mis au jour (Wilson 1997), leur mode d'action reste pour quelques-uns incertains. Si un travail de caractérisation des inhibiteurs a bien été réalisé, l'impact de la potentialisation d'effets inhibiteurs reste encore peu renseigné. Une des voies permettant de s'affranchir de l'inhibition par un « effet matrice » consiste à isoler l'ADN à partir de la matrice par extraction, cette

stratégie fera l'objet du développement suivant.

**b. L'extraction de l'ADN rempart potentiel à l'inhibition ?**

L'extraction de l'ADN permet la réalisation de deux actions parallèles : concentration de l'ADN d'une part et élimination d'inhibiteurs potentiels d'autre part. L'extraction de l'ADN peut être réalisée directement à partir de la matrice alimentaire ou à partir d'un pré-enrichissement, pour la quantification de pathogènes par exemple (Kuchta 2013).

De nombreuses techniques d'extraction d'ADN à partir de matrices alimentaires ont été décrites comme l'extraction sur phase solide (SPE), l'extraction liquide/liquide après précipitation de l'ADN dans une solution de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) ou par la technique de séparation immunomagnétique (Hird *et al.* 2003; Olexová *et al.* 2004; Oraby *et al.* 2005; Pinto *et al.* 2007). Dans le domaine du contrôle des aliments, la SPE et l'extraction liquide/liquide après précipitation à l'aide de CTAB sont les méthodes les plus utilisées (Kuchta 2013), d'autant que de nombreux kits commerciaux performants sont désormais à la disposition des scientifiques (Postollec *et al.* 2011).

Dans le cadre de recherche de microorganismes, le passage par une étape de pré-enrichissement ou, dans un cadre plus large, par une étape de mise en solution de la matrice lors d'un broyage va nécessiter une étape de concentration des bactéries, préalable à l'extraction. Plusieurs méthodes existent parmi lesquelles la microfiltration, la centrifugation ou l'immunoséparation (Minarovicova *et al.* 2010; Marathe *et al.* 2012; Chen *et al.* 2014). Les deux premières méthodes restent les plus simples à mettre en place et demeurent les moins coûteuses, néanmoins elles sont peu spécifiques. Plus particulièrement, la méthode de centrifugation présente le risque de concentrer des inhibiteurs et celle de filtration est soumise aux aléas de colmatage du filtre par les débris de matrice. La méthode d'immunoséparation offre une spécificité accrue grâce à l'utilisation d'anticorps adsorbés sur des microbilles, cette méthode permet une certaine rapidité de l'extraction, néanmoins elle reste relativement chère au regard des méthodes précédemment décrites (Kuchta 2013).

Enfin, dans certains cas, l'extraction à partir de certaines matrices peut s'avérer difficile comme par exemple à partir de fromage ou d'huile, des méthodes particulières ont pu être développées pour pallier l'action d'inhibiteur. Ainsi l'utilisation d'un mélange SDS/NaOH chauffé à 90°C (Rossen *et al.* 1991) permettrait l'inactivation des protéinases présentes au sein des fromages et pouvant nuire à l'activité de la taq polymérase (Rossen *et al.* 1992). Dans le cadre de produits à forte teneur en matières grasses, l'alternance de phases de surgélation/décongélation a permis de réaliser des PCR à partir d'huiles d'olive (Busconi *et al.* 2003). Dans certains cas, la présence d'inhibiteurs peut être jugulée par l'utilisation de composés « facilitateurs » comme le diméthyl sulfoxyde (DMSO) qui permettrait l'élimination de réaction spécifique (Wilson 1997; Kuchta 2013).

## **2. Quantification de flores pathogènes dans les aliments**

En 2012, le nombre de foyers d'intoxications alimentaires a été évalué à 5363 au sein



Tableau IV-III : Nombre de foyers d'intoxications alimentaires et de cas reportés au sein de l'union européenne en 2012. Le tableau recense uniquement les foyers étayés par des preuves tangibles. (EFSA 2014)

Agents responsables	Nombre	Importance relative	Cas humains		
			Cas	Hospitalisés	Décès
<i>Salmonella</i>	347	45,5 %	5 787	985	10
Toxines bactériennes <sup>a</sup>	127	16,6 %	2 938	121	2
Virus <sup>b</sup>	105	13,8 %	14 892	124	2
<i>Campylobacter</i>	25	3,3 %	198	17	0
<i>Escherichia coli</i> pathogènes	22	2,9 %	160	81	0
Parasites <sup>c</sup>	14	1,8 %	639	40	0
Autres agents bactériens <sup>d</sup>	10	1,3 %	156	52	9
Inconnu	51	6,7 %	999	56	0
Autres causes <sup>e</sup>	62	8,1 %	478	39	1
<b>Total Union européenne</b>	<b>763</b>	<b>100 %</b>	<b>26 247</b>	<b>1 515</b>	<b>24</b>

<sup>a</sup> Les toxines bactériennes incluent les toxines produites par *Bacillus*, *Clostridium* et *Staphylococcus*. <sup>b</sup> Les virus incluent les calicivirus, l'hépatite A, les flavivirus et les rotavirus. <sup>c</sup> Les parasites incluent les *Trichinella*, *Cryptosporidium*, *Giardia* et *Anisakis*. <sup>d</sup> La classe des « autres agents bactériens » inclue *Listeria*, *Brucella*, *Shigella*, *Vibrio* et *Francisella*. La classe « autres causes » inclue les toxines fongiques, les biotoxines marines, l'histamine, les mycotines et l'atropine.

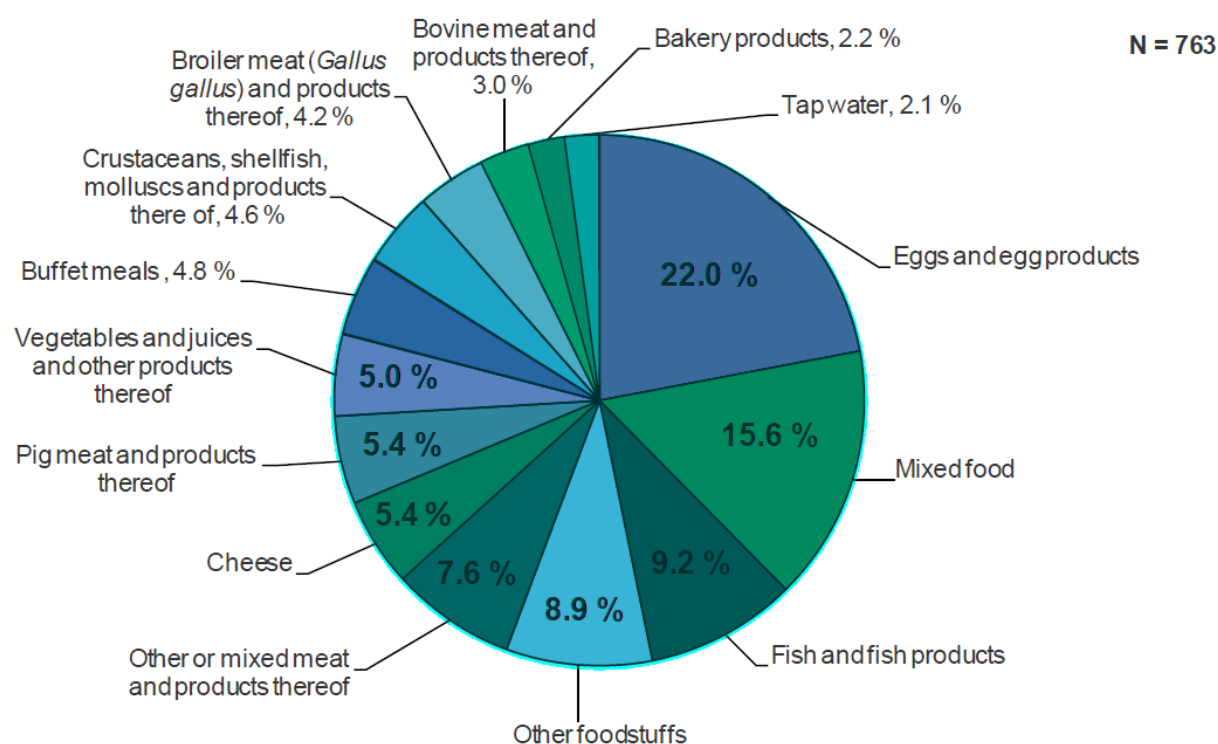


Figure 4-14 : Répartition en fonction des aliments vecteurs, des foyers d'intoxications alimentaires étayés par des preuves tangibles en 2012 au sein de l'union européenne. (EFSA 2014)

de l'union européenne. Dans 14% des cas, ils ont été bien renseignés avec la fourniture de preuves étayées (EFSA 2014). Comme le montre le Tableau IV-III, dans près de 70 % des cas les foyers sont causés par des bactéries (45,5% des cas étant uniquement dus au genre *Salmonella*). Les aliments présentant des risques sont de nature diverse comme les œufs, les produits de la pêche, la viande et le fromage (figure 4-14). La recherche de pathogènes au sein des matrices alimentaires revêt donc un intérêt majeur compte tenu des enjeux de sécurité sanitaire qui en découlent et de l'obligation, pour les acteurs industriels et économiques, d'empêcher l'arrivée d'aliments impropres à la consommation dans les rayonnages des lieux de vente (Berghof-Jäger 2013). Jusqu'à présent les méthodes microbiologiques ont été utilisées, bien qu'elles nécessitent un temps élevé d'analyse ; l'arrivée de la qPCR a permis le développement d'approches rapides, sensibles et précises qui tendent peu à peu à remplacer les méthodes habituelles et sont en voie de normalisation (Berghof-Jäger 2013).

Ainsi concernant la rapidité de l'analyse, il a été montré que la qPCR permettait de réduire de 46H la détection de membres du groupe *B. cereus* dans des gélatines alimentaires par rapport à la méthode de référence (Reekmans *et al.* 2009), de près de quatre jours la recherche de *Salmonella* dans des carcasses de viandes en comparaison avec la norme ISO de référence (McGuinness *et al.* 2009) et enfin de cinq jours le temps d'analyse pour la recherche de *L. monocytogenes* dans des légumes (Aparecida de Oliveira *et al.* 2010) . Les résultats et la sensibilité obtenus avec les méthodes de qPCR sont généralement identiques à celles des méthodes microbiologiques (Alarcon *et al.* 2006; McGuinness *et al.* 2009; Aparecida de Oliveira *et al.* 2010) néanmoins certaines études font état d'écart observés comme par exemple une différence d'un logarithme pour la quantification de membres du groupe *B. cereus* dans des préparations à base de céréales (Martínez-Blanch *et al.* 2009) ou de levures dans des produits laitiers (Makino *et al.* 2010). Plusieurs raisons sont avancées par les auteurs parmi lesquelles la détection de viables non-cultivables et de cellules mortes, néanmoins d'autres causes ont pu être évoquées par d'autres auteurs comme le ciblage de gènes multicopies ou le dénombrement d'UFC sur boîte de Petri provenant de plus d'une cellule initialement (Postollec *et al.* 2011).

Les critères microbiologiques appliqués aux denrées alimentaires sont généralement bien inférieurs aux limites de quantification et de détection moyennes enregistrées en qPCR allant de 100 à 1000 UFC/g (Postollec *et al.* 2011). Afin d'obtenir de bonnes sensibilités de la méthode de qPCR, des étapes de pré-enrichissement sont généralement utilisées. Ainsi la sensibilité, après pré-enrichissement, est de l'ordre de 1 UFC/100 cm<sup>2</sup> dans des carcasses d'animaux ou de 1 UFC/g dans diverses matrices alimentaires dans le cadre de la recherche de *Salmonella* (McGuinness *et al.* 2009; Chen *et al.* 2010). Des niveaux similaires ont pu être observés pour la recherche de *L. monocytogenes* (Aparecida de Oliveira *et al.* 2010) ou *E.coli* (Takahashi *et al.* 2009). Bien qu'ajoutant une étape supplémentaire dans le processus analytique, le pré-enrichissement permet d'améliorer de façon significative les limites de dé-

**Tableau IV-IV : Exemples d'applications, non-exhaustives, de méthodes de PCR quantitative pour la détection/quantification de microorganismes pathogènes issus de diverses matrices alimentaires.**

<b>Matrices</b>	<b>Gènes ciblés</b>	<b>Genres ou espèces</b>	<b>Références</b>
Oeuf, lait, viandes	<i>invA</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Anderson <i>et al.</i> 2011
Aliments divers	<i>invA</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Elizaquível <i>et al.</i> 2011
Viandes	<i>invA</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Suo <i>et al.</i> 2010
Viandes	<i>ssrA</i>	<i>Salmonella</i> spp.	McGuinness <i>et al.</i> 2009
Aliments divers	<i>bipA, cje0832</i>	<i>Campylobacter</i> (4 espèces)	Bonjoch <i>et al.</i> 2010
Fruits, produits laitiers	Kit commercial	<i>C.jejuni, C. coli &amp; C.lari</i>	Vencia <i>et al.</i> 2014
Volailles	<i>rpoB, hipO</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	Melero <i>et al.</i> 2011
Viande	<i>stx1, stx2</i>	<i>E. coli</i>	Perelle <i>et al.</i> 2007
Aliments divers	<i>uidAR</i>	<i>E. coli</i>	Elizaquível <i>et al.</i> 2011
Viandes	<i>rfbE</i>	<i>E. coli</i>	Suo <i>et al.</i> 2010
Saumon cru et fumé	<i>hly</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Rodriguez-Lazaro <i>et al.</i> 2005
Lait	<i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Yang <i>et al.</i> 2007
Aliments divers	<i>hly</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Elizaquível <i>et al.</i> 2011
Viandes	<i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Suo <i>et al.</i> 2010
Légumes verts	<i>ARNr 16S</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Aparecida de Oliveira <i>et al.</i> 2010
Lait	<i>nuc</i>	<i>S. aureus</i>	Aprodu <i>et al.</i> 2011
Viande	<i>nuc</i>	<i>S. aureus</i>	Alarcon <i>et al.</i> 2006
Lait	<i>egc</i>	<i>S. aureus</i>	Fusco <i>et al.</i> 2011

tections et quantification des méthodes qPCR au sein des aliments. Néanmoins, il convient d'avoir à l'esprit que la quantification directe de la flore pathogène initialement présente dans le produit est impossible lors de l'utilisation de pré-enrichissement (Postollec *et al.* 2011), une calibration de la méthode est donc nécessaire *a priori*. Certaines méthodes permettent de s'affranchir de pré-enrichissement tout en conservant des niveaux de sensibilité acceptables. Celles-ci s'appuient sur des techniques de concentration des microorganismes, notamment avec des centrifugations utilisant des gradients de densité (Fukushima *et al.* 2007).

Concernant les molécules chimiques utilisées pour la détection du signal, les plus utilisées sont le Sybr Green I pour la détection aspécifique de signal et les sondes d'hydrolyse Taqman pour les signaux spécifiques. Actuellement des méthodes dites multiplexes se développent, elles permettent la détection/quantification conjointe de différents pathogènes ou différentes cibles moléculaires en utilisant des sondes d'hydrolyse émettant des signaux sur différentes longueurs d'onde de façon à pouvoir traiter leurs signaux séparément. Une méthode a ainsi permis de développer un technique de détection conjointe de *Salmonella* spp., *E.coli* O157 :H7 et *L. monocytogenes* dans plusieurs types de viande (Suo *et al.* 2010).

Le Tableau IV-IV reprend une liste non-exhaustive d'application de la PCR en temps réel pour la détection et la quantification de pathogènes dans des matrices alimentaires. Une grande majorité de pathogènes rencontrés dans ces matrices et à l'origine d'intoxications alimentaires (Tableau IV-III) sont désormais quantifiable par qPCR. Pour certaines flores, comme *Samonnella* spp., *S. aureus* ou *L. monocytogenes*, des cibles de détection sont généralement identiques entre les diverses applications. Ainsi *Salmonella* spp. est généralement détectée en ciblant le gène *invA* codant pour une protéine impliquée dans le processus de pénétration des bactéries dans les cellules. Dans le cadre de la détection de *S. aureus*, c'est le gène *nuc* qui est particulièrement ciblé, il code pour une nucléase exocellulaire thermostable spécifique de cette espèce bactérienne (Brakstad *et al.* 1992). La recherche de *L. monocytogenes* au sein de matrices alimentaires est dans la majorité des cas réalisée en ciblant le gène *hly* codant pour la listériolysine O facteur de virulence de *L. monocytogenes*, permettant la sortie de la bactérie quant elle est séquestrée au sein du phagosome (Bertrand 2005). Contrairement aux cas présentés ci-dessus, les cibles de certains genres et espèces bactériennes, comme *E.coli* ou *Campylobacter*, sont plus diverses comme illustré dans le Tableau IV-III, néanmoins les cibles visées restent en majorité en lien avec la virulence (gènes *stx*, *rfbE*) ou sont spécifiques du genre étudié (gène *hipO*).

Près de 14 % des foyers d'intoxication alimentaire sont le résultat d'intoxications dues aux produits de la pêche et de l'aquaculture (Tableau IV-III). Dans le cadre spécifique de ces matrices alimentaires, la technique de qPCR a permis de contribuer à la recherche de différents pathogènes mais également de flores histaminogènes.

Plusieurs pathogènes ont pu être mis en évidence par qPCR dans les fruits de mer frais et transformés c'est notamment le cas pour *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. au-*

**Tableau IV-V : Exemples d'applications, non-exhaustives, de méthodes de PCR quantitative pour la détection/quantification de *Vibrio* pathogènes et de flores histaminogènes issus de produits de la pêche.**

<b>Matrices</b>	<b>Gènes ciblés</b>	<b>Genres ou espèces</b>	<b>Références</b>
Fruits de mer	<i>ctxA, toxR</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	Koskela <i>et al.</i> 2009
Huîtres	<i>trh, tdh</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Nordstrom <i>et al.</i> 2007
Crevettes	<i>trh, tdh</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Robert-Pillot <i>et al.</i> 2010
Fruits de mer	<i>vvhA</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	Cañigral <i>et al.</i> 2010
Crevettes et huîtres	<i>gyrB</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Zhou <i>et al.</i> 2007
Poissons divers	<i>hdc</i>	Flore histaminogène	K. Bjornsdottir-Butler <i>et al.</i> 2011
Thonnidés	<i>hdc</i>	Flore histaminogène	Kristin Bjornsdottir-Butler <i>et al.</i> 2011
Poissons divers	<i>hdc</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Bjornsdottir-Butler <i>et al.</i> 2013

*reus*, *E. coli* ainsi que des sporulés (Postollec *et al.* 2011).

Le Tableau IV-V recense des méthodes de qPCR ciblant les flores présentant spécifiquement un risque de sécurité sanitaire des aliments pour différents produits de la pêche, *i.e* les *Vibrio* produisant des toxines et les flores histaminogènes à l'origine de la synthèse de quantités importantes d'histamine. Concernant les *Vibrio*, les cibles sont une nouvelle fois majoritairement les gènes codant pour les marqueurs de virulence, *tdh*, *trh* ou *vvhA* par exemple, à l'origine de l'expression de toxines par ces espèces bactériennes. Dans le cas de la flore histaminogène, c'est le gène de l'enzyme à l'origine de la décarboxylation de l'histidine, *hdc*, qui a été préférentiellement ciblé par les diverses applications.

En outre, deux applications citées dans le Tableau IV-V font état d'une technique de MPN PCR (Robert-Pillot *et al.* 2010; K. Bjornsdottir-Butler *et al.* 2011) ou PCR en nombre le plus probable. Il s'agit d'une méthode de quantification issue des techniques microbiologiques et basée sur une approche probabiliste. En tenant compte du nombre de résultats positifs sur plusieurs répétitions de différents niveaux de dilution d'un échantillon, il devient possible en consultant des tables de définir la quantité de microorganismes présents dans l'échantillon initial. Ces méthodes permettent de s'affranchir de problèmes d'inhibition liés à la matrice et il devient même envisageable d'utiliser des techniques comme la PCR digitale (Shen *et al.* 2010; Morisset *et al.* 2013) afin d'automatiser, démultiplier et réduire les temps et les coûts d'analyse.

### **3. Quantification de flores non-pathogènes dans les aliments**

Si la recherche de pathogènes au sein de matrices alimentaires compose la majorité des activités dans le domaine de la recherche de microorganismes dans les aliments, des techniques moléculaires ont également été développées pour la recherche d'organismes non-pathogènes (Postollec *et al.* 2011; Martínez *et al.* 2011). Ce développement méthodologique voit son nombre d'applications augmenter ces dernières années, en effet les organismes non-pathogènes sont au centre d'enjeux économiques, pour les industriels de l'agro-alimentaire, puisqu'ils agissent sur les propriétés organoleptiques du produit (Martínez *et al.* 2011). La détection rapide de la survenue d'un problème, *i.e* développement d'un ou plusieurs microorganisme(s) délétère(s), est un enjeu crucial dans le but de maîtriser au plus vite les impacts négatifs sur la production. La qPCR devient donc dans cette approche un outil d'aide à la décision en plus d'un simple outil de contrôle.

Les matrices étudiées par ce type d'approche sont en grande majorité celles issues de l'industrie laitière et de ses dérivés et de l'industrie des boissons fermentées. Néanmoins, quelques applications existent pour l'étude de chairs animales comme la viande ou le poisson (Martínez *et al.* 2011). Les applications sont diverses avec la quantification des flores probiotiques, de fermentation, d'altération ou reflétant l'état général d'hygiène du produit. La technique de qPCR a permis d'apporter une amélioration, en comparaison avec l'approche microbiologique, de la sensibilité de détection dans la quantification de flores probiotiques ou

Tableau IV-VI : Exemples d'application, non-exhaustives, de méthodes de PCR quantitative pour l'évaluation de flores spécifiques d'altération de diverses matrices alimentaires

Matrices	Gènes ciblés	Espèces ciblées	Références
Vin	<i>rad4 / dps</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> & <i>Pediococcus damnosus</i>	Delaherche <i>et al.</i> 2004
Bière	ARNr 16S	<i>Obesumbacterium proteus</i>	Koivula <i>et al.</i> 2006
Lait	<i>fla</i>	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	López-Enríquez <i>et al.</i> 2007
Fromage	<i>pheS</i>	<i>Enterococcus gilvus</i>	Zago <i>et al.</i> 2009
Viande	ARNr 16S	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Pennacchia <i>et al.</i> 2009

de flores à l'origine de la maturation de fromages (Monnet *et al.* 2006; Masco *et al.* 2007; Le Dréan *et al.* 2010). Dans le domaine des fermentations, les flores microbiennes, notamment les flores lactiques, jouent un rôle dans la formation des arômes désirables ou au contraire désagréables, via des réactions d'estérification, de décarboxylation, etc. Plusieurs méthodes ont pu être décrites avec par exemple une technique ciblant le gène *horA* porté par des flores lactiques à l'origine d'arômes désagréables de la bière (Haakensen *et al.* 2007). Dans le cadre de la fabrication de fromage, une étude a permis de cibler spécifiquement une sous-espèce de *Lactococcus lactis* sensible à la nisine difficilement quantifiable sur boîte de Petri en présence d'autres sous-espèces (Grattepanche *et al.* 2005). La qualité et le niveau d'hygiène globale d'un aliment sont généralement évalués en microbiologie par dénombrement de la flore totale, Lee & Levin (2007) ont développé une méthode de qPCR ciblant spécifiquement les cellules viables à l'aide de bromure d'éthidium monoazide (EMA). La méthode amplifie l'ARNr 16S et permet de quantifier la flore totale viable dans des filets de poisson.

Dans le cas particulier des flores non-pathogènes, il ressort généralement que la nécessité d'obtenir des limites de détection basse est moins critique que pour les applications de qPCR sur des flores pathogènes. En effet, les flores non-pathogènes impactent les propriétés organoleptiques des produits pour des charges bactériennes élevées généralement supérieures à  $10^5$  UFC/g (Gram & Huss 1996; Monnet *et al.* 2006).

Pour toutes ces applications, il convient tout de même de cibler des gènes présentant une copie unique au sein du génome de l'organisme cible, la quantification de gène multicopie, comme celui codant l'ARNr 16S, conduit inévitablement à une quantification erronée de la population visée (Postollec *et al.* 2011). Second point particulier, lorsque l'action de la flore recherchée conduit à l'expression d'un caractère particulier, influençant les qualités organoleptiques ou conduisant à l'altération de l'aliment, il convient de cibler si possible le gène fonctionnel à l'origine de la manifestation du caractère (Martínez *et al.* 2011).

Plusieurs applications de qPCR ont été développées pour la détection de flores spécifiques d'altérations à partir de diverses matrices parmi lesquelles sont retrouvés le vin, la bière, le lait, le fromage ou encore la viande (Tableau IV-VI). De façon plus spécifique, des méthodes de qPCR ont été développées pour l'analyse de matrice de poissons.

Chronologiquement une des premières applications de biologie moléculaire sur du poisson s'est intéressée au gène *torA* porté par la flore spécifique d'altération des poissons marins, notamment parmi les *Shewanella* (Dos Santos 1999; Giordano *et al.* 2001). Comme vu précédemment, Lee & Levin (2007) ont développé une approche de qPCR permettant de déterminer la flore totale viable au sein du poisson. Comme le notent les auteurs, cette méthode permettrait d'établir des ratios entre les flores d'altération et la flore totale du poisson, et offrirait donc de meilleurs éclairages sur l'historique de conservation du poisson. Néanmoins, l'utilisation d'un gène multicopies, celui de l'ARNr 16S, rend cette méthode de quantification sujette à caution. En 2008, une méthode de quantification de *Pseudomonas* sp. dans



différents poisson marins a été développée en ciblant le gène *carA* impliqué dans la voie de synthèse des pyrimidines et des purines (Reynisson *et al.* 2008). Cette méthode a révélée une bonne spécificité et une excellente corrélation avec les méthodes de dénombrement sur boîte de Petri ( $r = 0.89$ ) avec une différence moyenne de dénombrement de 0,04 log UFC/g. Cette méthode est intéressante car elle cible un genre bactérien impliqué dans l'altération de nombreuses matrices alimentaires conservées à basse température (Martínez *et al.* 2011), cependant le gène ciblé n'est pas directement impliqué dans le processus d'altération des bactéries. De plus, cette méthode semble difficilement applicable dans le cas de certains produits et de certaines méthodes de conservation pour lesquelles les flores spécifiques d'altération appartiennent aux genres *Shewanella* ou *Photobacterium*.

En dernier lieu, une étude menée au laboratoire (Duflos, Theraulaz, *et al.* 2010) a montré que les amorces dégénérées issues des travaux de Dos Santos (1999) permettaient de suivre l'altération de filets de merlan et de plie.

Un dernier chapitre de cette étude bibliographie sera consacré à l'outil informatique et son apport dans le traitement et de l'analyse des données. Il se focalisera particulièrement sur la contribution de cet outil au traitement objectif, sécurisé et rapide de données de plus en plus conséquentes au fur et à mesure des découvertes scientifiques et des avancées technologiques. La description des outils s'attachera à mettre particulièrement en évidence les spécificités de fonctionnement des outils de façon à les utiliser à bon escient.

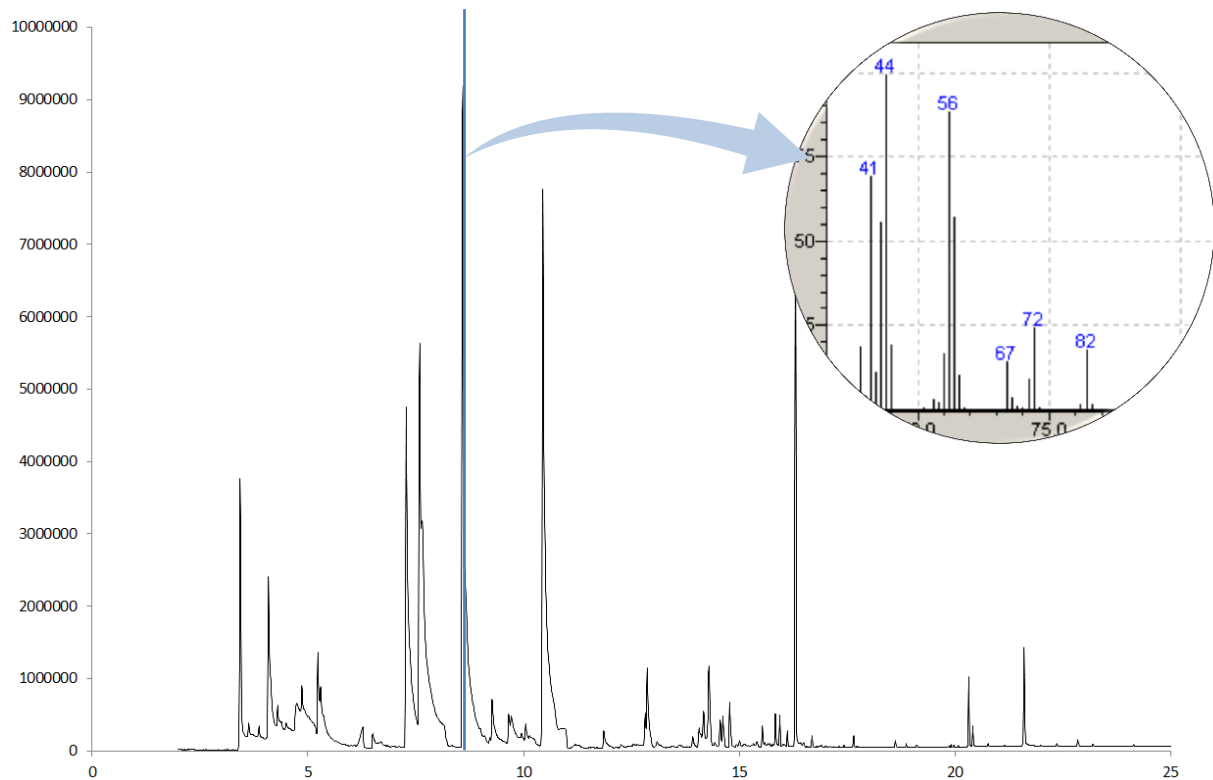


Figure 5-1 : Illustration des différents niveaux de données obtenus lors du tracé d'un chromatogramme par une GC/MS.

$$r_{xy} = \frac{s_{xy}}{s_x \cdot s_y} = \frac{\frac{1}{n} \sum_1^n (x_i - \bar{x}_n) (y_i - \bar{y}_n)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) \sum_1^n (x_i - \bar{x}_n)^2} \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) \sum_1^n (y_i - \bar{y}_n)^2}}$$

Figure 5-2 : Expression mathématique de la corrélation linéaire entre deux variables x et y mesurées pour n individus.

$$d^2(e_i, e_j) = (x_{i1} - x_{j1})^2 + \dots + (x_{ip} - x_{jp})^2$$

Figure 5-3 : Expression mathématique de calcul d'une distance euclidienne classique entre deux individus i et j définis par p variables.

---

## Chapitre 5. Différents outils au service de l'analyse de données

Face à l'ensemble de données générées par les différents travaux scientifiques conduits au cours de cette thèse, il a fallu utiliser des outils informatiques et statistiques qui seront présentés dans ce chapitre.

### I. Apport des statistiques descriptives et inférentielles dans le cadre de l'analyse de données

#### 1. Une quantité importante de données à traiter

L'utilisation d'appareils de mesure de plus en plus performants et automatisés permet la genèse d'une quantité importante de données. Pour exemple, en utilisant les paramètres définis par (Duflos, Leduc, *et al.* 2010), un chromatogramme classique (figure 5-1) génère 473760 valeurs. Cette quantité d'informations est généralement simplifiée par les logiciels d'acquisition en les transformant en pics, d'aires définies.

A un second niveau, la réalisation d'un suivi d'altération va conduire à répéter des analyses : plusieurs poissons, plusieurs répétitions d'analyses, plusieurs jours d'études. Ceci conduit donc également à la production de nombreuses données qui devront être traitées a posteriori ; leur structuration devient donc primordiale. La compréhension du processus d'analyse découle directement de la structure des données : d'un côté des individus statistiques, de l'autre des variables explicatives qualitatives ou quantitatives. Connaissant cette nécessité de structuration des données il devient possible de développer des algorithmes de recherche et consignations de données (Annexe 1).

Face au nombre important de données à analyser, il convient d'utiliser des outils pertinents afin d'extraire les informations pertinentes des jeux de données.

#### 2. L'ACP : Réduire la quantité de données, en conservant l'information

##### a. Principe et signification mathématique de l'ACP

L'analyse en composantes principales est un outil qui permet la réalisation de trois actions distinctes. Premièrement, l'ACP permet la description des variables via leurs rapports de corrélations et d'anti-corrélations. Ensuite, elle décrit mes individus et établit l'existence ou l'absence de ressemblances entre individus. Enfin, l'ACP illustre le plus fidèlement possible, sur les deux ou trois dimensions d'un graphique, la variabilité des données d'un tableau.

L'ACP se construit autour des notions de variance/covariance et de corrélation des variables, qui sont liées par le calcul (figure 5-2). L'ACP décrit la structure du nuage d'individus statistiques établis dans un espace vectoriel à  $p$  dimensions correspondant aux variables quantitatives. Pour ce faire, il convient de mesurer les distances entre deux individus en définissant une métrique, classiquement c'est la distance euclidienne (figure 5-3) qui est utilisée.

L'ACP va ensuite définir des axes, informatifs, concentrant un maximum de variabilité

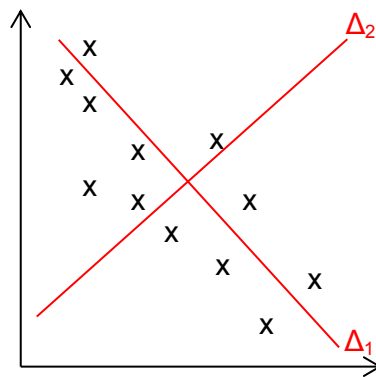


Figure 5-4 : Représentation schématique de l'établissement des axes  $\Delta_1$  et  $\Delta_2$  représentatifs de la variabilité d'un nuage de points représenté sur un plan bidimensionnel.

Tableau V-I : Tableau de résultats concernant les valeurs propres obtenues lors de la réalisation d'une ACP à l'aide du logiciel Tanagra (Rakotomalala 2005).

Axis	Eigen value	Difference	Proportion (%)	Histogram	Cumulative (%)
1	2,944898	1,622223	58,90%		58,90%
2	1,322675	0,805531	26,45%		85,35%
3	0,517144	0,349079	10,34%		95,69%
4	0,168064	0,120846	3,36%		99,06%
5	0,047219	-	0,94%		100,00%

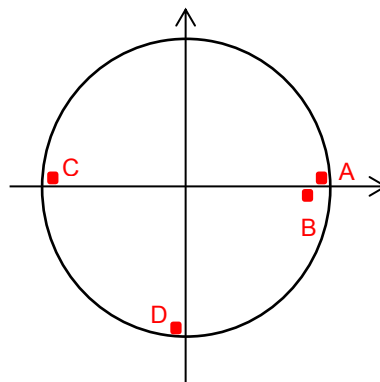


Figure 5-5 : Représentation schématique d'un cercle de corrélation de quatre variables obtenues par une ACP.

du nuage de points (figure 5-4). L'axe le plus informatif  $\Delta_1$  porte la variabilité la plus importante et le second  $\Delta_2$ , orthogonal au premier, porte le maximum de variabilité résiduelle. Le phénomène est itératif jusqu'au  $p^{\text{ième}}$  axe portant une variabilité quasi-nulle. D'un point de vue mathématique, l'ACP va permettre de décomposer un espace vectoriel en  $p$  vecteurs propres. Les composantes principales sont alors les coordonnées des projections des individus sur les axes principaux.

L'ACP permet de réduire de façon drastique le nombre de variables explicatives et corrélées, en un nombre limité de composantes principales illustrant un maximum de variabilité du jeu de données.

#### **b. Les principaux résultats de l'ACP**

Différents résultats obtenus lors de la réalisation d'une ACP. La lecture du tableau des valeurs propres (Tableau V-I) permet de déterminer le nombre d'axes pertinents pour la représentation de l'ACP, *i.e* ceux portant le maximum de la variabilité des données. Le cercle des corrélations (figure 5-5) permet de visualiser les corrélations des variables aux composantes principales. Il permet également de voir les relations de corrélation (A et B), anticorrélation (A et C) et décorrélations (A et D) qui lient les variables. Enfin l'ACP permet la représentation des individus dans un plan formé des premières composantes principales, généralement les trois premières, soit au maximum deux plans factoriels distincts. Cette représentation des individus permet des comparaisons de la structure des groupes avec des observations intragroupes (homogénéité des groupes) et intergroupes (groupes semblables ou dissemblables). En outre, en couplant ces informations à celles du cercle des corrélations, une caractérisation des individus/groupes est rendue possible par les différentes variables.

L'ACP est un bon outil de comparaison et de caractérisation de populations décrites par un nombre important de variables. Lorsque le nombre de variables diminue et que seule la comparaison des populations est recherchée, d'autres outils comme l'ANOVA, deviennent plus intéressants.

### **3. Apports des statistiques inférentielles et de l'ANOVA pour la comparaison de données.**

L'ANOVA est l'acronyme anglais signifiant analyse de variance. Cette analyse fait partie des statistiques dites inférentielles basées sur les théories probabilistes.

#### **a. Prérequis pour la réalisation d'analyses de variance**

Les statistiques inférentielles permettent d'estimer les paramètres caractérisant une population en étudiant un échantillon de celle-ci. Ce type de statistiques permet la comparaison de populations via la formulation d'hypothèses, la réalisation de tests statistiques et l'énonciation de conclusions. Ces dernières sont formulées avec un risque d'erreur connu fruit de lois de probabilités.

Ce type de statistiques nécessite au préalable la vérification de la structuration des données. Ainsi leurs distributions doivent suivre une loi normale, ce paramètre peut être vérifié

$$X \rightarrow \ln(X + 1) \text{ (A)}$$

$$X \rightarrow A \sin(\sqrt{X}) \text{ (B)}$$

Figure 5-6 : Transformations mathématiques permettant de normaliser des données. L'expression (A) peut être utilisée dans le cas de populations agrégatives et l'expression (B) dans le cas de données homogènes à des pourcentages.

$$\begin{array}{r}
 \begin{array}{ccc}
 1 & i & p \\
 y_{11} & y_{i1} & y_{p1} \\
 X = y_{1j} & y_{ij} & y_{pj} \\
 y_{1n} & y_{in} & y_{pn} \\
 \bar{y}_1 & \bar{y}_i & \bar{y}_p
 \end{array} \\
 \bar{y} = \frac{1}{p} \sum_1^p \bar{y}_p
 \end{array}$$

Figure 5-7 : Structuration d'un jeu de données X composé de p traitements (ligne verte) pour lesquels n mesures (lignes noires) ont été réalisées. La ligne rouge figure les moyennes par modalités. La valeur y barre correspond à la moyenne générale : la moyenne des moyennes obtenues par modalités.

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Figure 5-8 : Composition de la variable à expliquer en fonction du modèle théorique. Avec  $\mu$  la moyenne de la population,  $\alpha_i$  l'estimateur de l'effet et  $\epsilon_{ij}$  l'erreur résiduelle.

$$\sum_{ij} (y_{ij} - \bar{y})^2 = \sum_{ij} (\bar{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{ij} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

Variance totale
Variance du modèle
Variance résiduelle

Figure 5-9 : Décomposition de la variance totale du jeu de données X

par différents tests dont celui de Shapiro-Wilks (Shapiro & Wilk 1965) ou celui de Kolmogorov-Smirnov (Kolmogorov 1933). Un second prérequis à la réalisation d'une ANOVA est la nécessité d'homoscédasticité des variances correspondant à la mesure de l'homogénéité des variances. Ce paramètre peut être contrôlé par le test de Bartlett qui s'appuie sur une statistique du  $\chi^2$ . Pour terminer, le dernier prérequis est l'indépendance des observations réalisées.

En cas de non vérification des hypothèses, des transformations de variables appelées normalisations, peuvent être réalisées (figure 5-6).

### b. Comparaison de populations par l'analyse de variance

Afin de décrire l'ANOVA à un facteur et son mode de fonctionnement, un jeu de données  $X$  sera utilisé à  $p$  modalités et  $n$  traitements (figure 5-7). Pour chacune des variables  $y_{ij}$ , leurs valeurs peuvent être décomposées en trois parties, une constante, une part variable résultant d'un modèle théorique et une erreur résiduelle (figure 5-8). De plus la variance totale de  $X$  (figure 5-9) se décompose en une variance issue du modèle illustrant la variabilité inter-groupe, une variance résiduelle représentant la variabilité intra-groupe.

L'analyse de variance nécessite la formulation de deux hypothèses. L'hypothèse nulle,  $H_0$ , correspond à une égalité des moyennes : les distributions des modalités suivent les mêmes lois normales. L'hypothèse  $H_1$  constitue l'alternative à  $H_0$ . Afin de vérifier ces hypothèses, l'ANOVA va utiliser des estimateurs non-biaisés des variances. Il s'agit du carré moyen du modèle ( $CM_M$ ) et du carré moyen résiduel ( $CM_R$ ) correspondant à la SCE rapportée au nombre de degrés de liberté (ddl).

L'ANOVA consiste à évaluer la part relative de la variance du modèle par rapport celle de la partie résiduelle. Le rapport  $CM_M$  sur  $CM_R$  suit donc une statistique de Fisher à  $p-1$  et  $n-p$  degrés de liberté, lorsque la probabilité est inférieure à 0,05, il est conclu que l'effet étudié a un impact significatif sur la variabilité observée au sein du jeu de données.

L'ANOVA est une méthode extrêmement utilisée en biologie, mais elle nécessite des tests *post hoc* afin de pouvoir classer les modalités de façon à illustrer celles offrant les meilleurs résultats. Le plus connu de ces tests est le test LSD de Fisher.

### c. Le test LSD de Fisher, approche complémentaire de l'ANOVA

Le test LSD de Fisher, est un test *post hoc* permettant de calculer la plus petite valeur d'écart permettant de conclure à une différence significative entre deux modalités.

D'un point de vue statistique le test LSD se rapproche d'un test de comparaison de moyenne comme le test de Student (Student 1908). Cependant, cette méthode va remplacer la variance du test de comparaison de moyenne par son estimateur commun aux différentes modalités : le  $CM_R$ .

Un point important est à noter lors de l'utilisation du test LSD, en effet, lors de la répétition de tests le risque global d'erreur s'accroît. Il a été prouvé mathématiquement que le risque d'erreur tend vers une valeur de  $1 - (1 - \alpha)^n$  avec  $n$  le nombre de test. Une façon de

juguler cette inflation du risque peut être jugulée en utilisant une méthode, la correction de Bonferroni, qui pénalise le risque en fonction du nombre de tests.

Pour conclure cette partie, il faut rappeler que l'ensemble des tests peut être réalisé aisément par une suite de fonction, avec le logiciel R, retranscrite en [Annexe 2](#).

#### **d. Les tests non-paramétriques, alternative à l'ANOVA**

Si l'ANOVA n'est applicable que lorsque certaines hypothèses sont respectées : normalité de la distribution et homoscedasticité des variances, il est tout de même possible de réaliser des analyses de variances sur des données ne vérifiant pas ces hypothèses, en utilisant des tests non-paramétriques. Celui correspondant à l'ANOVA est le test de Kruskal-Wallis ([Kruskal & Wallis 1952](#)). Néanmoins il faut noter que de tels tests sont moins puissants que les tests paramétriques.

Le test de Kruskal-Wallis va consister à réaliser une comparaison de médiane. Dans un premier temps, le jeu de données est subdivisé en  $k$  sous-groupes auxquels un rang  $r_k$  est assigné sans a priori. Le rang moyen,  $\bar{R}_i$ , de chaque sous-groupe est ensuite calculé ainsi que le rang moyen de la totalité des données,  $\bar{R}$ , dont la valeur est fixe. Deux cas de figures existent concernant la règle de décision de validation ou rejet de l'hypothèse  $H_0$ , ils utilisent tous les deux la statistique  $K$ . Pour un nombre faible d'effectifs par sous-groupe une table de la loi de Kruskal-Wallis donne la valeur critique associée pour un risque d'erreur donné. Pour les effectifs plus importants, la statistique  $K$  suit une loi du  $\chi^2$  à  $k-1$  ddl. L'hypothèse  $H_1$  est rejetée si  $K$  est strictement inférieur à la valeur critique obtenue dans les tables. En outre, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis peut également être suivi de tests *post-hoc* comme les tests de Wilcoxon (rank-sum) et de Tukey.

## **II. De l'outil bio-informatique à la biologie moléculaire**

Au-delà des statistiques, l'informatique a également permis des applications en bio-informatique pour le traitement de séquences génétiques. L'avènement de l'informatique et des nouvelles techniques de séquençage a conduit à la genèse d'une quantité importante de données, principalement pour les séquences nucléiques et protéiques. Les paragraphes suivants vont s'attacher à décrire l'omniprésence de l'outil informatique dans le processus de recherche de séquences ADN et de leurs traitements pour l'élaboration de sondes ADN.

### **1. Consultation des banques de données en ligne**

#### **a. Stockage et organisation des données du séquençage**

Plusieurs organismes ont été créés afin de pouvoir centraliser les informations issues du séquençage et les consigner dans des banques. Les plus importantes sont EMBL (Europe et Australie), Genbank (Etats-Unis) et DDBJ (Japon). L'ensemble de ces organismes collabore au sein de l'International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) ([Cochrane et al. 2011](#)) permettant la mise à disposition d'une information libre et non-restreinte ([Brunak et al. 2002](#)). La conséquence de cette base de données, ouverte, est la présence



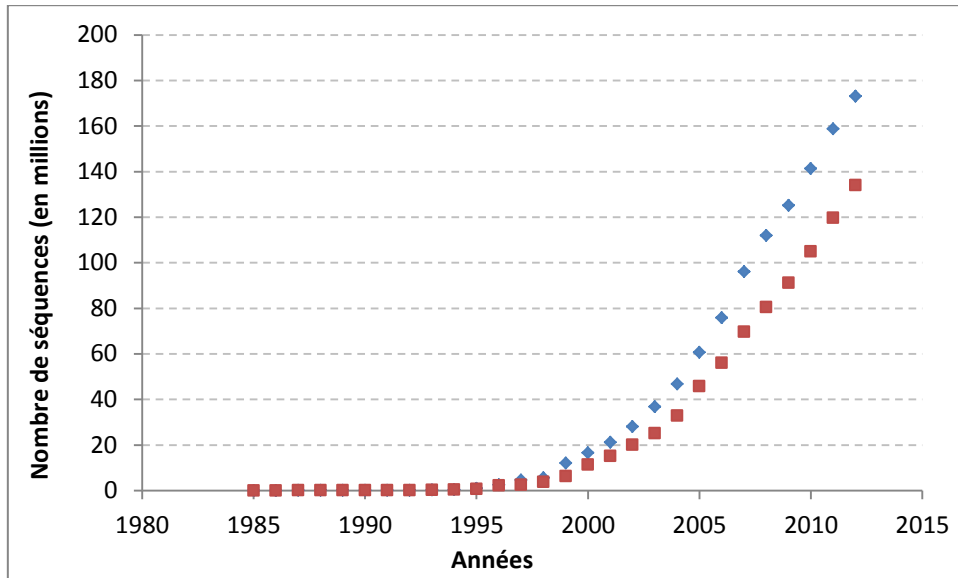


Figure 5-10 : Evolution du nombre de séquences présentes dans les banques ADN Genbank(◆) et EMBL(■) en fonction du temps. Les données ont été obtenues en utilisant les fonctions choosebank() et query() du package {seqinr} du logiciel R.

Tableau V-II : Nombre d'items retrouvés en fonction de quatre requêtes formulées dans Genbank. Les valeurs de champs entrées par l'opérateur sont affichées en bleu et les champs consultés en rouge.

	Requêtes	Items trouvés	Pourcentage (base item #1)
# 1	Search <b>torA</b>	2881	100,0 %
# 2	Search <b>torA</b> [Gene Name]	1883	65,4 %
# 3	Search ( <b>torA</b> [Gene Name]) AND <b>Vibrio</b> [Organism]	341	11,8 %
# 4	Search (( <b>torA</b> [Gene Name]) AND <b>Vibrio</b> [Organism]) AND <b>1.6.6.9</b> [EC/RN Number]	24	0,8 %

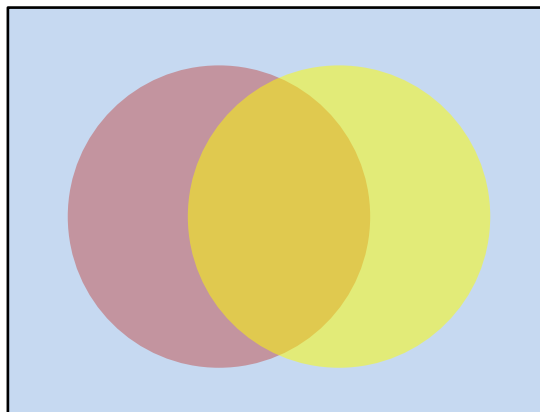


Figure 5-11 : Illustration permettant la visualisation des trois opérateurs logiques majeurs. « AND », la partie orangée, « OR », la somme des cercles rouge et jaune et « NOT » la partie bleue.

d'un nombre de séquences important, de l'ordre de la centaine de millions (figure 5-10). Il convient donc d'avoir des outils et une méthodologie de gestion adaptés.

La collaboration entre les grandes banques internationales a conduit à une normalisation de la présentation des séquences et de leurs métadonnées sous forme d'un tableau (Annexe 3). Cette standardisation permet notamment l'utilisation d'un vocabulaire commun pour désigner chaque champ et ordonner les informations pertinentes. En outre, ces métadonnées constituent un atout pour le traitement de l'information, puisqu'elle autorise une consultation par requêtes.

Il convient de noter qu'au regard du nombre quotidien de séquences soumises, la qualité des séquences déposées peut être affectée : erreurs de saisies, redondances, etc. Ces inconvénients peuvent être maîtrisés par un travail de contrôle des données, en amont en utilisant des banques spécialisées au contenu épuré (Wahl *et al.* 1994) et en aval, en contrôlant les redondances à l'aide d'algorithmes tels que NRDB (Gisch 1991).

### **b. Consultation des bases de données et requêtes**

La consultation de bases de données nécessite une requête, message contenant une question formalisée avec les valeurs des champs désirés. En outre, l'écriture de cette requête varie en fonction des médias utilisés.

Le langage de toute requête intègre trois opérateurs essentiels : « AND », « OR » et « NOT » (figure 5-11). L'ensemble de ces opérateurs permet alors de lier ou rejeter des paramètres de la requête. La bonne formulation de la requête est importante pour la qualité du travail en aval des recherches, en effet, plus la requête est précise, plus les séquences obtenues sont pertinentes (Tableau V-II).

Face à la multiplication des banques de données et des médias de consultation, il peut devenir fastidieux de rechercher de l'information. Des universitaires lyonnais ont mis en place une plateforme de centralisation de données, l'ACNUC (Gouy & Delmotte 2008), permettant un accès rapide aux informations provenant de nombreuses banques de données. L'intérêt de cette plateforme est son dialogue possible avec le logiciel R via le paquet logiciel seqinR (Charif & Lobry 2007). L'utilisation du logiciel R rend possible le traitement des requêtes par des stratégies de lots (Annexe 4). L'uniformisation de la requête, en d'autres termes un langage unique d'interrogation, permet de consulter des banques différentes par une requête unique.

La recherche de séquences ADN se termine nécessairement par une structuration des résultats pour la reconnaissance des informations par les logiciels de post-traitement. Le format FASTA (Lipman & Pearson 1985) est désormais un des standards mondiaux.

## **2. Alignement des séquences d'intérêt**

La détection de gène(s) présent(s) chez plusieurs genres ou espèces nécessite d'identifier des zones d'ADN conservées : les séquences consensus. Ces séquences permettent de dessiner les amorces utilisées *a posteriori* pour la réalisation de réaction PCR. Cet aligne-

```

B_sub_SMY GTCCCATATGTGTTTGGCGGAAGCACGCCGTCAGAG-GGCTTTGATTGCTCGGGGCTTGT 593
B_sub_NCI GTCCCATATGTGTTTGGCGGAAGCACGCCGTCAGAG-GGCTTTGATTGCTCGGGGCTTGT 593
B_sub_168 GTCCCATATGTGTTTGGCGGAAGCACGCCGTCAGAG-GGCTTTGATTGCTCGGGGCTTGT 593
B_sub_nat GTCCCATATGTGTTTGGCGGAAGCACGCCGTCAGAG-GGCTTTGATTGCTCGGGGCTTGT 713
B_sub_JH6 GTCCCATATGTGTTTGGCGGAAGCACGCCGTCAGAG-GGCTTTGATTGCTCGGGGCTTGT 533
B_amy_FZB ATTCCGTATGTATTCGGCGGAAGCACGCCTGAGGAG-GGATTCGACTGTTTCAGGGCTGGT 590
B_pum_ATC ATTCCCTTATGTATTTGGTGCA-GCAGACCCTAAGATTGGCTTTGATTGTTTCAGGCTTTTT 572
B_lic_ATC GTTCCTTATGTATTTGGAGGCAACTCTCCGATCTC-GGATTTGACTGTTTCGGGGTTGAC 596
      * ** ***** ** ** * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

```

**Figure 5-12 : Alignement de séquences du gène *pgsS* de différentes souches du genre *Bacillus*. L'alignement a été réalisé à l'aide de l'algorithme CULSTALW. Les nucléotides marqués d'un signe \* sont identiques pour toutes les séquences.**

ment va permettre de proposer le meilleur agencement des séquences obtenues les unes par rapport aux autres, de façon à ce que les motifs semblables soient en regard les uns des autres pour les différentes séquences (figure 5-12).

Un système de quantification objective des similarités de l'alignement via la construction d'une matrice des scores a rapidement été privilégié. Cette méthode, inclue la notion d'évolution, de fait lors de l'alignement, le principe de parcimonie est appliqué. Pour respecter ce principe, un système de pénalisations notamment pour les mésappariements ou les insertions/délétions a été développé. L'alignement le plus probable des deux séquences est donc celui qui conduit au score le plus important. Plusieurs algorithmes permettent de réaliser les alignements avec des stratégies différentes : globaux ou locaux, simples ou multiples.

Les alignements globaux ont été théorisés par [Needleman & Wunsch \(1970\)](#). Ils proposent une comparaison de deux séquences sur toute leur totalité. Cette stratégie fonctionne surtout pour des séquences similaires, *i.e* de même longueur et de séquences proches. Les alignements locaux s'attachent quant à eux à trouver des motifs similaires au sein de deux séquences ([Smith & Waterman 1981](#)). Les auteurs précisent que la pertinence de l'alignement doit être évaluée par le biologiste. Aussi, cette approche est utilisée pour identifier des motifs identiques au sein de séquences dissemblables comme des domaines homologues de sous-familles protéiques.

L'alignement simple, autrement appelé alignement par paire permet la comparaison de séquences deux à deux. Le type d'algorithme le plus connu est le Basic Local Alignment Search Tool ou BLAST ([Altschul \*et al.\* 1990](#)). Il s'agit d'une méthode de recherche heuristique, *i.e* le résultat obtenu n'est pas optimal mais propose une approximation acceptable ([Meyer & Stockmeyer 1972](#)). En outre, ce type d'outil est surtout utilisé pour les recherches dans une banque de données. L'alignement multiple permet lui la recherche de similarités entre plusieurs séquences, c'est un outil essentiel tant le nombre de séquences nucléiques disponibles est conséquent. Il s'applique à des thématiques différentes : caractérisation de familles protéiques, prédiction de séquences protéiques et suggestion d'oligonucléotides pour la réalisation de PCR ([Thompson \*et al.\* 1994](#)). Les alignements multiples peuvent être globaux ou locaux, seuls les premiers seront développés ci-après en se basant sur la comparaison de deux algorithmes CLUSTAL et MUSCLE.

CLUSTAL est un algorithme établi en 1988 qui a connu deux évolutions majeures CLUSTAL W ([Thompson \*et al.\* 1994](#)) et CLUSTAL  $\Omega$  qui a permis de diminuer le temps de traitement ([Sievers \*et al.\* 2011](#)). L'algorithme CLUSTAL W se décompose en quatre étapes : construction d'une matrice des distance ([Needleman & Wunsch 1970](#)), établissement d'un arbre par la méthode du neighbor-joining ([Saitou & Nei 1987](#)), pondération des séquences en fonction de leur éloignement et enfin réaligement progressif des séquences.

MUSCLE est un algorithme d'alignement de séquences itératif ([Edgar 2004a, 2004b](#)) divisé en trois étapes majeures. La première vise à construire un alignement multiple privilé-



giant la vitesse sur la précision en utilisant des sous-séquences contigües pour former un arbre. La seconde étape vise à corriger, par itérations, l'approximation induite par l'utilisation des sous-séquences. La dernière étape, itérative également, consiste à réaliser un affinage des alignements.

Les algorithmes MUSCLE et Clustal W conduisent à des alignements sensiblement identiques, ils sont généralement substituables.

### **3. Recherche de zone consensus et dessin d'amorces : cas particulier des amorces dégénérées**

L'ultime étape de travail *in silico* s'attache à dessiner les oligonucléotides. Plusieurs logiciels permettent de suggérer des amorces, mais l'approche est plus complexe lorsque les oligonucléotides souhaités sont dégénérés.

#### **a. Les bases dégénérées : plus permissives pour l'appariement**

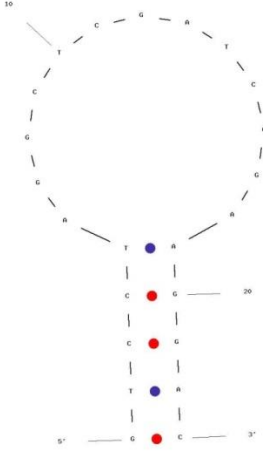
Les zones de fort consensus entre séquences sont des régions idéales pour chercher des oligonucléotides pouvant servir d'amorces, puisqu'il s'agit de zones peu variables. Au sein de ces régions, il peut y avoir des mésappariements pour une ou deux séquences (figure 5-13). Dans ce genre de cas, il est possible d'utiliser des bases dites dégénérées dont l'utilisation est décrite dès la seconde moitié des années 1980 (Gronostajski 1986). Cette méthode repose sur l'utilisation du code de l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Tableau V-III). Dans le cas où plusieurs nucléotides sont présents à une même position, il permet d'utiliser un code unique correspondant à une combinaison de nucléotides. Une autre technique consiste à utiliser des nucléotides universels comme l'inosine capable de s'apparier à l'ensemble des nucléotides (Zheng *et al.* 2008). Le logiciel NRPS primer développé au laboratoire ProBioGEM permet de suggérer des oligonucléotides en incluant des bases dégénérées et utilise la notion de coefficient d'hybridation (HyC) (Tapi *et al.* 2010). Pour chaque nucléotide dégénéré un facteur est attribué. Ce dernier vaut 3 pour les bases B, D, H, V ; 2 pour les bases R, Y, K, W, M, S et 1 pour les bases non dégénérées. L'HyC correspond au produit de l'ensemble des facteurs attribués à chaque nucléotide de l'oligonucléotide.

#### **b. La sélection d'amorces : un cahier des charges précis**

A partir des amorces sélectionnées, il convient d'opérer un tri pour ne retenir que les plus prometteuses, pour ce faire un « cahier des charges » précis existe. Ce dernier a servi de base à l'écriture d'un algorithme présenté en Annexe 5 qui permet le screening haut débit des listes d'oligonucléotides suggérés par le logiciel NRPS Primer.

Le premier paramètre important dans le dessin d'amorces est de définir la taille de l'oligonucléotide, il est admis que celle-ci doit être comprise entre 18 et 30 nucléotides. En deçà de cette limite, le risque d'hybridation à des séquences non-cibles étant trop important et au-delà les températures d'hybridation sont trop importantes (Singh & Kumar 2001). Les extrémités des oligonucléotides notamment les régions en 5'- et 3'- jouent également un rôle

Tableau V-IV : Exemples de structures secondaires formées par un ou deux oligonucléotides

Structures	Noms français et anglo-saxons	Valeurs de $\Delta G$ tolérées
	Epingle à cheveux (Hairpin)	$\Delta G$ jusqu'à -3 kcal/mol
<pre> 5'  GTCCTAGGCTCGATCGGAAGGAC       :           : 3'  CAGGAAGGCTAGCTCGGATCCTG                     </pre>	Homodimère (Self-dimer)	En région 3' : $\Delta G$ jusqu'à -5 kcal/mol  Pour les régions internes : $\Delta G$ jusqu'à -6 kcal/mol
<pre> 5'  TGAGCATCGTATGCCGTCAGCA       :           : 3'  ATGTAAGCATACGGCAGTGCAG                     </pre>	Hétérodimère (Cross-dimer)	En région 3' : $\Delta G$ jusqu'à -5 kcal/mol  Pour les régions internes : $\Delta G$ jusqu'à -6 kcal/mol

important dans le dessin des amorces. La présence de G ou de C en 3' permet une liaison spécifique de l'oligonucléotide à la séquence cible grâce à une liaison plus stable entre les G et les C, suite à la présence d'une liaison faible supplémentaire par rapport à la liaison entre A et T. Cependant le nombre de nucléotides G ou C ne doit pas être supérieur à trois parmi les cinq dernières bases en région 3' et ce afin d'éviter des mésappariements et la formation de structures secondaires de type dimères d'amorces (Singh & Kumar 2001; Rodríguez-Lázaro & Hernández 2013). De façon générale, il est recommandé d'éviter la présence de plus de trois répétitions du même nucléotide au sein de l'oligonucléotide ceci pouvant entraîner un phénomène de glissement de la polymérase (Rodríguez-Lázaro & Hernández 2013). D'autres paramètres sont plus difficiles à vérifier pour le dessin d'amorces dégénérées, compte-tenu du nombre de combinaisons possibles induites par les dégénérescences. Ainsi la teneur en nucléotides G et C doit être comprise entre 30 et 80%. De même, la température de fusion ( $T_m$ ) des oligonucléotides doit être comprise entre 50 et 60°C, avec une différence de  $T_m$  entre oligonucléotides sens et anti-sens inférieure à 2°C (Rodríguez-Lázaro & Hernández 2013). Dans le cadre particulier du dessin d'amorces dégénérées, le nombre de dégénérescence et leur place au sein de l'oligonucléotide doit être considéré avec attention. Au delà d'un certain nombre de dégénérescences, correspondant à une valeur de  $H_yC$  supérieure à 200, l'hybridation de l'amorce est affectée (Tapi *et al.* 2010). Des observations similaires ont été réalisées sur les nucléotides universels (Zheng *et al.* 2008). De plus, il a été montré dans le cas de l'utilisation d'inosine, que la place des bases modifiées joue un rôle sur l'efficacité du couple d'amorces. La présence d'inosine en région 3' a pour conséquence d'augmenter la valeur de  $C_q$  (Zheng *et al.* 2008).

Une fois l'étape de dessin achevée, il convient de vérifier que les oligonucléotides n'ont pas de propension à former des structures secondaires de type homodimères, hétérodimères ou épingles à cheveux (Tableau V-IV). Les homodimères correspondent à l'appariement entre deux exemplaires de la même amorce tandis que les hétérodimères sont issus d'un appariement entre les oligonucléotides sens et anti-sens. Les épingles à cheveux, quant à elles, sont issues de repliements de l'oligonucléotide sur lui-même suite à l'existence de séquences palindromiques. De nombreux logiciels comme Oligoanalyzer 3.1 ou Oligocalc permettent de réaliser ce travail. La sélection des amorces se base sur des données thermodynamiques et en particulier l'enthalpie libre  $\Delta G$ , permettant d'évaluer le risque de formation de la structure secondaire. Le Tableau V-IV reprend les valeurs limites tolérées pour des structures. En dessous de ces valeurs le risque de formation des structures secondaires est trop important. Ce travail *in silico* n'est pas substituable aux tests *in vitro*.

Ce dernier chapitre sur les outils au service de l'analyse de données clôt la partie concernant la synthèse bibliographique. La seconde partie de ce mémoire sera consacrée à la présentation de l'ensemble des travaux réalisés au cours de la thèse.



---

## Travaux de recherche

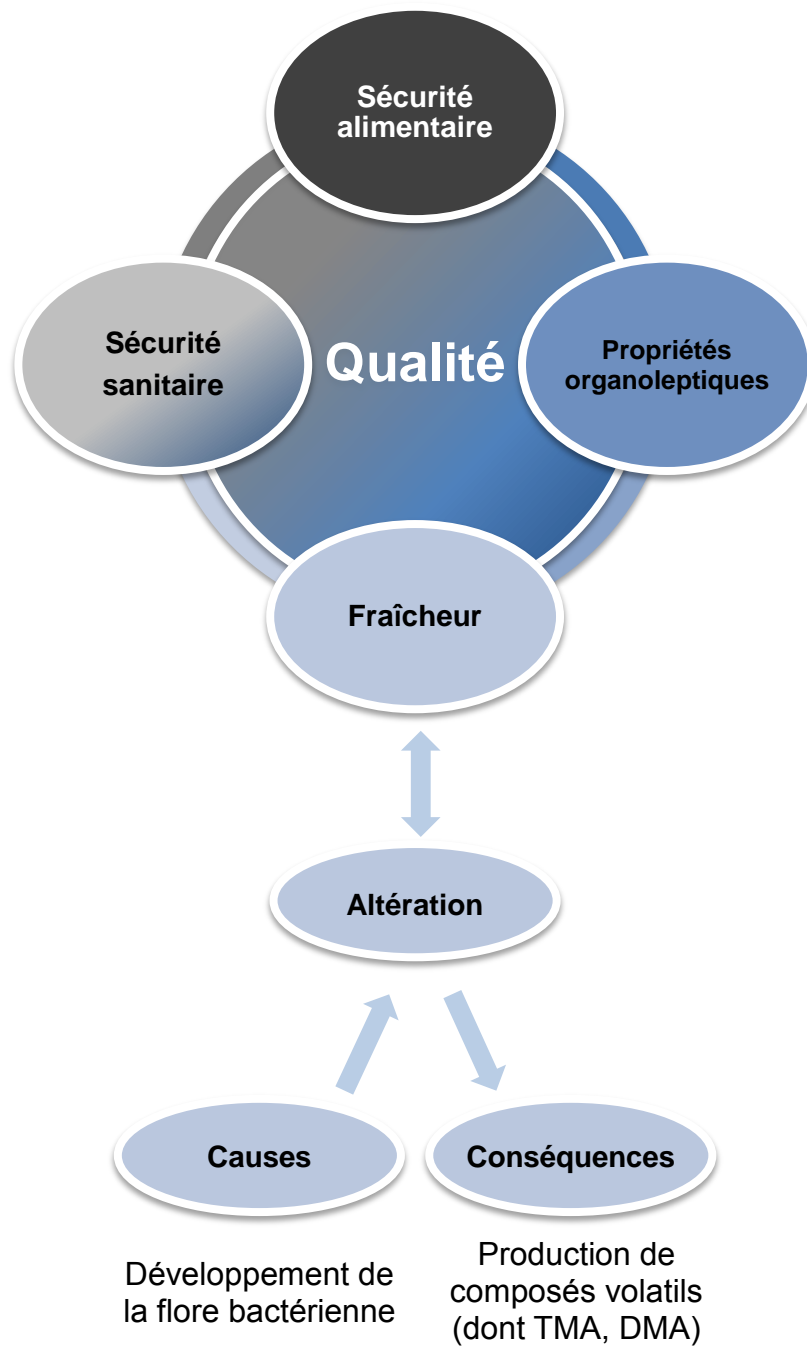


Figure 6-1 : Diagramme illustrant les composantes de la qualité évaluées lors de ce travail de thèse.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été consacrés à la qualité du poisson et plus particulièrement à sa fraîcheur et à ses propriétés organoleptiques (figure 6-1).

Une première partie présentera des travaux consacrés à l'une des causes de l'altération : la présence de microorganismes au sein de la chair des poissons avec, dans un premier temps, l'isolement de souches du genre *Shewanella* à partir d'un poisson altéré afin de les caractériser sur un plan phénotypique et génotypique (Partie I - Chapitre 1). Dans un second temps, une méthode qPCR sensible, rapide et spécifique a été développée en ciblant le gène *torA*, porté par la flore spécifique d'altération, codant pour une enzyme à l'origine de la synthèse de TMA (Partie I - Chapitre 2).

Une seconde partie, consacrée à l'une des conséquences de l'altération du poisson, s'attachera à développer une méthode SPME-GC-MS de quantification de la TMA, résultat de l'activité de TorA et de la DMA issue de l'action d'enzymes endogènes. Cette méthode a pu être testée dans le cadre d'un suivi d'altération de filets de poisson (Partie II).

Une troisième et dernière partie présentera des travaux consacrés à la qualité du poisson dans un sens plus large. L'impact de la durée de conservation d'anchois transformés sur l'évolution des profils de composés volatils et d'amines biogènes a été évalué par des méthodes de SPME-GC-MS et d'HPLC (Partie III).

---

## Partie I : Investigations concernant des causes microbiologiques de l'altération du poisson dans le cadre de l'évaluation de sa fraîcheur

### Chapitre 1. Caractérisation de souches de *S. baltica* issues d'un poisson altéré

Ces travaux ont été menés en parallèle de l'approche « quantification du gène *torA* dans une matrice de poisson ». La genèse de ce projet part du constat que la souche type de *S. putrefaciens* ATCC 8071 utilisée pour le développement méthodologique de la qPCR a été isolée à partir de beurre rance (Derby & Hammer 1931), éloigné de l'habitat marin. De plus, connaissant la variabilité génétique observée au sein du groupe *Shewanella putrefaciens*, il a été décidé d'isoler des souches de *S. putrefaciens* à partir d'une matrice de poisson.

Quatre colonies présentant un phénotype identique à celui observé pour *S. putrefaciens* sur milieu TSA-YE, *i.e* présentant une pigmentation pourpre à rosée, ont été sélectionnées sur un filet de merlan (*Merlangius merlangus*) altéré. Une caractérisation phénotypique à l'aide de tests de croissance et de tests biochimiques a d'abord été réalisée. Elle a été poursuivie par une caractérisation génotypique grâce au séquençage partiel de l'ARNr 16S et de *gyrB*. Enfin, une identification par MALDI-TOF a été effectuée afin d'obtenir des spectres de référence pour ces souches et de confirmer les résultats d'identification.

#### I. Résultats de caractérisations phénotypiques et génotypiques

Une partie des résultats de ce chapitre a fait l'objet d'une publication, présentée dans les pages suivantes, dans *Letters in Applied Microbiology*.

**Dehaut A, Midelet-Bourdin G, Brisabois A & Duflos G (2014) Phenotypic and genotypic characterization of H<sub>2</sub>S-positive and H<sub>2</sub>S-negative strains of *Shewanella baltica* isolated from spoiled whiting (*Merlangius merlangus*). *Letters in Applied Microbiology*. 59 (5) : 542-548. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12312>**

En outre, ce travail a également conduit au dépôt d'une souche de *S. baltica* auprès de la collection de l'Institut Pasteur (**souche CIP 110804**) et de séquences nucléotidiques (**LK392312, LK392313, LK392314, LK392315, LK392308, LK392309, LK392310 et LK392311**) sur EMBL.

## Phenotypic and genotypic characterization of H<sub>2</sub>S-positive and H<sub>2</sub>S-negative strains of *Shewanella baltica* isolated from spoiled whiting (*Merlangius merlangus*).

Alexandre Dehaut, Graziella Midelet-Bourdin, Anne Brisabois, Guillaume Duflos\*

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

\* Corresponding author: E-mail: guillaume.duflos[at]anses.fr Phone : +33.3.21.99.25.00 Fax : +33.3.21.99.17.25

Four strains were isolated from a spoiled whiting (*Merlangius merlangus*). All of them were able to grow aerobically from 4°C to 30°C and also able to develop anaerobically in presence of trimethylamine N-Oxide (TMAO) at 25°C. Biochemical characterization did not allow identification of the strains species but showed that one of the four strains was unable to produce H<sub>2</sub>S. Two strains synthesized an ornithine decarboxylase being potential putrescine producers. Results of carbon sources use highlighted that the four strains were able to use citrate and D-sucrose, one strain was not able to use L-arabinose. Genotypic characterization of the strains thanks to 16S rRNA and *gyrB* partial gene sequencing led to their identification as members of *Shewanella baltica* species. These observations suggest that H<sub>2</sub>S production may not be the most appropriate screening parameter for *Shewanella* species and further to monitor the development of spoilage flora.

**Keywords:** *Shewanella baltica*, fish spoilage, Taxonomy, H<sub>2</sub>S-negative strain, 16S rRNA, *gyrB* gene

### 1. Introduction

Fish is a highly perishable matrix subject to autolytic transformations (Huss 1995; Jiang 2000; Howgate 2006) and spoilage by specific microorganisms called specific spoilage organisms (SSO) (Dalgaard 1995). Among SSO, *Shewanella putrefaciens* has been described as the spoiling agent for fresh fish stored on melting ice (Gram and Dalgaard 2002), whereas fish conserved in modified atmosphere or vacuum packed is more likely spoiled by *Photobacterium phosphoreum* (Dalgaard 1995).

*S. putrefaciens* previously named *Alteromonas putrefaciens* and *Pseudomonas putrefaciens* has been long described as a unique flora. Actually, it was a heterogeneous species and *S. putrefaciens* was reclassified as a bacterial group composed of four subgroups based on DNA-DNA hybridization studies (Owen *et al.* 1978). *S. putrefaciens* group II and IV having been later reclassified as *Shewanella baltica* and *S. alga* species (Ziemke *et al.* 1998). It had been noticed that distinction between *Shewanella* species could not be achieved through biochemical characterization. Genomic approaches using 16S rRNA sequencing and more confidently *gyrB* sequencing has been strongly encouraged to discriminate close species (Yamamoto and Harayama 1995; Satomi *et al.* 2006). A genomic diversity still remained inside *Shewanella* species, thus a recent multi locus sequence typing (MLST) study on *S. baltica* highlights nine clades into this sole species (Deng *et al.* 2014).

To date, numerous *Shewanella* species have been identified in fish, marine animals and sea water including *Shewanella baltica*, *Shewanella hafniensis*, *Shewanella morhuae*, *Shewanella frigidimarina*, *Shewanella livingstonensis*, *Shewanella marinintestina*, *Shewanella schlegeliana*, *Shewanella sairae* (Ziemke

*et al.* 1998; Bozal *et al.* 2002; Satomi *et al.* 2003; Satomi *et al.* 2006). *S. baltica* has been described as a potential spoilage organism and the most H<sub>2</sub>S producing bacteria during storage of marine fish (Vogel *et al.* 2005). Most of the time isolation process of *Shewanella* involved a screening of strains abilities to produce H<sub>2</sub>S on iron agar plates (Vogel *et al.* 2005; Tryfinopoulou *et al.* 2007).

This study describes the isolation of four strains of *S. baltica* from a spoiled whiting (*Merlangius merlangus*) and their phenotypic and genotypic characterization.

### 2. Results and discussion

#### Growth abilities

A color screen selection was applied to colonies isolated from spoiled whiting and four colonies harboring the target pink/purple pigment were recovered, called 14LSABSM1SHW, 14LSABSM2SHW, 14LSABSM3SHW and 14LSABSM4SHW below. These four isolates were able to grow aerobically on a large spectrum of temperatures ranging from 4°C to 30°C (Table 1).

This ability to grow on a wide range of temperature suggests that the four strains are psychrotolerant, this is consistent with observations previously described on *Shewanella* species (Jørgensen and Huss 1989; Bozal *et al.* 2002). However all isolates showed no growth at 37°C, as previously reported for *Shewanella baltica* in the literature (Ziemke *et al.* 1998; Satomi *et al.* 2006; Tryfinopoulou *et al.* 2007), whereas *S. putrefaciens* and the pathogenic *Shewanella algae* are able to grow at such a temperature.

The four strains were also able to grow anaerobically on the trimethylamine N-Oxide (TMAO) containing agar medium (Table 1). Nonetheless it should be



**Figure S1: Results obtained with growth on TSI medium tubes after 24H at 30°C, showing two types of phenotypes: H<sub>2</sub>S negative strain on the left (14LSABSM1SHW) and H<sub>2</sub>S positive strain on the right (e.g. 14LSABSM2SHW, 14LSABSM3SHW and 14LSABSM4SHW).**

**Table 1: Results of phenotypic characterization of the four strains isolated from spoiled whiting obtained with plate cultures and API 20E system.**

Characteristics	Tests	14LSABSM1SHW	14LSABSM2SHW	14LSABSM3SHW	14LSABSM4SHW
<i>Aerobic growth</i>	(n=2)*				
	4°C	+	+	+	+
	8°C	+	+	+	+
	15°C	+	+	+	+
	25°C	+	+	+	+
	30°C	+	+	+	+
	37°C	- ‡	-	-	-
<i>Anaerobic growth</i>	(n=2)				
	25°C	+	+	+	+
<i>Production</i>	(n=3)				
	H <sub>2</sub> S production	-	+	+	+
<i>Hydrolysis</i>	(n=3)				
	Urea	-	-	-	-
	Gelatin	+	+	+	+
<i>Enzyme activity</i>	(n=3)				
	o-nitrophenol-β-D-galactoside	-	-	-	-
	Arginine dihydrolase	-	-	-	-
	Lysine decarboxylase	-	-	-	-
	Ornithine decarboxylase	+	-	-	+
	Tryptophane deaminase	-	-	-	-
	Tryptophanase	-	-	-	-
	Oxidase	+	+	+	+
<i>Use of carbon sources</i>	(n=3)				
	Citrate	+	+	+	+
	Pyruvate	-	-	-	-
	D-glucose	-	-	-	-
	D-mannitol	-	-	-	-
	Inositol	-	-	-	-
	D-sorbitol	-	-	-	-
	L-rhamnose	-	-	-	-
	D-sucrose	+	± §	±	±
	D-melobiose	-	-	-	-
	Amygdaline	-	-	-	-
L-arabinose	+	-	+	+	

\* Numbers in parenthesis following "n" refers to the number of replicate of the test. † "+" signs refer, for "Growth temperatures", to effective growth at a given temperature and for the other tests to positive results on API 20E system. ‡ "-" signs refer, for "Growth temperatures", to absence of growth at a given temperature and for the other tests to negative results on API 20E system. § "±" this sign means that results were not clear instead of yellow color, *i.e.* acidification of the solution, only green color was observed, blue being the negative result.

mentioned that colonies were slightly thinner than in aerobic conditions and no characteristic pigmentation was observed. Moreover it was noticed that a trimethylamine (TMA) characteristic odor, identical to the smell of pure TMA aqueous solution, was coming from plates placed in anaerobic conditions. This observation is concordant with the existence of TMAO reductase in *S. putrefaciens* group species (Dos Santos *et al.* 1998).

Growth on TSI tubes showed two types of results (**Figure S1**). Three strains 14LSABSM2SHW, 14LSABSM3SHW and 14LSABSM4SHW displayed a clear ability to produce H<sub>2</sub>S with a deep black coloration after 24h at 30°C. In contrast, 14LSABSM1SHW strain showed no black coloration indicating that no H<sub>2</sub>S was produced.

#### Biochemical characterization of the strains

All the results obtained during the biochemical characterization of the strains are presented in **Table 1**. Only three strains, 14LSABSM2SHW, 14LSABSM3SHW and 14LSABSM4SHW were able to produce H<sub>2</sub>S. The four strains showed no hydrolysis abilities against urea and o-nitrophenol-β-D-galactoside (ONPG); only

gelatin was catabolized by the whole strains. Concerning enzymes activities the four strains possess an oxidase activity and two of them, 14LSABSM1SHW and 14LSABSM4SHW, were able to decarboxylate ornithine being thus potential producers of a biogenic amine. The four strains were able to use few carbon sources, all of them used citrate as sole carbon source and D-sucrose even if the acidification of the solution was not clear. Only 14LSABSM2SHW strain was not able to use L-arabinose as carbon source. Regarding the biochemical tests, 14LSABSM1SHW, 14LSABSM2SHW, 14LSABSM3SHW and 14LSABSM4SHW strains were respectively identified as *Burkholderia cepacia* (87,3%ID – T=0.6) and members of *S. putrefaciens* group (14LSABSM2SHW strain: 99,5 %ID – T=0.58; 14LSABSM3SHW strain: 95,0%ID – T=0.3; 14LSABSM4SHW strain: 99,7%ID – T=0.4). Biochemical pattern of the strains did not allow finding the species of the strains. Regarding studies of *S. baltica* strains (Ziemke *et al.* 1998; Vogel *et al.* 2005; Tryfinopoulou *et al.* 2007) it appeared that except one strain, all strains studied were able to produce H<sub>2</sub>S. Previous exposed results are in agreement with those observed on three strains of *S. putrefaciens*

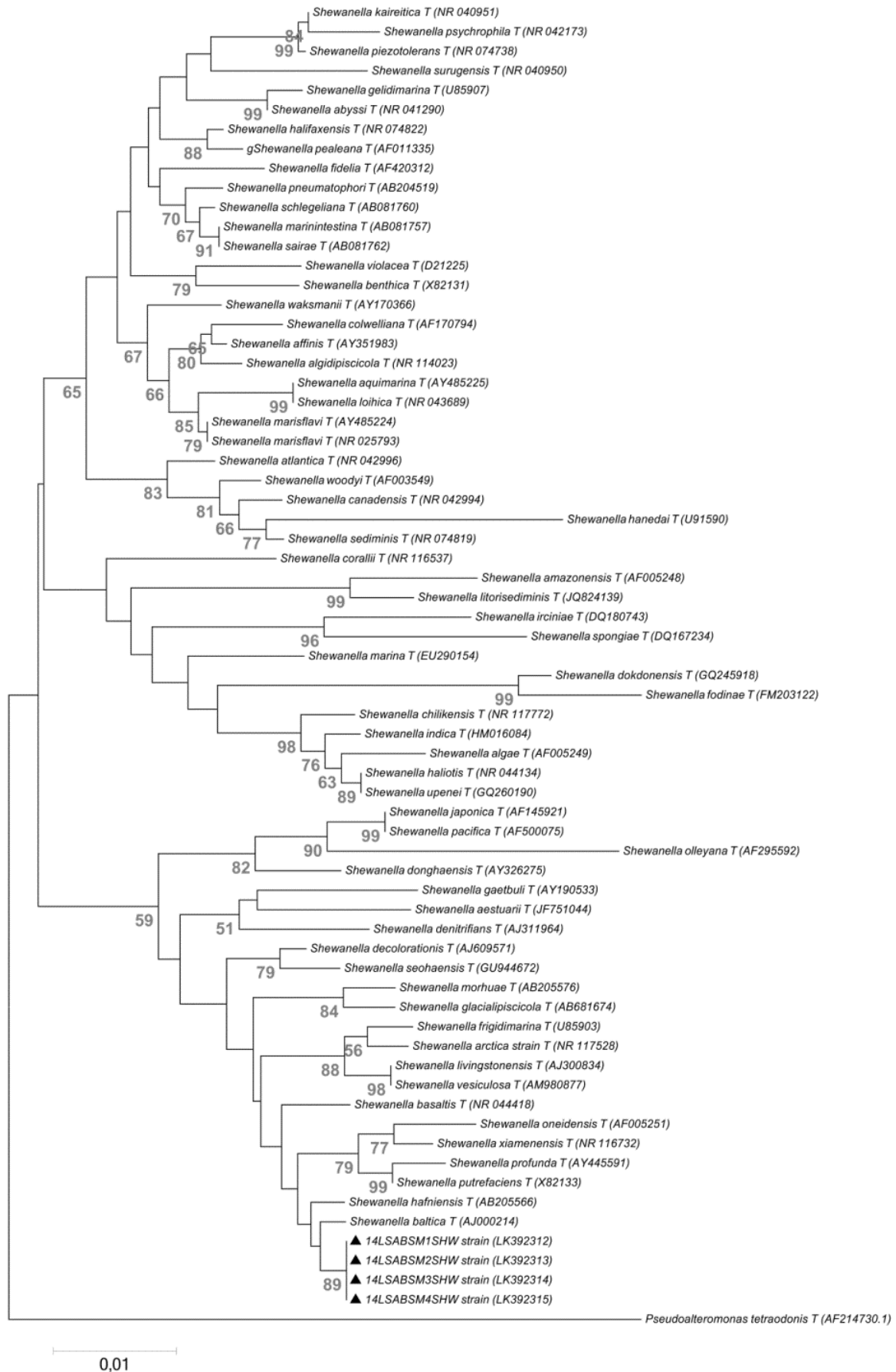
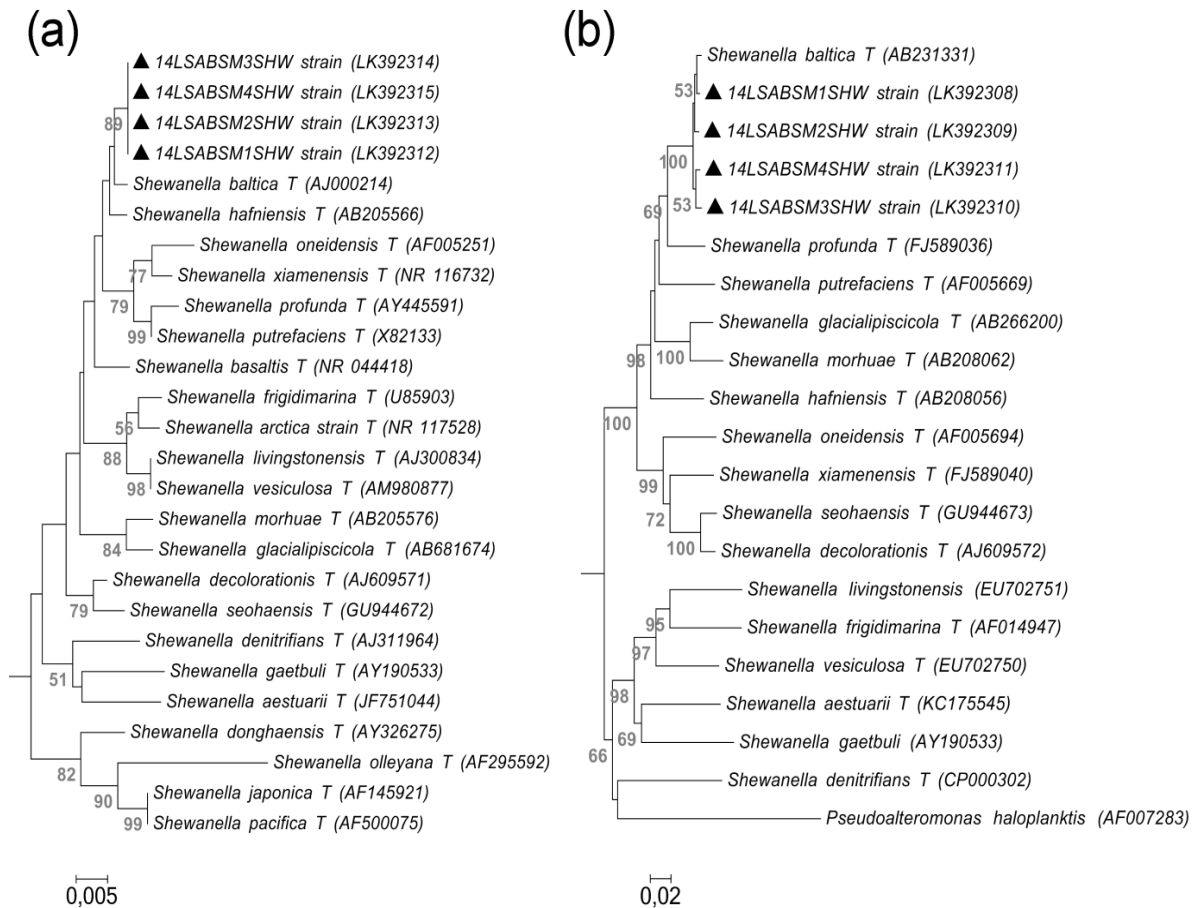


Figure S2: Phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequences comparison among *Shewanella* type strains and the four isolates, accession numbers are figured in parenthesis. Strains isolated in this study are tagged with ▲ symbol. Phylogenetic tree was obtained using neighbor-joining method and Kimura's 2 parameter model, the optimal tree with a sum of branch length equal to 0.61207491 was retained. The analysis involved 68 nucleotide sequences with a total of 718 positions in the final dataset. Numbers at nodes indicates occurrence of the node in 1000 bootstrapped trees; only values greater than 50% are displayed. *Pseudoalteromonas haloplanktis* subsp. *tetraodonis* 16S RNA sequence was used as outgroup. Bar indicates 0.01% sequence divergence





**Figure 1: Phylogenetic subtrees based on partial 16S rRNA gene sequences (a) and *gyrB* gene sequences (b). Trees compared the four isolates among *Shewanella* type strains (T) and non-type strains. Accession numbers are figured in parenthesis and isolate of this study are tagged with ▲ symbols. Phylogenetic tree was obtained using neighbor-joining method and Kimura's 2 parameter model. Concerning 16S rRNA the whole optimal tree with a sum of branch length equal to 0.61207491 was retained; analysis involved 68 nucleotides sequences with a total of 718 positions in the final dataset. Concerning *gyrB* the whole optimal tree with a sum of branch length equal to 3.79477621 was retained; analysis involved 54 nucleotides sequences with a total of 832 positions in the final dataset. Numbers at nodes indicates occurrence of the node in 1000 bootstrapped trees; only values greater than 50% are displayed. *Pseudoalteromonas haloplanktis* subsp. *tetraodonis* 16S rRNA and *gyrB* sequence were used as outgroup. Bar indicates sequences divergences.**

group II concerning urea hydrolysis (Ziemke *et al.* 1998) and *S. baltica* NCTC 10735 regarding gelatin hydrolysis (Vogel *et al.* 2005), whereas *S. baltica* LMG2250 harbour an urease and is unable to liquefy gelatin (Tryfinopoulou *et al.* 2007). By contrast, none of the isolated strains did show any arginine hydrolysis capacities as *S. baltica* LMG2250, whereas one strain of *S. putrefaciens* group II, *S. baltica* NCTC 10736, is able to produce ammonia from arginine (Ziemke *et al.* 1998; Tryfinopoulou *et al.* 2007). Use of carbon sources by the strains also lead to contradictory results. On the one hand conclusions concerning use of citrate as sole source of carbon and ability to use D-sucrose are consistent with previous observation. On the other hand, conclusion concerning use of D-glucose, amygdaline and L-arabinose by the isolates are the exact opposite of previously reported data (Ziemke *et al.* 1998; Vogel *et al.* 2005; Tryfinopoulou *et al.* 2007).

Phenotypic characterization of the four strains did not allow finding their species and showed that despite common growth and biochemical similarities,

specificities could be attribute for each strains; absence of ornithine decarboxylase in 14LSABSM2SHW and 14LSABSM3SHW strains or incapacity to use L-arabinose as carbon source for 14LSABSM2SHW strain. More importantly, 14LSABSM1SHW strain showed inability to produce H<sub>2</sub>S. As encouraged by previous studies (Satomi *et al.* 2003; Deng *et al.* 2014), a genotyping of these strains were achieved thanks to partial sequencing of 16S rRNA and *gyrB* gene.

#### Sequencing partial 16S rRNA sequences of the four isolated strains

The four partial 16S rRNA sequences of the isolates and 68 nucleotides sequences from GenBank, *Pseudoalteromonas haloplanktis* subsp. *tetraodonis* used as outgroup, allowed building an initial phylogenetic tree (Figure S2). The 22 closest sequences from the four isolates were retained to build a clearer subtree (Figure 1 a). The four stains were clustered together with *S. baltica* NCTC10735 type strain. There was an extremely low difference recorded between the 16S

rRNA sequences of this group. These strains clustered together 890 times in the 1000 bootstrapped replications of phylogenetic trees, meaning that this tree structure is highly likely. Regarding 16S rRNA sequence, alignments in BLAST led to respectively 98.4%, 99.3%, 98.0% and 98.3% identity between 14LSABSM1SHW, 14LSABSM2SHW, 14LSABSM3SHW, 14LSABSM4SHW strains and *S. baltica* NCTC 10735 type strain (data not shown). Clustering of strains from different species based on 16S rRNA sequence led to confirm previous observations having concluded that this gene lacks of specificity to differentiate close relatives (Fox *et al.* 1992). To overcome the slow evolution rate of 16S rRNA, *gyrB* gene sequencing has previously been described to achieve taxonomic study for a lot of species including *Shewanella* species (Satomi *et al.* 2003). Thus, *gyrB* gene sequencing has been the second part of the genotyping approach of this study.

#### Sequencing of partial *gyrB* gene sequences of the four isolates

Fifty four *gyrB* gene sequences collected from GenBank and the four partial *gyrB* gene sequences of isolated strains were gathered to build a phylogenetic tree (Figure S3). *Pseudoalteromonas haloplanktis* subsp. *tetraodonis* was again used as outgroup reference. For greater clarity, a new subtree was built (Figure 1 b) with a reduced number of sequences (17+4). As illustrated on Figure 1 b, 14LSABSM1SHW, 14LSABSM2SHW and 14LSABSM3SHW *gyrB* gene sequences are closely related to *S. baltica* NCTC 10735 *gyrB* gene sequences. Alignments in BLAST led to respectively 99.3 %, 99.0%, 98.9% and 99.1% identity between *gyrB* gene sequences of 14LSA-BSM1SHW, 14LSABSM2SHW, 14LSABSM3SHW, 14LSABSM4SHW and *S. baltica* NCTC 10735 type strain *gyrB* gene sequence (data not shown). *gyrB* gene sequencing confirmed previous identifications thanks to 16S rRNA sequences, leading to the conclusion that the four strains belong to the *S. baltica* species.

#### Diversity among the *S. baltica* strains isolated from spoiled whiting.

Genotypic characterization of the strains isolated from spoiled whiting by both 16S rRNA and *gyrB* gene sequencing concluded that they belong to *S. baltica* species. As previously mentioned biochemical characterization of the strains was not efficient enough to identify strains species. Three strains were identified at the bacterial group level and one, 14LSABSM1SHW, was misidentified as *Burkholderia cepacia*. The misidentification of this strain seems to solely result from its H<sub>2</sub>S negative phenotype as above mentioned. Regarding biochemical patterns obtained hereby and in previous studies, it should be noted that *S. baltica* is a heterogeneous species regarding enzymes activities and carbon sources use.

More knowledge is needed for the discrimination of the different strains isolated from spoiled fish and a MLST approach like the one realized on *S. baltica* coming from different environment (Deng *et al.* 2014) could interestingly be achieved. Based on 16S rRNA and *gyrB* gene partial sequencing, the four isolated strains are close to strains coming from three clades (H1, H2 and H3), defined in the MLST study and recovered between 80 to 100 m depth. Surprisingly 14LSABSM1SHW strain grew anaerobically on TMAO-TSA-YE-NaCl plate, being able to respire TMAO whereas it was unable to respire thiosulfate. This phenotype seems thus to go against observation on strains of the sole clade, MLST-E, unable to respire thiosulfate that also could not respire TMAO (Deng *et al.* 2014). More importantly, this study emphasized that H<sub>2</sub>S production may not be the most appropriate screening parameter to isolate *Shewanella* strains as previously achieved (Jørgensen and Huss 1989; Vogel *et al.* 2005; Tryfinopoulou *et al.* 2007), *S. baltica* 14LSABSM1SHW being a H<sub>2</sub>S negative strain. Nonetheless, more strains coming from more fish have to be characterized to confirm presented results and estimate the part of H<sub>2</sub>S negative isolates into spoiling fish. Moreover, the spoiling potential of the strains has to be characterized, spiking sterile fish fillets for example and quantifying spoilage indicator as total volatile basic nitrogen (TVB-N).

Thus contrary to previously reported methods (Gram and Dalgaard 2002), TMAO reduction or pigment synthesis abilities seems to be a more appropriate detection method concerning *Shewanella* species.

### 3. Materials and Methods

#### Bacterial strains, growth conditions and biochemical characterization

Bacterial strains were isolated from a spoiled whiting bought at a local retailer (Boulogne-sur-Mer, France) and stored in its packaging for six days at + 8.0°C. Twenty five grams of flesh were added to 225 mL of peptone water (Oxoid, Dardilly, France) and were blended at 560 rpm with a Smasher lab homogenizer (AES Chemunex, Bruz, France). Two successive decimal dilutions of the homogenate were prepared in physiological water. For each dilution, two tryptone soya agar plus yeast extract with 1.5% (w/v) NaCl (TSA-YE-NaCl) (Oxoid, Dardilly, France) plates were inoculated and incubated at 25°C for 24H. After plate reading, colonies producing a purple/pink pigment were conserved, as this pigmentation was previously observed for growth of *S. putrefaciens* type strain (ATCC 8071) on TSA-YE-NaCl plates. Ability of these isolates to aerobically grow at 4°C (72H), 8°C (48H), 15°C (24H), 25°C (24H), 30°C (24H) and 37°C (24H) was screened on TSA-YE-NaCl plates. Ability of the isolates to grow on anaerobic conditions was tested on TSA-YE-NaCl supplemented with 40 mmol.L<sup>-1</sup> of trimethylamine N-oxide (Sigma-Aldrich, St-Quentin-

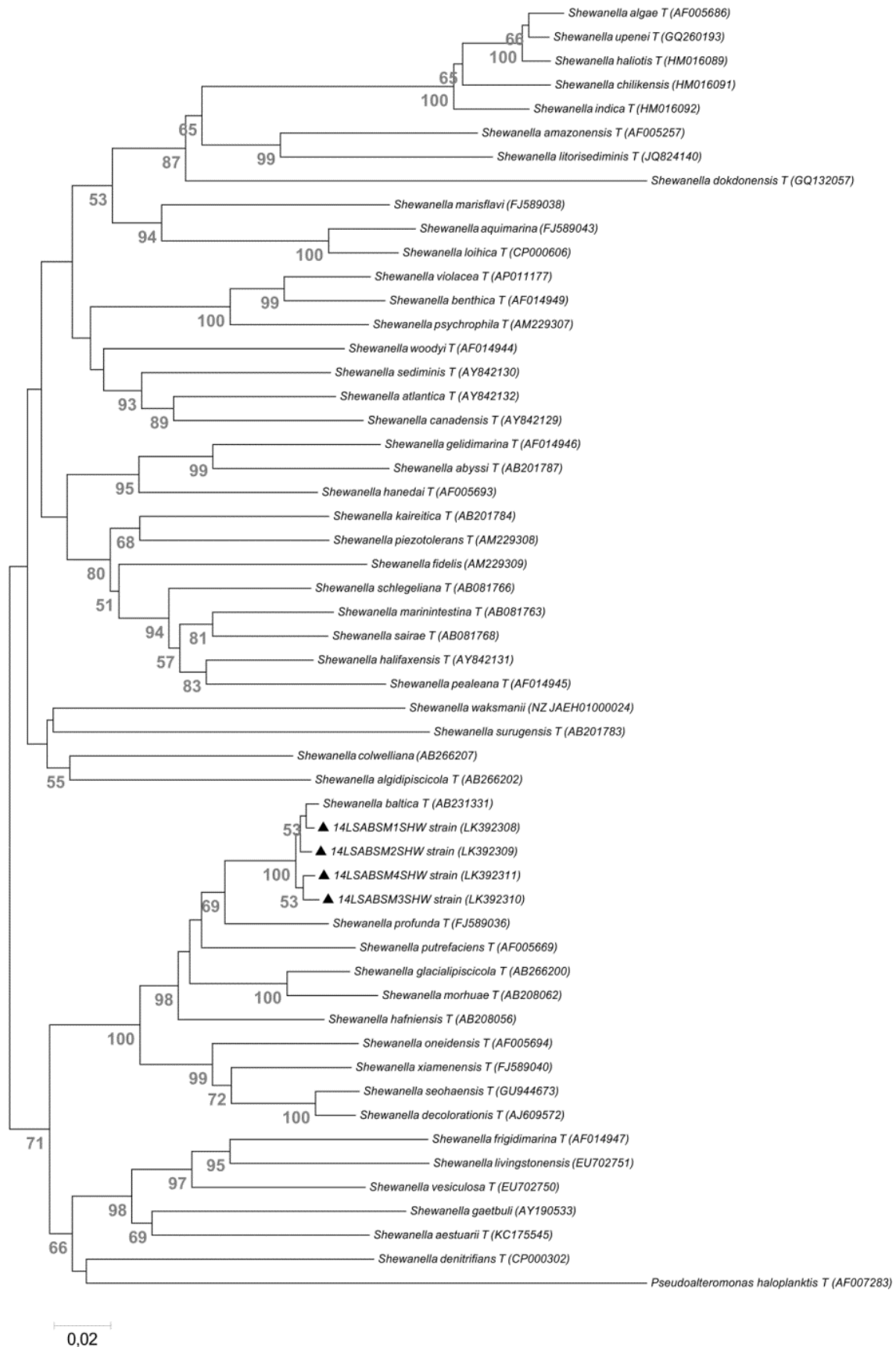


Figure S3: Phylogenetic tree based on partial *gyrB* gene sequences comparison among *Shewanella* type strains and the four isolates, accession numbers are figured in parenthesis. In some cases type strain sequences were not available this corresponds to genera not followed by "T". Strains isolated in this study are tagged with ▲ symbol. Phylogenetic tree was obtained using neighbor-joining method and Kimura's 2 parameter model, the optimal tree with a sum of branch length equal to 3.79477621 was retained. The analysis involved 54 nucleotide sequences with a total of 832 positions in the final dataset. Numbers at nodes indicates occurrence of the node in 1000 bootstrapped trees; only values greater than 50% are displayed. *Pseudoalteromonas haloplanktis* subsp. *tetraodonis* *gyrB* gene sequence was used as outgroup. Bar indicates 0.02% sequence divergence.

Fallavier, France) (TMAO-TSA-YE-NaCl) for 24H at 25°C, anaerobic conditions being generated thanks to Genbag system (Biomérieux, Craponne, France). Confirmation of H<sub>2</sub>S production was achieved by inoculation of triple sugar iron (TSI) medium tubes (Oxoid, Dardilly, France) incubated at 30°C for 24H. Finally, biochemical characterization of these strains was achieved using API 20E system (Biomérieux, Craponne, France) incubated at 30°C for 48H and depositing a 24H fresh bacterial colony on oxydase reagent (Biomérieux, Craponne, France).

#### DNA extractions & Sequencing

DNA extractions of the four strains was carried out on single colonies isolated from a fresh culture at 25°C for 24H on TSA-YE-NaCl plates, using Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Extraction was performed using manufacturer instructions except for the ultimate step: the final elution was separated in two elutions with 50µL of TE buffer each. Quantity and quality of DNA ( $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  and  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$  ratio) were then controlled using a DS-11 Spectrophotometer (Denovix, Wilmington, NC, USA). A DNA extract was sent for each strain to the private genomics platform Genoscreen (Lille, France) that achieved PCR amplifications and sequencing for the V1-V2-V3 and V3-V4-V5 regions of 16S rRNA (1200 bp) and partial sequence of *gyrB* gene (1200 bp).

#### Bioinformatics

Contig assembling of 16S rRNA and *gyrB* gene sequences of the four strains were carried out using CAP3 algorithm (Perrière 1996; Huang and Madan 1999). Coding sequences of 16s rRNA and *gyrB* gene of *Shewanella* genera were retrieved from GenBank using *Shewanella* type strain listed on list of prokaryotic names with standing in nomenclature (Euzéby 1997). Collected sequences of 16s rRNA and *gyrB* gene and contigs of the four strains were aligned using MUSCLE algorithm (Edgar 2004). Phylogenetic trees were traced using neighbor-joining method, genetic distance were computed using Kimura's 2 parameter model (Kimura 1980). Percentage of replicate trees in which taxa clustered together were estimated computing 1000 bootstrapped trees (Felsenstein 1985). Sequences alignments and trees building was carried out using MEGA5 software (Tamura *et al.* 2011). Finally, sequences were BLAST checked using nucleotide BLAST (Altschul *et al.* 1990) with optimization of the program for highly similar sequences (megablast) and excluding models (XM/XP) and uncultured/environmental sample sequences.

#### Accessions numbers and strain

The 16S rRNA and *gyrB* gene sequences of strains 14LSABSM1SHW, 14LSABSM2SHW, 14LSABSM3SHW, 14LSABSM4SHW were deposited in the EMBL data-

base (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridge, United-Kingdom) under the respective accession numbers LK392312, LK392313, LK392314, LK392315 and LK392308, LK392309, LK392310, LK392311. 14LSABSM1SHW strain was deposited at the Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (Paris, France) under the identifier CIP 110804.

#### Acknowledgements

Authors want to thank Régine Quenu, Marie-Ange Huchin and Cindy Ducrocq for their kind technical assistance. A. Dehaut is grateful to the Nord-Pas de Calais Regional Council (France) and Anses for providing financial support for his PhD studies.

#### Conflict of interest

No conflict of interest declared.

#### References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Bozal, N., Montes, M.J., Tudela, E., Jiménez, F. and Guinea, J. (2002) *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 195-205.
- Dalgaard, P. (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int J Food Microbiol* **26**, 319-333.
- Deng, J., Brettar, I., Luo, C., Auchtung, J., Konstantinidis, K.T., Rodrigues, J.L., Höfle, M. and Tiedje, J.M. (2014) Stability, genotypic and phenotypic diversity of *Shewanella baltica* in the redox transition zone of the Baltic Sea. *Environ Microbiol* **16**, 1854-1866.
- Dos Santos, J.-P., Iobbi-Nivol, C., Couillault, C., Giordano, G. and Méjean, V. (1998) Molecular analysis of the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *J Mol Biol* **284**, 421-433.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792-1797.
- Euzéby, J.P. (1997) List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Available on line at [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net) [accessed 14.07.14].
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. and Jurtshuk, P. (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 166-170.
- Gram, L. and Dalgaard, P. (2002) Fish spoilage bacteria - problems and solutions. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 262-266.
- Howgate, P. (2006) A review of the kinetics of degra-

- dation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *Int J Food Sci Tech* **41**, 341-353.
- Huang, X. and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* **9**, 868-877.
- Huss, H.H. (1995) Quality and quality changes in fresh fish. In *FAO Fish Tech Pap.*
- Jiang, S.-T. (2000) Enzymes and their effects on seafood texture. In *Seafood enzyme: Utilization and influence on postharvest seafood quality* ed. Haard, N.F. and Simpson, B.K. pp. 411–450. New York: Marcel Dekker Inc..
- Jørgensen, B.R. and Huss, H.H. (1989) Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *Int J Food Microbiol* **9**, 51-62.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
- Owen, R., Legros, R. and Lapage, S. (1978) Base composition, size and sequence similarities of genome deoxyribonucleic acids from clinical isolates of *Pseudomonas putrefaciens*. *J Gen Microbiol* **104**, 127-138.
- Perrière, G. (1996) CAP3 Sequence Assembly Program: PRABI-Doua.
- Satomi, M., Oikawa, H. and Yano, Y. (2003) *Shewanella marinintestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov., novel eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 491-499.
- Satomi, M., Vogel, B.F., Gram, L. and Venkateswaran, K. (2006) *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 243-249.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., Vancanneyt, M., Hoste, B., Swings, J. and Nychas, G.-J. (2007) Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea. *J Appl Microbiol* **103**, 711-721.
- Vogel, B.F., Venkateswaran, K., Satomi, M. and Gram, L. (2005) Identification of *Shewanella baltica* as the most important H<sub>2</sub>S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6689-6697.
- Yamamoto, S. and Harayama, S. (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1104-1109.
- Ziemke, F., Höfle, M.G., Lalucat, J. and Rosselló-Mora, R. (1998) Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 179-186.

$$\%CV = \frac{\sigma}{\bar{x}}$$

Figure 6-2 : Formule de calcul de l'écart-type relatif également appelé coefficient de variation (%CV).

## II. Résultats de l'approche MALDI-TOF

Les souches isolées ont fait l'objet d'une identification complémentaire en utilisant un spectromètre de masse MALDI-TOF présent sur la plateforme Anses basée au Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LNH-Anses). L'objectif a consisté dans un premier temps à confirmer le genre et l'espèce des souches isolées, puis dans un second temps de voir si des différences entre les souches et les milieux de cultures utilisés pouvaient être visualisées. Des spectres de référence ont été obtenus à partir d'extraits protéiques totaux, puis ils ont été comparés à la banque spectrale du fabricant. Les résultats d'identification sont communiqués sous forme d'un tableau regroupant les espèces les plus probables.

### 1. Préparation et traitement des échantillons

L'analyse a été effectuée sur les quatre souches isolées issues de cultures sur les deux milieux et conditions d'incubation présentés précédemment. La préparation de l'extrait total est réalisée selon la méthode dite acide formique/éthanol. Plusieurs colonies d'une même souche regroupées à l'aide d'une öse sont mélangées à 300 µL d'eau distillée de façon à avoir une suspension trouble. 900 µL d'éthanol sont ensuite ajoutés et la solution est bien homogénéisée, puis centrifugée 2 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot séché. Ensuite, 15 µL d'acide formique sont ajoutés au culot pour le reprendre et 15 µL d'acétonitrile sont additionnés. Le tout est bien homogénéisé et centrifugé 2 minutes à 13000 rpm. Après centrifugation, 1 µL de surnageant est ensuite distribué dans la zone, matérialisée par un cercle, d'une plaque de 48 positions à raison de 8 dépôts d'extrait protéique par souche. Une fois les dépôts bien secs, 1,2 µL d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique, sont distribués sur chaque dépôt. Pour chaque série analytique, 1 µL de solution standard contenant un extrait protéique d'*E. coli* est également distribué servant d'étalon de calibration et de contrôle du bon déroulement de l'analyse. Après séchage la plaque est introduite dans le spectromètre Microflex LT (Bruker, France). Pour chaque dépôt, trois spectres sont acquis, ainsi 24 spectres sont obtenus par souche. Les analyses sont réalisées selon une séquence précise visant dans un premier temps à ioniser et désorber les protéines à l'aide d'un laser puis générer un spectre de masse après impact des ions sur un détecteur à l'extrémité du tube de vol. Le spectre acquis sur la plage allant de 1000 à 12000 m/z est ensuite comparé à la bibliothèque spectrale du fabricant. La fiabilité de l'identification repose sur le score obtenu dont l'interprétation dépend de la valeur générée : identification très probable de l'espèce ( $> 2,300$ ), probable ( $2,000 < n < 2,300$ ) et identification probable du genre bactérien ( $1,700 < n < 1,900$ ). Des études préliminaires menées à l'Anses semblent indiquer qu'un niveau additionnel de fiabilisation du résultat peut être apporté en se basant sur le calcul de l'écart-type relatif (figure 6-2) de la distribution des scores. Ainsi, il a été observé qu'une valeur de cet écart-type inférieure à 5% conduit à une identification robuste de l'espèce bactérienne de la souche analysée.

**Tableau VI-I : Résultats d'identification des quatre souches de *S. baltica* par analyse en MALDI-TOF**

Souches	Milieu TSA-YE-NaCl			Milieu OTMA-TSA-YE-NaCl		
	Score <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Identification <sup>c</sup>	Score <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Identification <sup>c</sup>
14LSABSM1SHW	2,402	2,8%	<i>Shewanella baltica</i>	2,391	1,7%	<i>Shewanella baltica</i>
14LSABSM2SHW	2,355	2,7%	<i>Shewanella baltica</i>	2,300	4,0%	<i>Shewanella baltica</i>
14LSABSM3SHW	2,330	2,0%	<i>Shewanella baltica</i>	2,341	1,4%	<i>Shewanella baltica</i>
14LSABSM4SHW	2,294	3,1%	<i>Shewanella baltica</i>	2,339	2,1%	<i>Shewanella baltica</i>

<sup>a</sup> Score moyen obtenu à partir de 24 mesures (3 répétitions sur 8 dépôts d'extraits protéiques) pour chacune des souches. <sup>b</sup> Valeur de l'écart-type relatif du score moyen obtenu pour chaque souche. <sup>c</sup> Identification de la souche selon la base de données Bruker, à l'heure de la rédaction de ce manuscrit seul un spectre de référence, celui de la souche de *S. baltica* DSM 9439T, compose cette base de données.

**Tableau VI-II : Résultats de validation croisée d'identification des souches.**

Croissance sur milieu TSA-YE-NaCl											
14LSABSM1SHW			14LSABSM2SHW			14LSABSM3SHW			14LSABSM4SHW		
Identification <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	% CV <sup>c</sup>	Identification <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	% CV <sup>c</sup>	Identification <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	% CV <sup>c</sup>	Identification <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	% CV <sup>c</sup>
Sb1 TSA	2,769	2,8%	Sb2 TSA	2,809	2,1%	Sb3 TSA	2,758	2,0%	Sb4 TSA	2,738	2,1%
Sb2 TSA	2,700	2,4%	Sb1 TSA	2,716	2,1%	Sb1 TSA	2,692	1,6%	Sb4 OTMA	2,550	3,3%
Sb3 TSA	2,672	2,4%	Sb2 OTMA	2,625	2,0%	Sb3 OTMA	2,607	1,7%	Sb1 OTMA	2,507	4,8%
Sb1 OTMA	2,628	2,4%	Sb3 TSA	2,624	2,3%	Sb2 TSA	2,607	2,0%	Sb1 TSA	2,504	4,3%
Sb3 OTMA	2,572	2,8%	Sb1 OTMA	2,596	2,3%	Sb1 OTMA	2,579	2,0%	Sb3 TSA	2,484	4,4%
Sb2 OTMA	2,558	2,4%	Sb3 OTMA	2,511	2,3%	Sb4 OTMA	2,565	1,5%	Sb2 TSA	2,483	3,5%
Sb4 OTMA	2,553	2,4%	Sb4 OTMA	2,510	2,1%	Sb2 OTMA	2,513	1,7%	Sb3 OTMA	2,450	4,9%
Sb4 TSA	2,503	2,9%	Sb4 TSA	2,492	2,2%	Sb4 TSA	2,503	2,1%	Sb2 OTMA	2,373	3,6%
Sp TSA	1,944	4,2%	Sp TSA	1,813	5,4%	Sp TSA	1,985	3,3%	Sp OTMA	1,782	8,7%
Sp OTMA	1,764	6,7%	Sp OTMA	1,668	6,3%	Sp OTMA	1,739	5,8%	Sp TSA	1,750	10,4%

Croissance sur milieu OTMA-TSA-YE-NaCl											
14LSABSM1SHW			14LSABSM2SHW			14LSABSM3SHW			14LSABSM4SHW		
Identification <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	% CV <sup>c</sup>	Identification <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	% CV <sup>c</sup>	Identification <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	% CV <sup>c</sup>	Identification <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	% CV <sup>c</sup>
Sb1 OTMA	2,755	1,9%	Sb2 OTMA	2,666	4,5%	Sb3 OTMA	2,757	1,1%	Sb1 OTMA	2,657	2,1%
Sb1 TSA	2,650	2,4%	Sb2 TSA	2,556	3,2%	Sb4 OTMA	2,649	1,5%	Sb1 TSA	2,593	2,3%
Sb4 OTMA	2,633	1,9%	Sb3 OTMA	2,546	4,4%	Sb3 TSA	2,627	1,5%	Sb2 OTMA	2,596	1,8%
Sb3 OTMA	2,631	2,1%	Sb1 TSA	2,539	3,2%	Sb1 OTMA	2,616	2,0%	Sb2 TSA	2,516	2,4%
Sb2 OTMA	2,597	1,8%	Sb1 OTMA	2,531	2,9%	Sb1 TSA	2,594	2,0%	Sb3 OTMA	2,654	1,7%
Sb3 TSA	2,584	2,3%	Sb4 OTMA	2,508	4,5%	Sb2 OTMA	2,593	1,1%	Sb3 TSA	2,612	2,0%
Sb2 TSA	2,582	2,3%	Sb3 TSA	2,500	3,3%	Sb2 TSA	2,495	2,2%	Sb4 OTMA	2,780	1,7%
Sb4 TSA	2,542	2,3%	Sb4 TSA	2,358	2,9%	Sb4 TSA	2,469	2,2%	Sb4 TSA	2,590	2,3%
Sp TSA	1,938	4,1%	Sp TSA	1,788	7,4%	Sp TSA	1,959	3,9%	Sp OTMA	1,861	3,5%
Sp OTMA	1,780	6,7%	Sp OTMA	1,451	12,3%	Sp OTMA	1,741	7,1%	Sp TSA	1,987	3,6%

<sup>a</sup> Identification des souches avec la codification suivante Sb1 : 14LSABSM1SHW, Sb2 : 14LSABSM2SHW, Sb3 : 14LSABSM3SHW, Sb4 : 14LSABSM4SHW, Sp : *S. putrefaciens* DSM 6067, TSA : croissance sur milieu TSA-YE-NaCl et OTMA : croissance sur milieu OTMA-TSA-YE-NaCl. Ainsi Sb1 OTMA correspond au spectre de référence de 14LSABSM1SHW issu d'une croissance sur milieu TSA-YE-NaCl. <sup>b</sup> Score moyen obtenu à partir de 24 mesures (3 répétitions sur 8 dépôts d'extraits protéiques) pour chacune des souches. <sup>c</sup> Valeur de l'écart-type relatif du score moyen obtenu pour chaque souche.



## 2. Résultats

Comme le montre le [Tableau VI-I](#), l'analyse des extraits protéiques totaux en MALDI-TOF permet de confirmer l'identification génotypique réalisée précédemment par séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S et de *gyrB*. L'identification des souches est fiable compte-tenu du fait que les scores et les écart-types relatifs satisfont les critères précédemment définis. Seul le score de la souche 14LSABSM4SHW issue d'une culture sur le milieu TSA-YE-NaCl ne donne qu'un résultat probable, néanmoins compte-tenu du score moyen et de la valeur de l'écart-type relatif inférieure à 5%, l'identification semble fiable.

Ensuite, l'impact des conditions de culture a été analysé. En effet, l'ajout d'OTMA au milieu TSA-YE-NaCl favorise le développement des souches en conditions anaérobies en activant la synthèse de l'opéron *tor*. La comparaison visuelle des spectres permet de mettre en évidence certains pics apparaissant/disparaissant en fonction des conditions de culture. Ainsi la croissance en anaérobiose sur le milieu OTMA-TSA-YE-NaCl conduit à l'apparition de trois pics sur le spectre de masse à 2218 m/z, 4442 m/z, 8508 m/z, et la disparition du pic enregistré à 3354 m/z sur milieu TSA-YE-NaCl. Si ces différences sont visibles sur les spectres d'identification, l'origine de ces changements n'est pas connue : en effet le travail est réalisé sur un mélange protéique, de plus l'utilisation d'un analyseur en dimension simple limite l'information contenue dans le spectre. Enfin, si des différences ont pu être identifiées par cette approche, les conclusions concernant les scores ([Tableau VI-II](#)) sont identiques à celles du paragraphe précédent. La variabilité des spectres est trop faible avec l'approche utilisée pour pouvoir différencier les conditions de culture.

Une dernière approche s'est intéressée à la discrimination de souches d'une même espèce. La comparaison visuelle des spectres ne permet pas d'observer des zones de spectre différenciant les quatre souches. Néanmoins, une validation croisée des données ([Tableau VI-II](#)) a montré que le score le plus élevé correspond généralement à la bonne souche, sauf à deux exceptions, mais les scores des autres souches sont extrêmement proches l'écart le plus élevé étant de 0,108. De plus, la réalisation d'ACP montre *a posteriori* l'existence de groupes distincts composés des différentes répétitions réalisées par souche, sans pouvoir identifier les causes de ces regroupements. Ainsi, il doit exister de faibles différences entre les protéomes de chaque souche, même si cela n'est pas discernable lors d'une comparaison visuelle des spectres.

La technique MALDI-TOF a donc permis de confirmer l'identification des souches de *S. baltica*. Des comparaisons visuelles de spectres ont montré quelques différences en fonction des conditions de culture, mais aucune entre les quatre souches. L'utilisation d'outils de statistiques multivariées, plus puissants, a montré que des différences existent sans en expliquer les causes. Ceci illustre les limites de la comparaison visuelle de spectres. A terme, une comparaison plus fine des spectres et une identification plus fiable de l'origine des différences observées serait à envisager en utilisant un traitement statistique.

### III. Contribution de l'approche et perspectives

Cette étude a permis d'isoler quatre souches de *S. baltica* à partir d'un merlan altéré. Les tests microbiologiques ont pu montrer qu'elles étaient capables de croître dans différentes conditions de température et d'atmosphère. Toutes les souches ont pu se développer en anaérobiose en présence d'OTMA. Les tests biochimiques ont montré que bien qu'isolées à partir d'un même poisson, ces souches présentent des profils différents. Il faut noter d'ailleurs que deux souches présentaient une activité ornithine décarboxylase pouvant conduire à la production de putrescine. De plus, trois d'entre elles étaient capables de produire de l'H<sub>2</sub>S. En outre, il a pu être confirmé que l'utilisation de tests biochimiques traditionnels pour caractériser ces souches appartenant au groupe *S. putrefaciens* n'était pas appropriée. Une méthode génotypique : le séquençage partiel de l'ARNr 16S et du gène *gyrB*, ainsi qu'une méthode biochimique : la mesure des spectres d'extraits protéiques totaux par MALDI-TOF, ont en revanche permis d'identifier de façon fiable les souches.

Au cours de cette étude, l'existence d'une souche de *S. baltica* ne produisant pas d'H<sub>2</sub>S a pu être mise en évidence. Ce paramètre est à prendre en considération sachant que de nombreuses approches microbiologiques d'évaluation de la fraîcheur du poisson utilisent le caractère « production d'H<sub>2</sub>S » afin de dénombrer la flore d'altération. Ce travail permet de poser la question de la pertinence d'un tel crible. La recherche de la flore productrice de TMA apparaît a priori plus pertinente dans le cadre de la caractérisation de l'altération de poissons marins.

Néanmoins de nouvelles études doivent être menées sur un plus grand nombre de souches isolées et d'échantillons afin d'estimer leur proportion au sein de la flore du poisson. De même, une étude du potentiel d'altération des souches H<sub>2</sub>S négatives doit être conduite.

Tableau VII-I : Amorces sens et anti-sens sélectionnées à l'issue de la première approche de dessin d'amorces amplifiant le gène *torA* chez *Shewanella*, *Vibrio* et *Photobacterium*.

Amorces sens		Amorces anti-sens	
Identifiants	Séquence (5'-3')	Identifiants	Séquences (5'-3')
dirtorAF1	TDCGYTACCCDATGGTDCG	dirtorAR1	GCRTANACMTCNGTNGARCC
dirtorAF2	CAYGCNGGNCAAACNGGYTGG	dirtorAR2	CCARTADGGYTGTCRC CRTG
dirtorAF3	AARRTNGGBGAYTAYTCN	dirtorAR3	TTAGCNGGRAAVSCVCCNGG
dirtorAF4	GGYTCNACNGAKGTNTAYGC	dirtorAR4	ACBATRTCNGARAARCGRG
dirtorAF5	CAYGGYGARCARCCHTAYTGG	dirtorAR5	ATVARRCCNGAHGGYGTDCG
dirtorAF6	TGYCGYTTYTCNGAYATVGT	dirtorAR6	GGNCCRTACCANGCNCCTC

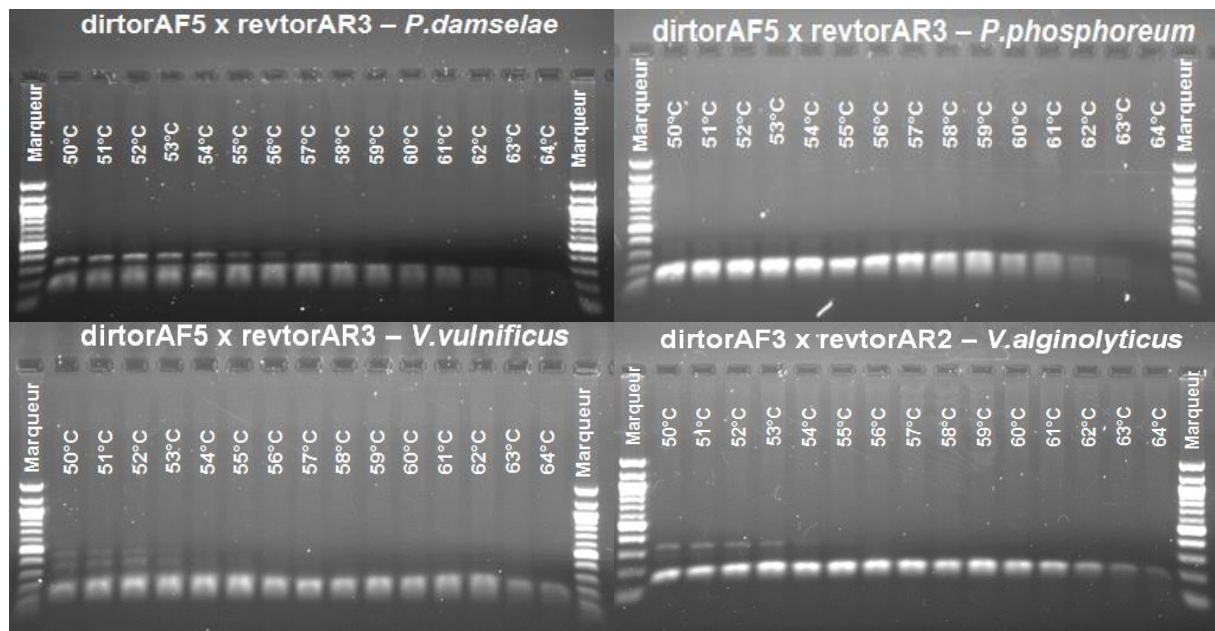


Figure 7-1 : Produits PCR obtenus après amplification à des températures d'hybridation allant de 50°C à 64°C d'ADN provenant de quatre souches bactériennes à une concentration finale de 3,5 µg.mL<sup>-1</sup>. Le cycle d'amplification correspond à une étape initiale de dénaturation de 30s à 95°C, puis 30 cycles composés de trois sous étapes : 30s à 95°C, 30s à la température d'hybridation définie et 30s à 72°C.

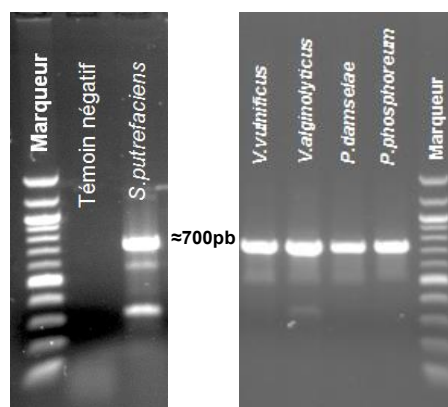


Figure 7-2 : Produits PCR obtenus après amplification par le couple de la publication de Duflos, Therau-laz, *et al.* (2010), d'ADN provenant de cinq souches bactériennes à une concentration finale de 3,5 µg.mL<sup>-1</sup>. Le cycle d'amplification correspond à une étape initiale de dénaturation de 30s à 94°C, puis 40 cycles composés de trois sous étapes : 30s à 94°C, 30s à 55°C et 45s à 72°C.

---

## Chapitre 2. Quantification du gène *torA* dans une matrice de poisson

Après avoir esquissé de potentielles limites aux méthodes microbiologiques, une seconde partie du travail concernant la flore d'altération s'est focalisée sur la quantification du gène *torA* dans une matrice de poisson par qPCR. Elle fait suite à l'approche amorcée par Dos Santos (1999) puis appliquée lors d'un suivi d'altération par Duflos, Theraulaz, *et al.* (2010). Ce projet a fait l'objet d'une étude préliminaire qui a été poursuivie par la sélection d'un couple d'amorces en incluant des séquences du genre *Vibrio*, qui possède également une OTMA réductase (Unemoto *et al.* 1965).

### I. Principaux résultats obtenus

#### 1. Etude préliminaire

Après récupération de séquences à l'aide de la plateforme KEGG (Kanehisa *et al.* 2012) ainsi que d'EMBL, vingt-cinq séquences ont été utilisées pour réaliser des alignements et dessiner des amorces dégénérées après recherche visuelle de zones consensus. Plusieurs couples d'amorces ont été dessinés (Tableau VII-I) et trois ont été sélectionnés pour réaliser des premiers travaux de caractérisation : dirtorAF1 x dirtorAR1 (380 pb), dirtorAF2 x dirtorAR1 (180 pb) et dirtorAF5 x dirtorAR3 (200 pb). Le couple dirtorAF5 x dirtorAR3 a montré des résultats encourageants pour quatre souches de *Vibrio* et *Photobacterium* (figure 7-1), cependant les efficacités calculées et gammes de concentration détectées pour ce couple n'étaient pas satisfaisantes. Ainsi, pour *V. vulnificus* l'efficacité était de 80,4 % pour une gamme de concentration allant de  $10^7$  à  $10^{10}$  UG.mL<sup>-1</sup>. Concernant *P. phosphoreum*, la gamme de concentrations détectée allait de  $10^9$  à  $10^{10}$  UG.mL<sup>-1</sup>, l'efficacité n'ayant pu être calculée.

Dans une seconde phase de cette étude préliminaire, le couple d'amorces utilisé par Duflos, Theraulaz, *et al.* (2010) (amorce sens : TWY GAR CGY AAC GAT MTC GA et amorce anti-sens : GGV YCR TAC CAB SCV CCT TC) a été également testé. Cependant, bien que le fragment de 700 pb ait été visualisé pour toutes les souches (figure 7-2), des bandes aspécifiques sont également apparues pour *S. putrefaciens* et *V. alginolyticus*. Ceci peut être expliqué par le nombre important de dégénérescences dans les amorces, respectivement 5 et 6. L'efficacité du couple d'amorces a pu être déterminée sur l'ADN de *V. vulnificus*, celle-ci est de 72% sur une gamme allant de  $10^6$  à  $10^{10}$  UG.mL<sup>-1</sup>. En outre, l'amorce dirtorAR6 est quasiment identique à l'amorce anti-sens, ce qui permet de proposer une amorce GGV CCR TAC CAB GCV CCT TC qui contiendrait moins de dégénérescences

#### 2. Développement de la méthode qPCR pour la quantification de *torA*

A l'issue de l'étude préliminaire, décision a été prise de repartir sur un nouveau travail de dessin d'amorces compte-tenu des résultats décevants. Afin de fiabiliser l'approche il a été convenu d'utiliser le plus souvent possible les outils informatiques : pour l'obtention des

données et pour améliorer la reproductibilité des opérations réalisées *in silico*. Ainsi la récupération de séquences a pu être réalisée à l'aide d'un algorithme écrit sous R ([Annexe 4](#)), la recherche d'amorces potentielles a été accomplie à l'aide du logiciel NRPS Primer développé par le laboratoire ProBioGEM (Lille, France) et enfin le criblage des amorces suggérées a pu être réalisé à l'aide d'un algorithme également codé avec le logiciel R ([Annexe 5](#)).

Les résultats obtenus au cours de l'approche développée ont fait l'objet d'un article scientifique disponible ci-dessous et soumis au journal *Food control*.

## Development of a qPCR method targeting *torA* gene and application for the freshness monitoring of modified atmosphere-packed chilled whiting (*Merlangius merlangus*).

Alexandre Dehaut<sup>a</sup>, Frédéric Krzewinski<sup>b</sup>, Thierry Grard<sup>c</sup>, Marlène Chollet-Imbert<sup>d</sup>, Philippe Jacques<sup>d</sup>, Anne Brisabois<sup>a</sup> & Guillaume Duflos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments – Département des Produits de la Pêche et de l’Aquaculture, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France

<sup>b</sup> Université de Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF - Bâtiment C9, 59650 Villeneuve d’Ascq, France

<sup>c</sup> Université du Littoral Côte d’Opale – Anses, Équipe Biochimie des Produits Aquatiques, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-mer, France

<sup>d</sup> Laboratoire Régional de Recherche en Agro-alimentaire et Biotechnologie : Institut Charles Viollette, Equipe ProBioGEM, Université de Lille1, Sciences et Technologies, Polytech’Lille, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d’Ascq, France

\*Corresponding author: E-mail: guillaume.duflos[at]anses.fr - Phone: +33 321 992 500 - Fax: +33 321 991 725

**The monitoring of early stages of freshness decay is a major issue for the fishery industry, to guarantee the best quality for this highly perishable food matrix. Numerous techniques have been developed, however most of them have the disadvantage to be either reliable in the last steps of fish freshness or for the analysis of whole fish. The present study describes the design and the characterization of a qPCR degenerate primers pair targeting *torA* gene harboured by numerous fish spoilage microorganisms. This gene encodes an enzyme that leads to the production of trimethylamine, responsible for the characteristic fishy off-flavour. The primer pair amplified *torA* gene of both *Vibrio* and *Photobacterium* with more than 90% efficiency on 7-log DNA dilutions. The primer pair was used during a shelf-life monitoring study achieved on modified-atmosphere packed, chilled, whiting (*Merlangius merlangus*) fillets. A clear decrease of Cq values was observed in the early stage of freshness, from 31.2 to 20.2, consequence of the increase *torA* gene copies number. Moreover Cq values have proven to be anti-correlated with both total volatile basic nitrogen (-0.86) and trimethylamine concentrations (-0.81), known as spoilage markers. Areas of improvement are discussed at the end of this article. This study thus described a very promising, sensitive, reliable, time-effective, technique in the field of freshness characterization of processed fish.**

**Keywords:** *torA*, qPCR, modified atmosphere-packed fish, freshness assessment

### 1. Introduction

The fish freshness state could be defined as the early phase of shelf-life. Concerning fishery products, a tight link exists between freshness and quality. Indeed, numerous studies established, using quality indicators, that the global quality of fish decreases with the increase of shelf-life (Cardenas Bonilla, Sveinsdottir, & Martinsdottir, 2007; Duflos, Leduc, *et al.*, 2010; Triqui & Bouchriti, 2003), while an increase of spoilage and/or pathogenic flora is recorded (Gram & Huss, 1996). Fish spoilage is the result of the variation of physical, biochemical and microbial parameters in the fish muscle. Spoilage flora is one of the major cause of the quality decay in fish products, responsible for the alteration of organoleptic properties (Gram & Huss, 1996; Olafsdottir, Jonsdottir, Lauzon, Luten, & Kristbergsson, 2005) and the production of hazardous molecules like biogenic amines (Visciano, Schirone, Tofalo, & Suzzi, 2012).

Generally, fish quality can be assessed thanks to a wide range of techniques like sensory, chemical or microbiological analyses (Hyldig, Martinsdóttir, Sveinsdóttir, Schelvis, & Bremner, 2010; Koutsouma-

nis, Giannakourou, Taoukis, & Nychas, 2002; Leduc, Tournayre, *et al.*, 2012; Malle & Tao, 1987).

Fishing industry is a sector in constant evolution, engaged in Europe, on the quality insurance process for nearly twenty years (The Commission of the European Communities, 1996, 2005a). This approach answered the will formulated by both consumers and professionals of this sector. Quality insurance in food and feed industry is a concept that includes many factors as food safety, freshness, nutritional composition, organoleptic properties; influenced by numerous parameters across the supply chain, as catching conditions, handling, processing and storage (Luten, 2003). The major issue is thus to develop tools in a way to improve quality control thanks to traceability, good manufacturing practices and laboratory analysis.

For a long time, quality of the fish was assessed in the fish industry thanks to well-trained panel of sensory analyses, but a loss of competence arose with the arrival of a new staff, very few experienced in fish quality assessment (Olafsdottir, *et al.*, 2004). Despite this evolution, sensory analysis remains one of the most accurate methods to assess fish freshness;

nonetheless it suffers from drawbacks like panel subjectivity and training cost or still unknown impact of environmental factors (Hyldig, *et al.*, 2010).

Chemical analysis can be routinely used for freshness estimation of fish, using total basic volatile nitrogen analysis (TVB-N). This technique is particularly adapted for species belonging to *Pleuronectidae*, *Merlucciidae* and *Gadidae* families and *Sebastes* spp., but it is more a rejection tool than a monitoring method, indeed, TVB-N analysis is usually described as unsuitable for the 10 first days of chilled storage (Huss, 1995). Rejection values were fixed regarding species categories with 35 mg of nitrogen/100 g of flesh defined as a maximum TVB-N value for *Gadidae* and *Salmo salar* (The Commission of the European Communities, 2005b). The major issue with TVB-N analysis remains that it can neither be used for freshness assessment of a large part of fish, commonly classified as fat fish such as *Scombridae*, *Clupeidae* or *Dicentrarchus labrax* (Castro, Padrón, Cansino, Velázquez, & Larriva, 2006), nor for freshness evaluation of processed fish.

The microbiology of fish is well documented (Dalgaard, 1995; Gram & Dalgaard, 2002; Gram & Huss, 1996) with knowledge on microbial ecology representing the entire flora observed on fish. Additionally two concepts have been defined: spoilage flora describing all species able to spoil a food matrix and specific spoilage organisms (SSO). SSO correspond to a tight part of the spoilage flora, active according to the conservation process, like *Shewanella putrefaciens* on iced marine fish and *Photobacterium phosphoreum* on CO<sub>2</sub> and modified-atmosphere packed (MAP) chilled fish (Gram & Dalgaard, 2002). Despite this knowledge, to date no microbial technique has been developed to routinely assess fish freshness, although a relatively selective and sensitive method exists (Dalgaard, Mejlholm, & Huss, 1996). The major drawback of such a technique remain that they are highly time consuming. Nonetheless one of the metabolite synthesized by SSO, trimethylamine (TMA), contributes to a characteristic “fishy” off-flavor of spoiled fish and can be considered as a fingerprint of the presence of SSO. Most of TMA production is the result of trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase (EC 1.6.6.9) activity (Czjzek, *et al.*, 1998) encoded by *torA* gene part of *tor* operon (Méjean, *et al.*, 1994). This gene is now well documented in the literature with numerous sequences available in databases, like GenBank and EMBL.

Thus the aim of this study was to explore a new field of investigations for fish freshness assessment slightly explored so far (Duflos, Theraulaz, Giordano, Mejean, & Malle, 2010; Giordano, Dos Santos, & Mejean, 2001). A qPCR method targeting *torA* gene, marker of specific spoilage flora was first developed. This method was then applied, additionally to routine freshness estimation methods, to a shelf-life study on modified

atmosphere-packed whiting (*Merlangius merlangus*) fillets, increasingly popular among fish consumers.

## 2. Material and Methods

### Bacterial strains and culture conditions

Five strains from the genus *Shewanella*, *Photobacterium* and *Vibrio*, preferentially originating from sea or sea products, were used for the optimisation of the quantitative PCR. *P. damsela* CIP 100540 recovered from Turbot (*Scophthalmus maximus*), *V. alginolyticus* CIP 109819 recovered from Turbot (*Scophthalmus maximus*) and *V. vulnificus* CIP 75.4 isolated from a blood sample were purchased at the Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (Paris, France). *S. putrefaciens* DSM 6067 isolated from tainted butter and *P. phosphoreum* DSM 2167 isolated from Hake (*Merluccius capensis*) was acquired at DMSZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Leibniz, Germany). Additional strains were used for a specificity study. Strains coming from Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (Paris, France) consisted of *V. cholerae* CIP 106974, *V. mimicus* CIP 101888, *V. fluvialis* CIP 103355, *V. metschnikovii* CIP 69.14, *V. harveyi* CIP 103192, *V. hollisae* CIP 104354, *V. furnisii* CIP 102972 and *V. nigripulchritudo* CIP 103195. *V. parahaemolyticus* CNRVC010089 was given by the French National Reference Centre for Vibrios and Cholera. Strains coming from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, United-States) consisted of *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. coli* ATCC 25922 and *S. enterica* ATCC 13076. Finally ten strains coming from the laboratory collection were also added to this specificity study. Four of these strains were previously isolated from a spoiled whiting (*Merlangius merlangus*) and identified as *Shewanella baltica* thanks to 16S rRNA and *gyrB* genes sequencing and MALDI-TOF analysis; the remaining six were previously isolated from different fish industry environments and were identified, thanks to 16S rRNA gene sequencing as *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Citrobacter gillienii*, *Serratia proteomaculans*, *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas fluorescens*.

All strains were grown in aerobic conditions. All *Vibrio* strains were grown on tryptone soya agar - yeast extract (TSA-YE) plates using Oxoid CM0131 base (Oxoid, Dardilly, France) complemented with NaCl 1,5 % (w/v) at 30°C for 24H. All *Photobacterium* and *Shewanella* strains were grown at the same conditions but the incubation temperature was lowered to 25°C. The six strains coming from the fish industry were incubated on TSA-YE plates at 30°C for 24H. Strains purchased at ATCC were grown on TSA-YE plates at 37°C for 24H, except *E. coli* that was grown at 44°C for 24H and *S. enterica* having been grown on nutritive agar from Biorad (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

### DNA extraction from pure culture

After basic controls of purity, observations of CFU on plates and Gram coloration, a loop of biomass was harvested on plates and prone to DNA extraction with the Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Courtaboeuf, France). Then, instructions provided by the manufacturer were followed except for the final step; RNase (Promega, Charbonnières-les-bains, France) was added after the lyses step at 56°C. As previously mentioned (Robert-Pillot, Copin, Gay, Malle, & Quilici, 2010), the final elution with AE buffer was split into two elutions of 50 µL in way to increase the DNA concentration of the eluate. Finally, DNA concentration was controlled with a DS-11 Spectrophotometer from Denovix (Wilmington, NC, USA). DNA purity of the samples was checked regarding the  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{260}/A_{230}$  ratio. DNA samples were conserved at +4°C for a maximum of one week. The day of analysis, all sample concentrations were set to a maximum concentration of 15 µg.mL<sup>-1</sup>, as required by Roche Diagnostic (Meylan, France) manufacturer of the qPCR master mix, and 10-fold DNA dilutions were achieved on 8-log scale, until 0.15 pg.mL<sup>-1</sup>.

### Design of degenerate oligonucleotides

Data concerning coding sequences of *torA* gene from the genus *Shewanella*, *Photobacterium* and *Vibrio* were retrieved from GenBank and EMBL using SeqinR package with R 3.0.0 (Charif & Lobry, 2007). Redundancy in the recovered sequences was checked using the non-redundant databases (NRDB) program (Gish, 2000) to avoid the presence of a sequence in duplicate in the dataset. This first step leads to the selection of 58 *torA* coding sequences comprising 9 sequences of *Shewanella*, 9 of *Photobacterium* and 40 of *Vibrio*. Two sets of suggested degenerate primers, forward and reverse, were obtained for each bacterial genus thanks to software developed by ProBioGEM laboratory (Lille, France). Briefly as described in a previous publication (Tapi, Chollet-Imbert, Scherens, & Jacques, 2010), after an alignment, this software

calculates the hybridization coefficient (HyC) reflecting the hybridization ability of the primer. To this end, size of the primers, HyC lower and upper limits were set as follows: 20 bp primers with HyC comprised between 1 and 32 to avoid non-specific hybridizations. The sets of primers were then screened with a personal algorithm in R 3.0.0 following usual prerequisites for the design of oligonucleotides (Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013). Retained primers were then tested against initial sequences with AmplifX v.1.6.2 (Jullien, 2013) and results were collected in an *ad hoc* database allowing an improved and secured dynamic confrontation of primer pairs and theoretical PCR products. Finally, primers selected after database consultation were submitted to Oligoanalyzer 3.1 program (Anonymous, 2008) to check their propensity to form secondary structures. The limit of primer dimer tolerance concerning binding energy was fixed as follows until -3 kcal/mol for hairpin and -5 kcal/mol in the 3' region and -6 kcal/mol in internal region of the primer for self and cross-dimer. In regard to the risk of cross-dimer formation, two angles of approaches have been used regarding both intraspecies cross-dimer (eg SF against SR) and interspecies cross-dimer (eg SF against PF, PR, VF and VR). The first letter of primer identifiers corresponds to the first letter of genus, eg. S for *Shewanella*, and the second letter, F or R, corresponds to the type of primer: forward or reverse. Once design and screening were achieved, desalted primers were synthesized by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### Amplification conditions

Amplifications were performed in a final volume of 20 µL using a LightCycler 480 system II from Roche Diagnostics (Meylan, France). 5 µL of template DNA was amplified with pairs of primers. The LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit from Roche Diagnostics (Meylan, France) was used with final concentration of primers comprised between 0.5 µM and 1 µM. DNA samples, primers and master mix were dispensed into

**Table 1: Nucleotide sequences of primers obtained from the first steps of primer design and sizes of the theoretical PCR products.**

ID <sup>a</sup>	Forward primers		ID	Reverse primers		Products sizes
	Sequences (5'-3') <sup>b</sup>	HyC <sup>c</sup>		Sequences (5'-3') <sup>a</sup>	HyC	
PF23	HCGTAAAGTNGATGAAGGTC	24	PR167	TCTTGRTGGTGRGTGCCAWGG	8	201 bp
			PR168	ATCTTGRTGGTGRGTGCCAWG	8	202 bp
SF140	ARGGYAARATCCGCGTGATC	8	SR36	KGAGTAGTGGTGACCATAGC	2	449 bp
			SR37	TKGAGTAGTGGTGACCATAG	2	450 bp
SF90	YGACTIONCMACMGGTGCAG	8	SR156	CCACAGGRTCKATRCTGATC	8	251 bp
SF224	YGGYATYAGCTATGGTCACC	8	SR154	ACAGGRTCKATRCTGATCAC	8	419 bp
			SR288	YGCCRTASACGTCGATATCG	8	414 bp
VF239	GCAAGTRGGTTGGAACGTGTG	2	VR353	CTCTTGACGYTGGATACACC	2	424 bp
			VR349	TGACGYTGGATACACCAACC	2	420 bp
			VR350	TTGACGYTGGATACACCAAC	2	421 bp
			VR419	TCTTGATGGTGGTGCCAWGG	2	369 bp
VF351	TTGGTGTATCCARCGTCAAG	2	VR572	RTCTTGATGGTGGTGCCAWG	4	370 bp
			VR536	GAATMGTRCGGCTGTAACCG	4	239 bp
VF203	CTGTRGGTATGCAYGGTAAC	4	VR240	TCACAGTCCAACCYACTTG	2	202 bp

<sup>a</sup> Primers identifiers. <sup>b</sup> Nucleotides sequences with degenerations indicated according to IUPAC nomenclature. <sup>c</sup> HyC values calculated according to the above mentioned reference (Tapi, *et al.*, 2010)



96-wells white microplates from Roche Diagnostics (Meylan, France). The initial denaturing step was carried out at 95°C for 10 min. The amplification cycle was 95°C for 30 s, annealing for 30 s and 72°C for 30 s. The cycle was repeated 45 times. Annealing temperatures of 62°C and 64°C were tested to avoid non-specific hybridization easily encountered with degenerate primers. Finally a melting curve was plotted from 60°C to 95°C with a slope of 0.11°C.s<sup>-1</sup>.

#### Post qPCR controls

At the end of qPCR, each PCR product, mixed with a drop of gel loading dye 6X (New England Biolabs, Evry, France), were deposited into the wells of a 1.2% agarose - Tris Buffer EDTA (Eurobio, Les Ulis, France) together with a 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, Evry, France). In some cases, PCR products were also sent to the genomics platform Genoscreen (Lille, France) where forward and reverse sequencing were achieved. Contig assembling of forward and reverse sequences were carried out using CAP3 algorithm (Huang & Madan, 1999; Perrière, 1996).

#### Preparation of modified atmosphere-packed fillets

Whiting (*Merlangius merlangus*) was chosen, because it was the fourth most consumed species in France in 2012 and the most convenient to achieve modified atmosphere-packed whole fillets. A number of 21 whole gutted whiting (*Merlangius merlangus*) was bought at a local fish wholesaler in Boulogne-sur-Mer (France), fish were issued from the morning auction to guarantee a better freshness grade. Fish were caught during spring, in north-east Atlantic and conditioned into insulated polystyrene box with ice. Fish were processed at the innovation platform *PFI-Nouvelles Vagues* (Boulogne-sur-Mer, France). The two fillets of one fish were skinned and placed in a unique container equipped with a piece of blotting paper. The 21 containers were successively placed in a T200 from Multivac (Lagny-sur-Marne, France) for modified atmosphere packing. Atmosphere modification was achieved thanks to vacuum creation, drop to 10 kPa, and injection of Aligal 15 gas, CO<sub>2</sub> (50%) and N<sub>2</sub> (50%), to a pressure of 90 kPa, finally containers were thermally sealed with a plastic film. Containers were then placed in a Binder climatic chamber (Tutlingen, Germany) at 1 ± 1°C throughout the shelf-life study. The day of fillets preparation was considered as day 1 of the study.

#### Fish shelf-life assessment

Application of the qPCR method was carried out for the assessment of modified atmosphere-packed, whiting fillets throughout shelf-life. Three containers, corresponding each to a unique fish, were retrieved from the climatic chamber at days 1, 3, 6, 8, 10, 13 and 15. qPCR analysis was achieved on each container as described below and simultaneously, total via-

ble count (TVC), total volatile basic nitrogen (TVB-N) and trimethylamine (TMA) assays by steam distillation were carried out serving as a reference for monitoring the overall microbial load and freshness grade of fillets. TVC, TVB-N and TMA measurement methods were performed as previously reported (Leduc, Krzewinski, *et al.*, 2012).

#### Fillets preparation for analyses

The process described below was the same for each container. Container was opened under sterile conditions and the two fillets were cut in approximately 1 cm edge cubes that were mixed to obtain a representative matrix of the overall state of fish flesh. 25 g of flesh cubes mix were reserved for microbiological and molecular analysis and 100 g for TVB-N/TMA assays. Concerning molecular analysis, 2 mL of the filtrate of the sample 10-fold dilution in buffered peptone water solution were distributed in cryotubes and conserved in liquid nitrogen until DNA extractions, achieved for all samples five days after the 15<sup>th</sup> day of shelf-life. Before DNA extraction, 1.5 mL of the filtrate was centrifuged at 5000 g for 10 min. The supernatant was then eliminated and extraction was achieved on the pellet as previously described. PCR amplification was carried out as described in a previous paragraph with primer concentrations of 1 µM and an annealing temperature of 62°C.

### 3. Results and Discussion

#### Degenerate primer design and selection *in silico*

The first step of primer design, involving the HyC calculation leads to the selection of lists of potential forward and reverse primers for each bacterial genus. Thus 663, 976 and 28 forward and reverse primers were suggested from the alignment of *torA* sequences of *Vibrio* for HyC values ranging respectively from 1 to 3, 2 to 16 and 16 to 32. Concerning *Shewanella*, 68, 465 and 13 forward and reverse primers were highlighted by the software for the same range of HyC values. Regarding *Photobacterium torA* gene sequences alignment, respectively 369 and 26 forward and reverse primers were found for HyC values ranging from 2 to 16 and 16 to 32; by contrast no potential primer were found with HyC values comprised between 1 and 3. The following screening using R software allowed to considerably reducing the lists of potential primers, with a percentage of primer suppression between 88.2% and 95.7%, depending on the lists.

Utilization of AmplifX software has permitted to find more than 13600 potential amplicons (from 100 to 700 bp) among the 58 *torA* gene coding sequences used for primer designing, with the reduced list of primers elaborate with the screening step previously presented. Database set up allow to consign all the potential amplicons and to facilitate the selection process. A first list of primers suitable for the study of

secondary structure formation risk was established (Table 1) based on their ability to theoretically gives PCR products in a majority of the 58 *torA* gene coding sequences.

None of the primers displayed in Table 1 presented a risk of hairpin formation, nonetheless six primers: SF140, SF90, PR167, SR288, VR419 and VR536 showed a self-dimer formation risk. At this stage, for each species the two most promising pairs respectively PR23xPR167, PF23xPR168, SF34xSR288, SF140xSR36, VF239xVR353 and VF351xVR572 were conserved to further investigations. Regarding cross-dimer formation risk, for the intra-species primer pairs among the pairs present in Table 1, only SF34 x SR288 is able to produce a dimer with a binding energy of -9.06 kcal/mol. Concerning inter-species cross-dimer, PF23 led to secondary structure formation with VF351 et VR353, PR167 is able to form cross-dimer with SF34 and SF140, SF34 risk to form secondary structures with VR572. Due to the high risk of cross-dimer formation, the multiplex approach was reconsidered and the study was focused on a genus specific primer pair selection.

#### In vitro characterization of primer pairs

In a first step, each primer of the above mentioned promising pairs was screened *in vitro* for their ability to auto-amplify in the qPCR conditions, using melting

curve as marker of dimer formation (data not shown). This step leads to the exclusion of three primer pairs before to further experiments. PR23xPR167, SF34xSR288 and VF351xVR572 were thus discarded as a clear peak appeared in the melting curves of PR167, SR288 and VR572. Although other pairs were conserved it was noted that PR168 and SF240 have to be used at a final concentration of 0.5 µM because of secondary structure formation at 1 µM. Among the *in vitro* screened pairs, PF23xPR168 displayed the expected PCR product at 200 bp for *P. phosphoreum* and *P. damselae*, unfortunately more than ten different and aspecific bands were observed for *Shewanella* and *Vibrio* species. Similarly, SF140xSR36 gave poor results for each species with numerous and non-specific bands and absence of PCR product at the expected size of 450 bp. More interestingly, at 1 µM VF239xVR353 gave a single band at the expected size of 420 bp for *Vibrio* and *Photobacterium* genus (Table 2), a unique band was also observed for *S. putrefaciens* but at a smaller size. After this first *in vitro* characterization VF239xVR353 was the unique pair selected to achieve qPCR conditions adjustments, sensitivity and efficiency test.

#### Primers pairs efficiency, qPCR conditions adjustments and sensitivity

The efficiency and the sensitivity of the VF239xVR353

**Table 2: Results of qPCR with VF239 x VR 353 primers pair, gel electrophoresis and sequencing obtained from all the strains used for the specificity test.**

Strains	Mean Cq <sup>a</sup>	Band at the expected size <sup>b</sup>	Aspecific bands	Sequencing results <sup>c</sup>
<i>V. cholerae</i> CIP 106974	10.98 ± 0.02	Yes	No	100 % identity with <i>V. cholerae</i> IEC224 <i>torA</i> gene
<i>V. parahaemolyticus</i> CNRVC 010089	11.77 ± 0.03	Yes	No	99% identity with <i>V. parahaemolyticus</i> VP2007-007 <i>torA</i> gene
<i>V. alginolyticus</i> CIP 109819	11.11 ± 0.00	Yes	No	99% identity with <i>V. alginolyticus</i> 40B <i>torA</i> gene
<i>V. vulnificus</i> CIP 75.4	11.26 ± 0.12	Yes	No	97% identity with <i>V. vulnificus</i> CMCP6 <i>torA</i> gene
<i>V. mimicus</i> CIP 101888	10.93 ± 0.01	Yes	No	99% identity with <i>V. mimicus</i> VM573 <i>torA</i> gene
<i>V. fluvialis</i> CIP 103355	13.98 ± 0.01	Yes	No	96 % identity with <i>V. furnissii</i> NCTC 11218 <i>torA</i> gene
<i>V. metschnikovii</i> CIP 69.14	34.22 ± 0.05	Yes	Yes	No sequencing
<i>V. harveyi</i> CIP 103192	11.94 ± 0.01	Yes	No	99% identity with <i>V. harveyi</i> ATCC BAA-1116 <i>torA</i> gene
<i>V. hollisae</i> CIP 104354	29.55 ± 0.06	Yes	Yes	No sequencing
<i>V. furnissii</i> CIP 102972	12.92 ± 0.01	Yes	No	98 % identity with <i>V. furnissii</i> NCTC 11218 <i>torA</i> gene
<i>V. nigrilichtrido</i> CIP 103195	11.44 ± 0.01	Yes	No	88 % identity with <i>V. cholerae</i> IEC224 <i>torA</i> gene
<i>P. damselae</i> CIP 100540	13.26 ± 0.11	Yes	No	98 % identity with <i>P. damselae</i> CIP 102761 <i>torA</i> gene
<i>P. phosphoreum</i> DSM 2167	12.20 ± 0.07	Yes	No	99 % identity with <i>P. phosphoreum</i> ANT 220 <i>torA</i> gene
<i>S. putrefaciens</i> DSM 6067	36.52 ± 0.11	No	Yes	No sequencing
<i>S. baltica</i> 14LSABSM1SHW	30.89 ± 0.01	Yes	Yes	90 % identity with <i>S. baltica</i> BA 175 <i>torA</i> gene
<i>S. baltica</i> 14LSABSM2SHW	33.50 ± 0.24	Yes*	Yes	80 % identity with <i>S. baltica</i> OS 185 <i>torA</i> gene
<i>S. baltica</i> 14LSABSM3SHW	32.15 ± 0.02	Yes*	Yes	No identification
<i>S. baltica</i> 14LSABSM4SHW	32.07 ± 0.21	Yes*	Yes	73% identity with <i>V. vulnificus</i> MO6-24 <i>torA</i> gene
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	34.18 ± 0.53	Yes	No	75% identity with <i>V. vulnificus</i> CMCP6 <i>torA</i> gene
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	37.54 ± 0.73	No	No	No sequencing
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	36.65 ± 0.93	No	No	No sequencing
<i>E. coli</i> ATCC 25922	29.68 ± 0.15	No	Yes	No sequencing
<i>S. enterica</i> ATCC 13076	34.91 ± 1.00	Yes	Yes	98 % identity with <i>S. enterica</i> CT18 hypothetical protein
<i>C. maltaromaticum</i>	37.83 ± 0.36	No	No	No sequencing
<i>C. divergens</i>	34.92 ± 0.25	Yes	No	96 % identity with <i>V. vulnificus</i> CMCP6 <i>torA</i> gene
<i>C. gilleni</i>	31.16 ± 0.20	Yes	Yes	93 % identity with <i>S. baltica</i> BA175 <i>torA</i> gene
<i>S. proteomaculans</i>	32.82 ± 0.01	No	Yes	No sequencing
<i>P. agglomerans</i>	17.84 ± 0.22	No	Yes	No sequencing
<i>P. fluorescens</i>	34.01 ± 0.09	No	Yes	No sequencing

<sup>a</sup> Mean of Cq values recorded for duplicate measures, for 75 ng of template DNA. <sup>b</sup> Existence of a band close by the expected size of 420 bp, values tagged with an asterisk highlight a weak signal of the band. <sup>c</sup> Percentage of identification achieved thanks to BLAST; "no sequencing" is either marked for strains displaying no band at the expected size, or for band not sequenced because of the presence of another band close by; "no identification" refers to a highly weak band that did not allow to recover enough material after extraction.

**Table 3: Data of standard curves obtained from the four *Vibrio* and *Photobacterium* species. Two temperature values and two primer concentration were tested.**

		0,5 µM		1 µM	
		62°C	64°C	62°C	64°C
<i>P.phosphoreum</i>	Slope <sup>a</sup>	-3.6794	-3.8335	-3.5118	-3.5387
	Intercept <sup>a</sup>	39.1	41.4	37.3	38.4
	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>	0.999	0.998	0.998	0.998
	Efficiency <sup>b</sup>	87.0 %	82.3 %	92.6 %	91.7 %
<i>P.damselae</i>	Slope <sup>a</sup>	-3.6152	-3.8125	-3.5422	-3.6314
	Intercept <sup>a</sup>	38.6	40.0	37.8	38.8
	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>	0.996	0.996	0.998	0.999
	Efficiency <sup>b</sup>	89.1 %	82.9 %	91.6 %	88.5 %
<i>V.vulnificus</i>	Slope <sup>a</sup>	-3.8015	-4.0299	-3.5123	-3.7739
	Intercept <sup>a</sup>	39.2	41.2	37.1	38.5
	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>	0.999	0.994	0.993	0.999
	Efficiency <sup>b</sup>	83.3 %	77.1 %	92.6 %	84.1 %
<i>V.alginolyticus</i>	Slope <sup>a</sup>	-3.7382	-3.9787	-3.5026	-3.8101
	Intercept <sup>a</sup>	38.1	40.1	36.7	38.5
	R <sup>2</sup> <sup>a</sup>	0.999	0.995	0.996	0.999
	Efficiency <sup>b</sup>	85.1 %	78.4 %	93.0 %	83.0 %

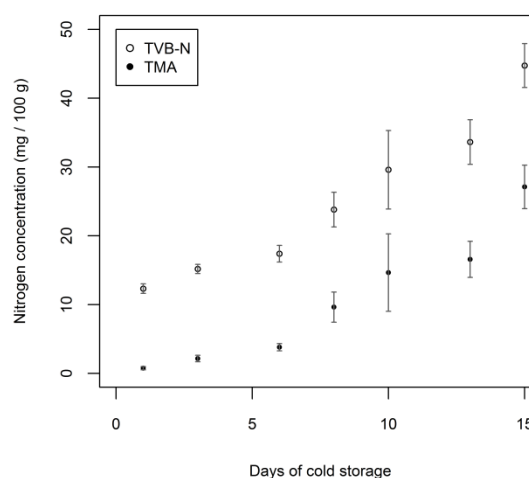
<sup>a</sup> Values were obtained from four replicates on 7 log DNA dilutions ranging from 75 ng to 75 fg of template DNA in the tube. <sup>b</sup> efficiency was calculated with the formula given by European Network of GMO testing (European Network of GMO Laboratories, 2008).

pair was assessed by amplifying 10-fold dilutions of DNA extracts of *P. phosphoreum*, *P. damsela*, *V. vulnificus* and *V. alginolyticus*. Results obtained from two primers concentration and annealing temperatures are figured on **Table 3**. Among all the above mentioned conditions, the R<sup>2</sup> values were higher than 0.99 from 75 ng to 75 fg of template DNA. A special care was paid to target DNA quality and only fresh DNA extraction were used for qPCR analysis, in fact when frozen thawed DNA samples have been used, a Cq drift was observed for the higher diluted samples (data not shown). The conditions giving the best amplification efficiency were 62°C for annealing temperature with primers concentrations of 1 µM. The mean efficiency were respectively 92.6%, 91.6%, 92.6% and 93.0% for *P. phosphoreum*, *P. damsela*, *V. vulnificus* and *V. alginolyticus*. The estimated limit of detection of the primer pair is around 75 fg of template DNA, as it was the last dilution where clear differences was observed (data not shown) from the non-template control (NTC) Cq, ranging from 34 to 38 in regard to the different parameters above mentioned.

### Primers pairs selectivity

Results of the selectivity test are showed on **Table 2**. Selectivity approach led to the confirmation that VF239xVR353 is able to give a unique PCR product, corresponding to a region of *torA* gene, for a wide range of *Vibrio* species, only two species among the eleven tested giving more than one PCR product. Moreover Cq values ranging from 10.98 ± 0.02 for *V. mimicus* to 13.98 ± 0.01 for *V. fluvialis* were recorded for 75 ng template DNA and led to extrapolate that primer pair should have a good efficiency for this species. For the rest of the tested species, recorded Cq values were higher than 30, except for *E. coli* and *P. agglomerans*. Concerning *S. putrefaciens* and *S.*

*baltica*, no single PCR product pattern was observed. *S. putrefaciens* showed no band in the neighbourhood of 400 bp, however *S. baltica* despite three different patterns among the four strains always displayed a band of approximately 400 bp identified as part of *torA* gene. For the remaining strains, only *B. subtilis*, *S. enterica*, *C. divergens* and *C. gilleni* displayed a band in the neighbourhood of 400 bp. Except for *S. enterica*, these PCR products displayed good identities with *torA* sequences of *V. vulnificus* and *S. baltica* suggesting that these species might harboured *torA* close-related genes. *E. coli* and *P. agglomerans* displayed huge band at sizes different from 400 bp with respective Cq values of 29.68 ± 0.15 and 17.84 ± 0.22. Finally, *S. aureus*, *S. epidermidis* and *C. maltaromaticum* showed no distinct band on the gel electrophoresis.



**Figure 1: Evolution of TVB-N and TMA concentrations, expressed in nitrogen mg per 100g of flesh, throughout the shelf-life of fish. Values represent the mean of duplicate measurements assessed on three fish samples and error bars illustrated 95% confidence intervals (2 S.E).**

### Application on fish shelf-life assessment

After optimisation steps with pure DNA samples, qPCR methods was applied, with other freshness estimation methods, in the course of a shelf-life study on MAP whiting fillets. Throughout the study, TMA and TVB-N measurements constantly increased with a slow phase from day 1 to day 6 and a more consequent increase from day 6 to day 15 (**Figure 1**). Additionally, it has been noted that these variables are highly correlated ( $r=0.99$ ;  $p$ -value < 0.001). Regarding TVB-N analysis, the first fillet unsuitable for human consumption was analysed at day 10. In the following days the number of fish evaluated, unfit for consumption, increased with two on three at day 13 and the totality of fillet at day 15. These results suggest that the limit of consumption of chilled MAP whiting fillets should be comprised, in this study, between 10 and 13 days. TVB-N showed a slight increase throughout shelf-life compared to fish conserved on melting ice. Ambivalent opinions exist on the use of TVB-N assay for shelf-life monitoring of MAP fish. Some authors

**Table 4: Evolution of total viable count (CFU log / g) of modified-atmosphere packed whiting fillets, throughout the shelf-life on cold storage.**

	Fish 1	Fish 2	Fish 3
Day 1	4,81	4,87	5,15
Day 3	5,08	5,08	5,23
Day 6	5,46	5,41	6,11
Day 8	5,11	4,81	5,18
Day 10	5,11	5,43	5,43
Day 13	4,90	4,56	4,97
Day 15	4,64	4,56	4,78

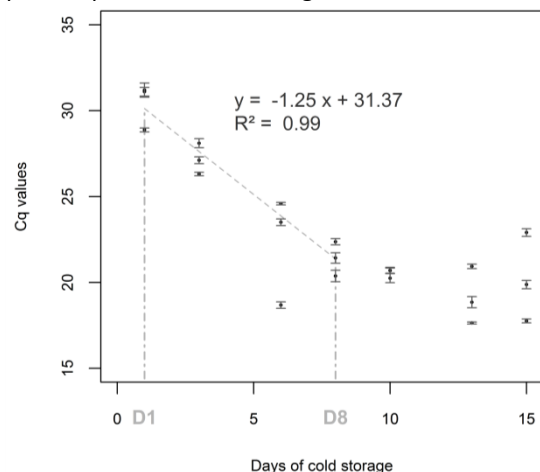
Values figured above were calculated according to ISO standard 7218:2007 (International Organization for Standardization, 2007)

indicated that MAP had no effect on TVB-N and TMA values (Fagan, Gormley, & Uí Mhuircheartaigh, 2004). For others, it seems not to be a suitable spoilage indicator in the case of MAP fish, as still low TVB-N values may be recorded after rejection of sensory analysis (Sivertsvik, Jeksrud, & Rosnes, 2002). Currently no sensory analysis has been developed for the evaluation of the studied matrix; nonetheless such a method should be developed in following studies, to better estimate the limit of consumption. TVC study led to non-workable results (Table 4). Indeed, the average evolution tended to increase between day 1 and day 6 at which the maximum counts were recorded and decreased until day 15, where the lower count of the shelf-life study were obtained. Regarding qPCR approach, application of VF239xVR353 pair to fish samples gave encouraging results (Figure 2) with a clear decrease of Cq values from 31.2 at day 1 to 20.2 at day 10. For day 13 and day 15 some lower Cq values were recorded, but these are marked with heterogeneity among the three fish fillets analyzed. Additionally, an abnormally low value was recorded at day 6 that remains unexplained as no atypical value was recorded in TVB-N / TMA assays; this data was discarded for the following explications. Based on average values a good linearity of the signal was observed from day 1 to day 8 ( $R^2=0.99$ ). Moreover, encouraging correlation was calculated ( $r = -0.86$ ;  $p$ -value  $< 0.001$ ) from day 1 to day 13 between the freshness grade indicator (TVB-N) and Cq values, this correlation is even improved in the early phase of storage within day 1 and day 6 ( $r = -0.96$ ;  $p$ -value  $< 0.001$ ). Concerning TMA concentrations, coming from the metabolism of *torA* gene harbouring microorganisms, similar observations were made with respective correlation coefficients of  $-0.81$  ( $p$ -value  $< 0.001$ ) and  $-0.94$  ( $p$ -value  $< 0.001$ ). The heterogeneity of Cq values observed at each days was not clearly explained in this experiment, although a heterogeneous initial quality of whiting could be hypothesized, as this study was carried out on wild fish. A tendency of signal stabilisation was observed from day 10 which could mark the stationary phase of spoilage flora growth, explaining the increase of TMA while no significant evolution of Cq values is observed.

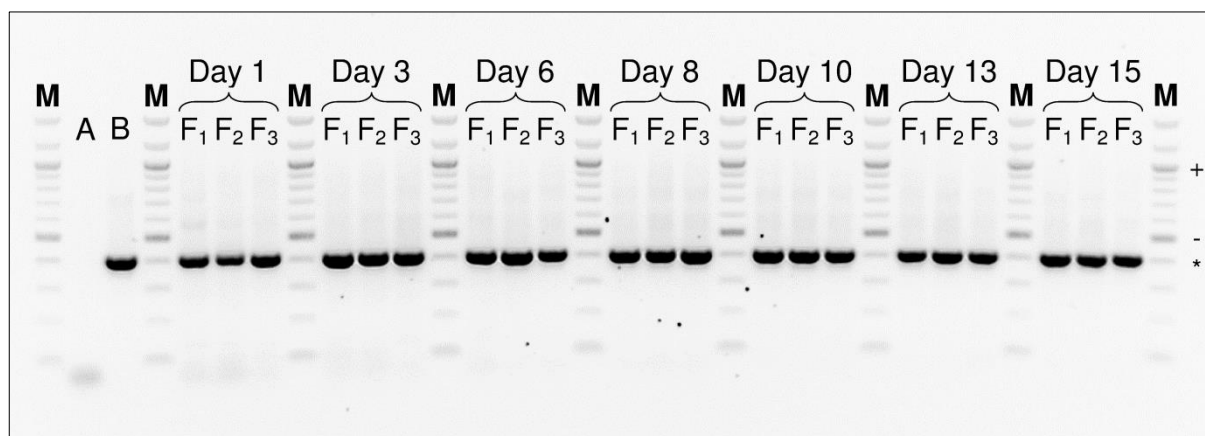
PCR products were controlled on gel electrophoresis (Figure 3) that highlighted a band of strong intensity

at the expected size, situated in the neighbourhood of 400 bp for all days of shelf-life assessment. It should be mentioned that at day 1, additional slight bands are observed for fish 1.

In some case, sequencing gave double sequences with a clear principal sequence signal and another low secondary signal. Systematic manual control of the chromatograms allowed avoiding secondary signal problems. From day 1 to day 3, sequencing led to only 76% to 89% similarity with *P. phosphoreum* DSM 2167 *torA* gene partial sequence. Sequencing results showed that PCR products obtained from spoiling whiting from day 6 to day 15 shared between 89% and 91% identity with *P. phosphoreum* DSM 2167 *torA* gene partial sequence amplified by VF239xVR353. All the PCR products displayed nucleotide sequences very close to each other, with identity percentage ranging from 97% to 100%. The above mentioned results led to hypothesize that a unique *P. phosphoreum* population outgrow microbial flora and was at the origin of *torA* gene quantities increase between day 6 and day 15, confirming previous observation on the specific spoilage organism in MAP fish. Thus, double sequences recorded mostly in the early phase of shelf-life would be explained by more than a single microbial species harbouring *torA* gene. Further development should be achieved to secure observed results. New amplification protocols using, for example, touchdown qPCR that previously proved to improve the specificity (Wunderlichová, Buňková, Koutný, Valenta, & Buňka, 2013) should be tested. Moreover, as very few degeneration are present into the primers, substitution by regular primers should be tested to assess the impact on degenerate primers on specificity. Together with the previous remark, a new primer pair should be designed for *Shewanella* spe-



**Figure 2: Evolution of Cq values obtained after qPCR amplification of fish fillet DNA extracts, with VR239 x VR353 primers pair throughout the shelf-life study. Values represent the mean of quadruplicate measurements assessed for each fillet DNA extract and error bars illustrated 95% confidence intervals (2 S.E). The grey dashed line corresponds to the regression line obtained with the average values from day 1 to day 8, the atypical value at day 6 being discarded.**



**Figure 3:** Gel electrophoresis achieved with PCR products amplified from fillets DNA extracts. M tagged tracks correspond to molecular size marker. A and B lanes respectively correspond to the non-target control and a positive control consisting of *P.phosphoreum* DNA extract. At each day, the three fish fillets (F1, F2 and F3) PCR products are figured. The symbols "+", "-" and "\*" respectively correspond to band sizes of 1000 bp, 500 bp and 400 bp.

cies in a way to develop multiplex approach quantifying all types of fish SSO. Results presented in **Figure 2** are absolute values and a way to normalize data should be developed for future monitoring studies in a way to reduce variability generated by all manipulations steps. A special care should also be taken to evaluation of matrix effect and implementation of controls such as samples process control, negative sample process control to secure the analyses of results (Rodríguez-Lázaro, *et al.*, 2007). In light of the above mentioned Cq values, the number of amplification cycles could be confidently reduced to 30, thereby reducing the analysis time. As a consequence, the use of an internal amplification control (IAC) and its integration to the qPCR mix should be considered. Indeed IAC has proven to be a good tool to go further in the interpretation of negative results allowing distinction of the true negative results from false negative results resulting from PCR inhibition (Cook, de Ridder, D'Agostino, & Taylor, 2013).

#### 4. Conclusions

A careful step of primer elaboration and *in silico* control, using various softwares, allowed securing the design process. A single pair of primers was selected and enabled to amplify a region of *torA* gene for both *Vibrio* and *Photobacterium*. Application for fish shelf-life monitoring highlights encouraging results in the field of food control and fish freshness assessment. To date, this work is the second using qPCR approach to assess fish freshness and conclusions are consistent. Concerning Cq values a decrease was recorded together with the increase of shelf-life and is correlated with both TVB-N and TMA evolution. A highly possible outgrowth of *P. phosphoreum*, specific spoilage flora was highlighted from day 6. The developed qPCR method is easily applicable in routine food control, allowing confidently analysis of almost 30 samples within a working day, confirmation on gel non-included. That time can be decreased in case of the use of automation devices for DNA quantification or

automated PCR preparation. Introduction of new controls are required to secure results obtained and further data are now mandatory to confirm the above mentioned Cq value evolution. Finally application of this qPCR technique has to be tested for other storage conditions and other fish species to assess the portability of the method.

#### 5. Acknowledgments

Authors wanted to thank Sabine Debuiche, Sylvie Degremont, Charlotte Himer and Virginie Ragueneau for their kind technical assistance throughout shelf-life assessment, Bruno Le Fur and Mathieu Volz from innovation platform *PFI-Nouvelles Vagues* and Marie-Laure Quilici (CNRVC) for providing us the *Vibrio parahaemolyticus* strain. Alexandre Dehaut is grateful to the Nord-Pas de Calais Regional Council (France) and Anses for providing financial support for his PhD studies.

#### 6. Abbreviations

Cq: Cycle quantification, HyC: Hybridization coefficient, IAC: Internal amplification control, MAP: Modified-atmosphere packed, SSO: Specific spoilage organisms, TMA: Trimethylamine, TMAO: Trimethylamine N-oxide, TSA-YE: Tryptone soya agar - yeast extract, TVB-N: Total basic volatile nitrogen, TVC: Total viable count.

#### 7. References

- Anonymous. (2008). Oligoanalyzer 3.1 by Integrated DNA Technologies, Inc (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>, accessed Sept., 2013).
- Cardenas Bonilla, A., Sveinsdottir, K., & Martinsdottir, E. (2007). Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control*, 18(4), 352-358.
- Castro, P., Padrón, J. C. P., Cansino, M. J. C., Velázquez, E. S., & Larriva, R. M. D. (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control*, 17

- (4), 245-248.
- Charif, D., & Lobry, J. R. (2007). SeqinR 1.0-2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. In *Structural approaches to sequence evolution* (pp. 207-232): Springer.
- Cook, N., de Ridder, G. A., D'Agostino, M., & Taylor, M. B. (2013). Internal Amplification Controls in Real-time Polymerase Chain Reaction-based Methods for Pathogen Detection. In *Real-time PCR in Food Science Current Technology and Application* (pp. 35-42): Caister Academic Press.
- Czjzek, M., Dos Santos, J.-P., Pommier, J., Giordano, G., Méjean, V., & Haser, R. (1998). Crystal structure of oxidized trimethylamine-oxide reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 284(2), 435-447.
- Dalgaard, P. (1995). Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 305-317.
- Dalgaard, P., Mejlholm, O., & Huss, H. H. (1996). Conductance method for quantitative determination of *Photobacterium phosphoreum* in fish products. *Journal of Applied Microbiology*, 81(1), 57-64.
- Duflos, G., Leduc, F., N'Guessan, A., Krzewinski, F., Kol, O., & Malle, P. (2010). Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15), 2568-2575.
- Duflos, G., Theraulaz, L., Giordano, G., Mejean, V., & Malle, P. (2010). Quantitative PCR Method for Evaluating Freshness of Whiting (*Merlangius merlangus*) and Plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Food Protection*, 73(7), 1344-1347.
- European Network of GMO Laboratories. (2008). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing.
- Fagan, J., Gormley, T. R., & Uí Mhuircheartaigh, M. (2004). Effect of modified atmosphere packaging with freeze-chilling on some quality parameters of raw whiting, mackerel and salmon portions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(2), 205-214.
- Giordano, G., Dos Santos, J.-P., & Mejean, V. (2001). Nucleotide sequences derived from genes coding for trimethylamine n-oxide reductase, uses thereof in particular for detecting bacteria. Institut National de la Propriété Industrielle. In (Patent WO/2001/020030 ed.). France.
- Gish, W. (2000). Non-redundant databases (NRDB) (<http://pubmlst.org/analysis/>, accessed May, 2013).
- Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria - problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262-266.
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 121-137.
- Huang, X., & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*, 9(9), 868-877.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO fisheries technical paper*(348).
- Hyldig, G., Martinsdóttir, E., Sveinsdóttir, K., Schelvis, R., & Bremner, A. (2010). Quality index Methods. In L. M. L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis* (pp. 463-480): CRC Press.
- International Organization for Standardization. (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations (EN ISO 7218).
- Jullien, N. (2013). Amplifix 1.6.2 by Nicolas Jullien (<http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>, accessed May, 2013).
- Koutsoumanis, K., Giannakourou, M., Taoukis, P., & Nychas, G. (2002). Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2), 375-382.
- Leduc, F., Krzewinski, F., Le Fur, B., N'Guessan, A., Malle, P., Kol, O., & Duflos, G. (2012). Differentiation of fresh and frozen/thawed fish, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*), using volatile compounds by SPME/GC/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12), 2560-2568.
- Leduc, F., Tournayre, P., Kondjoyan, N., Mercier, F., Malle, P., Kol, O., Berdagué, J. L., & Duflos, G. (2012). Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry*, 131(4), 1304-1311.
- Luten, J. B. (2003). Introduction to and outcome of the Concerted Action 'Fish Quality Labelling and Monitoring'. In J. B. Luten, J. Oehlenschläger & G. Olafsdottir (Eds.), *Quality of Fish from Catch to Consumer - Labelling, Monitoring and Traceability* (pp. 33-42). Wageningen, Nederland: Wageningen Academic Publisher.
- Malle, P., & Tao, S. (1987). Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *Journal of Food Protection*, 50, 756-760.
- Méjean, V., Iobbi-Nivol, C., Lepelletier, M., Giordano, G., Chippaux, M., & Pascal, M.-C. (1994). TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the *tor* operon. *Molecular microbiology*, 11(6), 1169-1179.
- Olafsdottir, G., Jonsdottir, R., Lauzon, H. L., Luten, J., & Kristbergsson, K. (2005). Characterization of Volatile Compounds in Chilled Cod (*Gadus morhua*) Fillets by Gas Chromatography and Detection of Quality Indicators by an Electronic Nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10140-10147.

- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S. V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A., & Jørgensen, B. M. (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 86-93.
- Perrière, G. (1996). CAP3 Sequence Assembly Program. (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>, accessed April, 2014).
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P., & Quilici, M. L. (2010). Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 190-197.
- Rodriguez-Lazaro, D., & Hernandez, M. (2013). Real-time PCR in Food Science: Introduction. In *Real-time PCR in Food Science Current Technology and Application* (pp. 3-19): Caister Academic Press.
- Rodríguez-Lázaro, D., Lombard, B., Smith, H., Rzezutka, A., D'Agostino, M., Helmuth, R., Schroeter, A., Malorny, B., Miko, A., & Guerra, B. (2007). Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends in Food Science & Technology*, 18(6), 306-319.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W. K., & Rosnes, J. T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products—significance of microbial growth, activities and safety. *International journal of food science & technology*, 37(2), 107-127.
- Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B., & Jacques, P. (2010). New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1521-1531.
- The Commission of the European Communities. (1996). Council Regulation (EC) N° 2406/96 laying down common marketing standards for certain fishery products. *Off. Journ. of Eur. Union*, L334.
- The Commission of the European Communities. (2005a). Commission Regulation (EC) n°790/2005 of 25 May 2005 amending Council Regulation (EC) No 2406/96 laying down common marketing standards for certain fishery products. *Off. Jour. of EU*, L132.
- The Commission of the European Communities. (2005b). Council Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004. *Off. Journ. of Eur. Union*, L338, 36.
- Triqui, R., & Bouchriti, N. (2003). Freshness Assessments of Moroccan Sardine (*Sardina pilchardus*) : Comparison of Overall Sensory Changes to Instrumentally Determined Volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7540-7546.
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2012). Biogenic Amines in Raw and Processed Seafood. *Frontiers in microbiology*, 3(188).
- Wunderlichová, L., Buňková, L., Koutný, M., Valenta, T., & Buňka, F. (2013). Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food microbiology*, 34(2), 268-276.

## II. Contribution de l'approche et perspectives

L'étude décrite au cours de ce chapitre a permis de développer une méthode de qPCR basée sur la détection des microorganismes porteurs du gène *torA* au sein de poisson en cours d'altération.

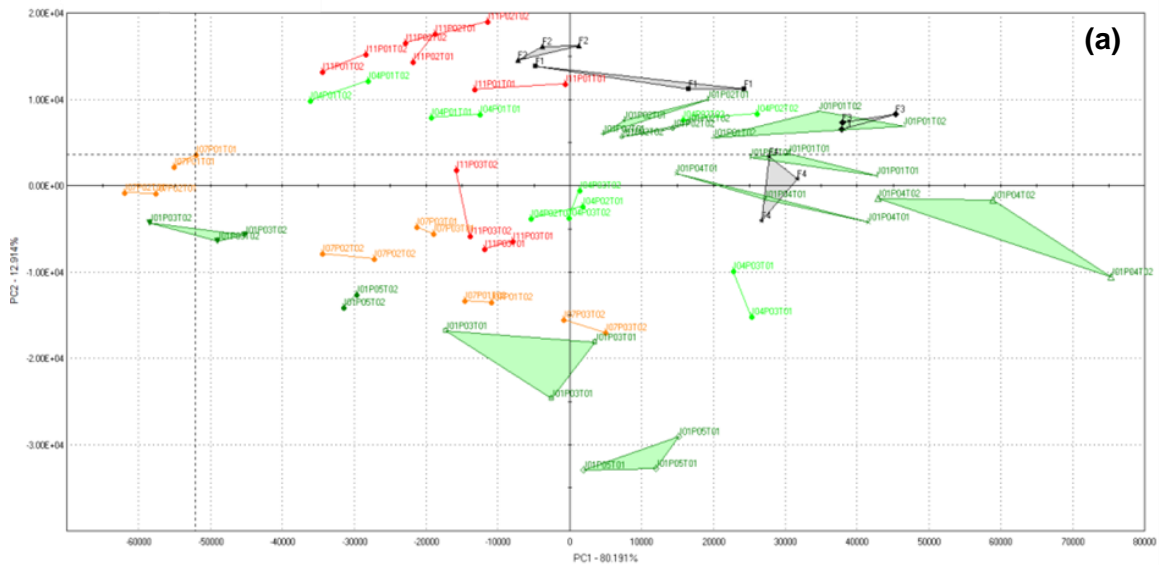
Le travail *in silico* de dessin des amorces a permis à l'aide d'outils plus récents et surtout de données plus conséquentes de sélectionner un couple d'amorces avec un nombre de dégénérescences drastiquement réduit par rapport à celui utilisé dans une précédente étude. Ce faible nombre de dégénérescences, une dans chacune des amorces de la paire, laisse même penser qu'elles pourraient être remplacées par des nucléotides non dégénérées de façon à augmenter la spécificité du couple.

Le couple d'amorces sélectionné est très prometteur, il a permis d'obtenir un signal décroissant et linéaire ( $R^2=0,99$ ) dès les premiers jours d'altération du poisson reflétant ainsi l'augmentation de la quantité du gène *torA* au sein de la matrice étudiée. Cette augmentation du nombre de copies du gène *torA* sous-tend l'augmentation du risque d'altération du poisson. En effet une conséquence potentielle de la présence du gène est celle d'OTMA réductases fonctionnelles. Même si de bonnes corrélations ont été obtenues avec la méthode d'ABVT/TMA, il conviendrait de confronter ces données avec des évaluations sensorielles de façon à voir si la méthode qPCR peut également être corrélée avec les caractéristiques organoleptiques des produits.

Bien que prometteuse, il est trop tôt pour conclure quant à la faisabilité de l'utilisation d'une telle méthode. En effet, une phase d'optimisation supplémentaire de l'approche doit être réalisée notamment en ajoutant différents contrôles, comme des contrôles de l'environnement, d'amplification, etc. La méthode pourrait également vraisemblablement gagner en spécificité en utilisant de nouveaux protocoles d'amplifications comme ceux utilisés en touch-down qPCR. Cette méthode consiste à appliquer des températures d'hybridation plus stringentes en début d'amplification afin de favoriser l'obtention d'amplicons spécifiques puis diminuer ces températures par la suite. Une autre voie d'amélioration porte sur le temps d'analyse qui pourra être réduit en toute confiance d'au moins dix cycles par rapport à ce qu'il est en l'état ; l'ajout d'IAC permettant vraisemblablement de diminuer ce nombre de cinq cycles supplémentaires. L'effet d'inhibition par la matrice devra également être mesuré. Enfin, l'avènement de la PCR digitale laisse entrevoir d'autres perspectives comme le traitement d'un grand nombre d'échantillons ou la quantification absolue.

Dans une projection à plus long terme, il conviendrait de réaliser des suivis d'altérations sur différents modes de conservations/espèces de façon à estimer la portabilité d'une telle méthode. Un second volet porterait sur la répétition de suivis à l'échelle intra et inter-laboratoires pour passer à des considérations de validation de méthode voire même de modélisation.





Colonne MXT-5 : 969, 1005 MXT-1701 : 878, 978, 1102

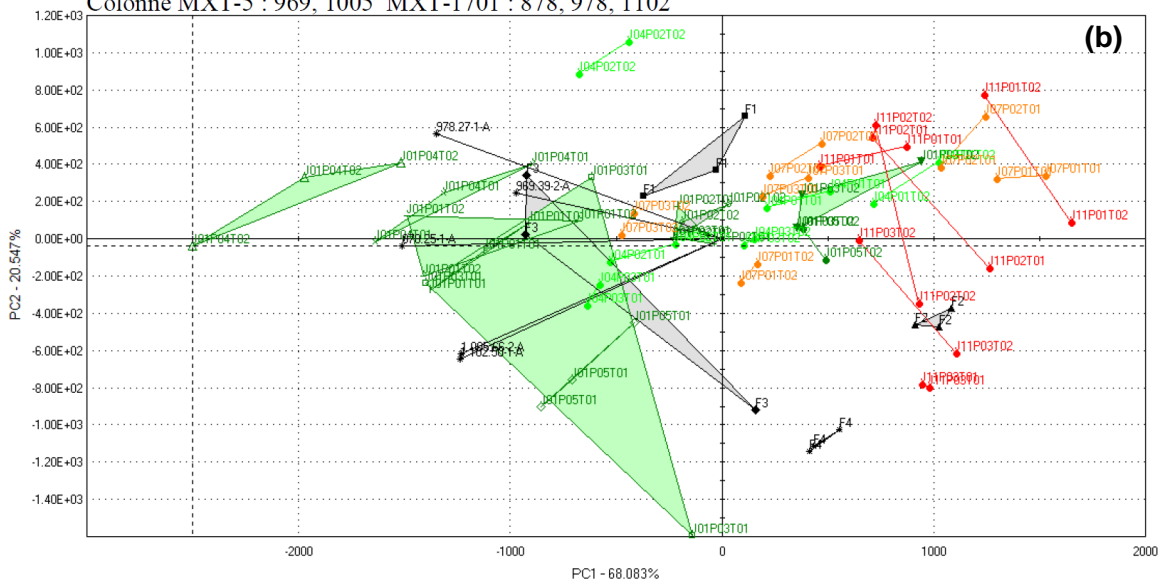


Figure 8-1 : Analyses en composantes principales issus d'une étude menée à l'aide d'un nez électronique, lors d'un suivi d'altération de bar commun. (a) ACP issue des données comprenant l'ensemble des composés volatils détectés. (b) ACP issue des données après sélection des composés les plus discriminants

---

## Partie II : Investigations concernant les conséquences de l'altération : mise en place d'une méthode de quantification de la TMA et la DMA en SPME-GC-MS

### I. Présentation de l'approche

Après avoir travaillé sur les causes de l'altération du poisson, cette seconde partie des résultats s'est intéressée à ses conséquences conduisant notamment à l'émission de nombreux composés volatils. Historiquement, le laboratoire s'est intéressé aux amines basiques volatiles totales en développant une méthode de dosage par distillation à la vapeur, puis à l'ensemble des composés volatils émis grâce à une méthode de SPME-GC-MS.

L'orientation choisie de quantifier la TMA et la DMA résulte des constatations suivantes :

- Plusieurs études ont ainsi pu être publiées (Duflos, Leduc, *et al.* 2010; Leduc, Krzewinski, *et al.* 2012) indiquant des marqueurs potentiels de fraîcheur, d'altération ou de congélation/décongélation du poisson. Une approche de modélisation par régression linéaire multiple du QIM a même été développée (Leduc 2011). Afin de poursuivre cette approche de modélisation, une nouvelle approche statistique a été réalisée au cours de ces travaux de thèse, en collaboration avec M. Ibrahim S. Zakari. Elle se base sur les données de la publication de Duflos, Leduc, *et al.* (2010). Cette approche fait appel aux techniques de statistiques en grandes dimensions applicables au cas où le nombre d'observation est très inférieur au nombre de variables descriptives. Des composés de fraîcheur et d'altération ont pu être mis en évidence grâce à la technique de régression par quantiles. Elle a permis de visualiser, de façon « dynamique », la contribution de ces composés dans l'estimation d'indices de fraîcheur et de qualité. Ce développement a fait l'objet d'une publication « Variable selection and quantile regression on freshness characterization of whiting (*Merlangius merlangus*) » en cours de soumission dans le journal *Applied Mathematics*. Néanmoins, bien qu'informatrice ce type d'approche reste techniquement difficile à mettre en œuvre et tributaire des limites issues de l'analyse en SPME-GC-MS. En effet, la SPME-GC-MS ne permet que de travailler sur des ratios de volatils et de fait ne propose pas de quantification absolue des composés. Ceci rend l'utilisation de modèles plus fastidieuse compte-tenu du temps nécessaire pour traiter les chromatogrammes et de la variabilité observée, inhérente à la technique utilisée.

- Dans l'optique de comparer la méthode de SPME-GC-MS à de nouvelles technologies, émergentes, une étude sur des échantillons de bar ont été réalisées à l'aide d'un nez Héraclès II d'Alpha-Mos (Toulouse, France). Comme le montre la [figure 8-1](#), il est difficile de constituer des groupes homogènes d'échantillons, en utilisant la totalité des composés volatils (a) ou les composés les plus discriminants (b), même pour des poissons issus de jours d'altération identiques. Il n'a donc pas été possible de séparer de façon fiable des échantil-

lons frais, moyennement altérés et altérés, de même, l'évaluation d'échantillons fournis en aveugle s'est révélée ambivalente (Tableau VIII-I). Cette technologie de nez électronique ne semble donc pas performante sur les échantillons de poisson dans les conditions de l'analyse.

- De façon surprenante la méthode de SPME-GC-MS initialement développée au laboratoire ne laissait transparaître que de faibles quantités de triméthylamine. De plus, celles-ci n'apparaissaient pas comme un composé marqueur d'altération dans les études de statistique multivariées, allant à l'encontre des observations sensorielles et bibliographiques.

Une refocalisation des travaux de recherche sur l'amélioration de la détection de la triméthylamine et de la diméthylamine au sein du volatilome des poissons a donc été engagée. Ces deux molécules possèdent l'intérêt d'être issues de deux voies d'altération du poisson : la triméthylamine est le produit du métabolisme de la flore spécifique d'altération du poisson et la diméthylamine provient de l'activité d'enzymes endogènes d'autolyse.

## II. Principaux résultats obtenus

Cette approche a fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique, en cours de soumission dans *Food Chemistry*.

## Quantification of trimethylamine and dimethylamine by SPME-GC-MS and use of partial volatile basic nitrogen concept for freshness monitoring of cod fillets (*Gadus morhua*).

Alexandre DEHAUT<sup>a</sup>, Simon DUTHEN<sup>a</sup>, Thierry GRARD<sup>b</sup>, Frédéric KRZEWSKI<sup>c</sup>, Assi N'GUESSAN<sup>d</sup>, Anne BRISABOIS<sup>a</sup> & Guillaume DUFLOS<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments – Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France.

<sup>b</sup> Université du Littoral Côte d'Opale – Anses, Équipe Biochimie des Produits Aquatiques, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-mer, France

<sup>c</sup> Université de Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF - Bâtiment C9, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>d</sup> Université de Lille 1 – Laboratoire Paul Painlevé, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

\*Corresponding author: E-mail: guillaume.duflos[at]anses.fr - Phone: +33 321 992 500 - Fax: +33 321 991 725

**Fish is a highly perishable food, hence the estimate of its freshness is important to ensure to consumer the best quality and therefore reduce risks concerning food safety. The present study describes the development of a SPME-GC-MS technique allowing quantifying both trimethylamine and dimethylamine, components of what has been defined as partial volatile basic nitrogen (PVB-N). Method was used together with other reference methods to monitor the shelf-life of cod fillets conserved under melting ice. Method was highly correlated with reference methods. Trimethylamine production was successfully modelled throughout the study using Gompertz modified model. Finally, authors followed the evolution of dimethylamine on trimethylamine ratio (DTR) together with sensory analysis scores. The DTR was proposed as a reliable indicator for decrease of freshness until fish decay.**

**Keywords:** SPME-GC-MS, TMA, DMA, TVB-N, PVB-N, QIM, shelf-life assessment

### 1. Introduction

The average global consumption of fish is estimated at 19.1 kg per capita per year on the period 2009-2011; this average consumption is expected to rise by 16.0 % by 2021 (Food and Agriculture Organization, 2012). Fish is thus globally even more consumed, despite disparities between continents. It is a very convenient food, with good nutritional properties; nevertheless this is a highly perishable food with shelf-life ranging from the neighbourhood of 7 days for chilled fish to more than 10 days for modified-atmosphere packed fish (Bono & Badalucco, 2012; Cardenas Bonilla, Sveinsdottir, & Martinsdottir, 2007; Koutsoumanis, 2001). Freshness estimation is thus a key issue concerning this food matrix as a tight link exists between freshness, quality and safety issues (Oehlenschläger & Sørensen, 1997). Consumers being more and more concerned about information and especially on the quality of what they ate (Børresen, Frederiksen, & Larsen, 2003), accurate indicators and tools characterizing the freshness decrease are required. To date, numerous techniques have been developed including sensory, physical, biochemical and microbial methods (Autheman & Widmann, 2010; Dalgaard, Mejlholm, & Huss, 1996; Duflos, Leduc, N'Guessan, Krzewinski, Kol, & Malle, 2010; Malle & Poumeyrol, 1989; Oehlenschläger, Lutén, & Ólafsdóttir, 2003; Warm, Boknass, & Nielsen, 1998).

Unfortunately, major drawbacks are encountered with these techniques. Concerning sensory analysis, the need of a constantly trained, objective and available sensory panel could be deleterious (Hyldig, Martinsdóttir, Sveinsdóttir, Schelvis, & Bremner, 2010). Usually physical methods required whole, unskinned fish, remaining poorly efficient with processed fish. The main problem encountered with chemical analysis is their lack of reliability within the early steps of freshness decay (Huss, 1995). Finally, time required for microbial methods is very long and these methods are highly variable regarding numerous parameters (Gibson & Ogden, 1997). After fish death and rigor mortis resolution, several processes occurred, leading to freshness decrease and fish spoilage. Among all these processes, endogenous enzyme activities, nucleotide degradation, lipid oxidation or development of specific spoilage organisms have been described as causative agents (Gram & Dalgaard, 2002; Howgate, 2006; Huss, 1995; Lopez-Amaya & Marangoni, 2000).

Marine fish are characterized by the presence of trimethylamine N-oxide (TMAO) in their flesh expected to ensure many roles including primarily osmoregulator effect (Gillett, Suko, Santoso, & Yancey, 1997). In cod (*Gadus morhua*) the mean TMAO content has been evaluated between 60 and 120 mg N/100g, depending on season or catching area (Huss,

1995). Besides its physiological roles *in vivo*, TMAO and its degradation products are also key molecules involved in the spoilage process of fish (Sotelo & Rehbein, 2000). TMAO can be catabolized through two major ways: an exogenous and an endogenous pathway. The first pathway results to its reduction in trimethylamine (TMA) by TMAO reductase (EC 1.6.6.9); a molybdoenzyme presents on the periplasm of specific spoilage microorganisms (Dos Santos, Iobbi-Nivol, Couillault, Giordano, & Méjean, 1998). The second pathway involves the action of endogenous TMAO demethylase (EC 4.1.2.32) and leads to the production of dimethylamine (DMA) and formaldehyde in equimolar proportions; this enzyme activity is particularly important in the gadoid fish species (Sotelo & Rehbein, 2000). Additional minor synthesis pathways were described for TMA, which might be originating from choline, acetylcholine, carnitine or betaines degradation (Marzo, Monti, Ripamonti, Muck, & Martelli, 1990). These molecules are directly involved with quality and freshness issues. On the one hand TMA is responsible of the characteristic fishy-odour with rejection level in chilled fish comprised between 10 and 15 mg N/100g (Huss, 1995; Ólafsdóttir & Jónsdóttir, 2010) and on the other hand DMA produced soon after fish harvest, contributing to the global flavour of fish, with no specific odour described (Ólafsdóttir & Jónsdóttir, 2010). Additionally, DMA is also an indirect marker of flesh texture as it is produced together with formaldehyde, indeed methanal forms cross-bond with proteins resulting in a marked toughening of fish flesh after a frozen storage (Huss, 1995).

Historically several methods have been developed to quantify TMA and DMA using capillary electrophoresis (CE), high-performance liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography (GC) (Marzo, Monti, Ripamonti, Muck, & Martelli, 1990; Timm & Jørgensen, 2002; Veciana-Nogues, Albala-Hurtado, Izquierdo-Pulido, & Vidal-Carou, 1996). Unfortunately, these methods usually necessitate a huge sample preparation step with use of hazardous solutions, nonetheless some of them, as CE and HPLC, are usually more informative concerning quantities of TMAO and some cations. Headspace analysis allowed to markedly reduced time of sample preparation (Béné, Hayman, Reynard, Luisier, & Villettaz, 2001; Miller III, Scanlan, Lee, & Libbey, 1972). More recently, solid phase micro extraction (SPME) headspace methods have been developed for quantification of volatiles amines in fish (Béné, Hayman, Reynard, Luisier, & Villettaz, 2001; Chan, Yao, Wong, Wong, Mok, & Sin, 2006; Li, Zeng, Zhou, Gong, Wang, & Chen, 2004). Extractions steps together with separation of amines are usually well described and transferable, although one method that did not manage to clearly differentiate TMA and DMA signals (Béné, Hayman, Reynard, Luisier, & Villettaz, 2001) and another use a non-

available, laboratory-developed fibre (Li, Zeng, Zhou, Gong, Wang, & Chen, 2004). Regrettably, if methods are usually applied for monitoring amines evolution in fish flesh, none of the method allows the detection of DMA in the early steps of freshness decrease. Additionally, none of these methods was compared with sensory analysis.

The present paper dealt with the development of a new SPME-GC-MS method quantifying specifically TMA and DMA. The method, using commercially available consumables, was applied to the concrete case of a fish spoilage study. SPME-GC-MS method allowed quantifying partial volatile basic nitrogen (PVB-N), sum of TMA and DMA concentrations and to define DMA on TMA ratio (DTR) used for early freshness decrease characterization.

## 2. Experimental

### Chemicals

Some chemicals were used in this study, a n-paraffin mix, C<sub>5</sub> to C<sub>15</sub> and ammonium chloride was acquired from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Other chemicals were used as pure compounds solutions: trimethylamine hydrochloride, dimethylamine hydrochloride, or internal standard: 2-phenylethylamine, sec-butylamine, N,N-diisopropylmethylamine, 1,2-dimethylpropylamine, they were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Potassium hydroxide pellets used for pH increase were also acquired from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Trichloroacetic-acid (TCA) was purchased from Dislab (Lens, France). Finally sodium chloride was acquired from Oxoid (Dardilly, France).

### Preparation of pure solution and standards

In a first attempt of fish fillet preparation, 50.0g of fish was blend with 100.0 mL of 30.0 % (w/w) NaCl solution. After centrifugation at 10,000g for 10 min at 4°C 11 mL of supernatant was poured into SPME vials hermetically sealed after addition of a potassium hydroxide pellet. For this preliminary step a special care was focused on the impact of NaCl concentration and pH of the solution. Solution of pure compounds were prepared and diluted, if required, thanks to a 30.0 % (w/w) NaCl solution. 11 mL of solution were then poured into SPME vials, a potassium hydroxide pellet was then added and vials were then hermetically sealed. Standards were prepared as followed, 10 µL of pure compound solution was added to 10 mL of bidistilled-grade water from Dislab (Lens, France) and gently mixed.

### Fish preparation and shelf-life assessment

Eleven gutted, whole cod (*Gadus morhua*) were purchased at a local fish retailer in Boulogne-sur-Mer (France). Fish were caught in north-east Atlantic, during spring 2014, and were conditioned into two polystyrene box, covered by crushed ice and insulat-

ed by a plastic film. Fish were coming from the auction of the day in a way to insure the best freshness grade. Globally, raw material showed bright skin, fleshes were greyish, flat eyes allow to clearly see a black pupil thanks to a transparent cornea. Only gills displayed a discoloured aspect with a neutral to mouldy odour. Fish preparation was carried out at the innovation platform *PFI-Nouvelles Vagues* (Boulogne-sur-Mer, France). In a room with ambient temperature maintained at 10°C, each fish was filleted with skin. Three fillets were placed into new polystyrene box, taking care to place the two fillets of a single fish in separate boxes. After placing insulator plastic films, boxes were filled with fresh crushed ice and placed in cold room at +2.0°C. At days 1, 4, 7, 9, 11, 14 and 16, a single box was withdrawn and the three fillets were analysed. The day of fillets preparation was considered as day 1 of the study.

The day of analysis each of the fillets was equally processed, as followed. Firstly, fillet was subject to sensory analysis, carried out by three judges, using QIM score evaluation as previously described (Cardenas Bonilla, Sveinsdottir, & Martinsdottir, 2007). Then, fillet was cut in 1 cm-edge cubes, flesh dices were then mixed to obtain a matrix representative of the overall freshness state of fillet.  $100.2 \pm 0.2$  g of flesh was then put into a warring blender and approximately 200 g of a 7.5 % (w/w) TCA solution was added to respect the weight ratio of 2:1. The whole was then blended and filtrated through a 5 µm cut-off filter paper. Finally filtrate was then split, 1 mL was conserved for SPME-GC-MS analysis and the remainder was used for TVB-N and TMA assays, in duplicate, by steam distillation as previously described (Leduc, Krzewinski, Le Fur, N'Guessan, Malle, Kol, *et al.*, 2012). A 0.5 % (w/w) solution of NH<sub>4</sub>Cl was used as control for steam distillation assays, results were considered as valid for recovery rates comprised between 98% and 101%. For SPME-GC-MS, the filtrate was diluted with a 30.0 % (w/w) NaCl solution from 1/100 to 1/4000 depending the considered day of analysis. At each day, filtrate was analysed in triplicate as followed: 11 mL of diluted filtrate were poured in SPME vials, 4.4 µL of 1,2-dimethylpropylamine standard solution was added together with one potassium hydroxide pellet and vials were hermetically sealed.

#### SPME-GC-MS procedure

Vials management was automatically achieved thanks to a CTC Analytics CombiPAL (Zwingen, Switzerland), two extraction temperatures 35°C and 50°C were tested. Firstly, sample was transferred to the extraction chamber, heated and shaken at 500 rpm for 10 min for the headspace equilibration. Then, a 23 Ga, 75 µm, CAR/PDMS SPME fibre from Supelco (Saint-Germain-en-Laye, France) was inserted into the headspace and volatile adsorption was carried out from 1

to 40 min in order to assess the best required extraction time. After volatile extraction, SPME fibre was transferred to a Merlin Microseal injector from Supelco (Saint-Germain-en-Laye, France), where volatiles were desorbed at a temperature of 210°C for 1 min. Finally, after each injection SPME fibre was heated to 300°C, under helium flow, for 20 min in the fibre conditioner device. Two types of liner were tested during this study: regular SPME glass liner and deactivated SPME glass liner from Restek (Lisses, France). Volatile compounds separation and identification was achieved on a GC-MS QP2010 plus from Shimadzu (Noisel, France). GC device was successively equipped with two capillary columns; a SLB-5ms capillary column 60m x 0.25 mm x 0.25 µm from Sigma-aldrich (St-Quentin-Fallavier, France) and a Stabilwax DB capillary column 30m x 0.25 mm x 0.25 µm from Restek (Lisses, France), helium was used as carrier gas for the both. The GC conditions applied with SLB-5ms were the same as previously described (Leduc, *et al.*, 2012). Concerning Stabilwax DB capillary column, conditions were as follow: the oven temperature was initially set at 60°C for 5 min, then increased to 210°C

at 15°C.min<sup>-1</sup> and maintained for 5 min. In a way to optimize the method an experimental plan like approach was used on two levels of three parameters: split value (splitless or split of 5), injection temperature (150°C and 210°C) and initial oven temperature (45°C and 60°C). In a way to see the impact of these parameters on peaks, two shape indicators, tailing factor and full width half maximum were used. MS conditions were set as follow: interface temperature equal to the oven final temperature to avoid any recondensation, 70 eV of ionization voltage and for the early development steps, a mass range from 33 to 200 m/z for total ion chromatogram (TIC) tracing. In the later phases, single ion monitoring (SIM) was preferred with specific ions of TMA, DMA and internal standard (42 m/z, 44 m/z, 45 m/z, 55 m/z, 58 m/z, 59 m/z and 72 m/z). Volatile compounds were identified using the NIST08 spectral database and comparison of linear retention indices (LRI) with those of the corresponding pure chemicals.

#### Inferential and descriptive statistical analysis and modelling

All of the statistical work was carried out thanks to R software (3.0.0). Except explicit notice, bar errors reproduced on bar plots and dot plots illustrates the twice standard-error value (standard deviation of the sampling distribution) allowing to visualize the 95% confidence limits of the measurement. In a case, a least significant difference (LSD) test was performed; two results tagged with different letters are significantly different with an error risk of 5%. ANOVA were carried out after a careful control of the proper structure of data. Analysis was achieved under samples in-

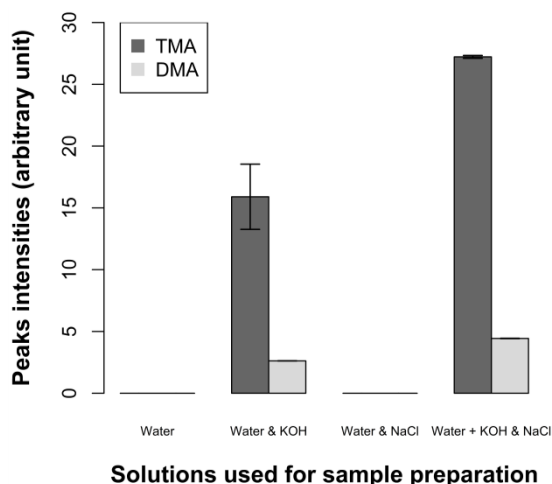
dependence hypothesis, normality of the distribution was assessed thanks to Shapiro-Wilks test and distribution homoscedasticity was controlled by Bartlett test. Dependence of the data from this research was achieved thanks to calculations of Pearson's correlation or Spearman's correlation coefficients depending on their linear relation.

TMA production being a reflection of specific spoilage organisms metabolism, modelling of TMA by microbial growth model was tested. Using modified Gompertz model (Zwietering, De Koos, Hasenack, De Witt, & Van't Riet, 1991), a non-linear regression was achieved with R software (3.0.0). The three parameters  $A$ ,  $\mu_m$  and  $\lambda$  were entered manually in accordance with data observed and an iterative process allowed refining parameters in a way to fit model to observed data. A special care was paid to enter the most probable parameter values in a way to minimize the risk of reaching local minima during the iterative process.

### 3. Results and Discussion

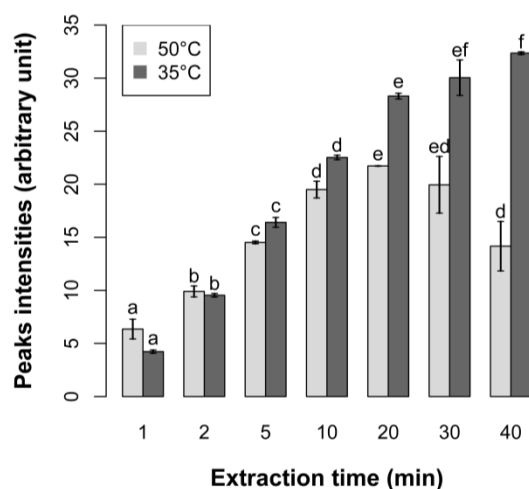
#### Sample preparation optimization

In a first step of method optimization, a special focus was applied to chemical conditions applied to the sample. As stated in **Figure 1**, in the absence of KOH, solution pH were lower than 8.0 and no detectable peak was recorded on chromatograms. Addition of KOH into the solution allowed to markedly improving the pH above 12.0 and as a result clear peaks appeared on chromatograms. The observation of peak for high pH values is endorsed by the fact that TMA and DMA are only volatiles in their protonated form and the respective pKa of the both molecules are 9.76 and 10.64 (Hall Jr, 1957). NaCl tended to increase both TMA and DMA recovery with a clear improvement of peak area for TMA and a slighter increase concerning DMA which is in accordance with previous



**Figure 1:** Bar plot of TMA and DMA peaks intensities depending on the type of solution used for a single spoiled fish preparation. Error bars figured the min/max peaks intensities as measures were carried out in duplicate.

observations (Li, Zeng, Zhou, Gong, Wang, & Chen, 2004). Use of 30.0% NaCl solution (w/w) and addition of a KOH into the vial were thus conserved for the preparation of samples.



**Figure 2:** Bar plot of TMA peak intensities depending on extraction time and temperature of extraction from pure solutions. Error bars figured the min/max peaks intensities as measures were carried out in duplicate. LSD tests were carried by series (50°C and 35°C), letters have to be compared inside a considered series.

#### Optimization of headspace extraction

The second group of parameters optimized was the headspace extraction conditions, mostly concerning time and temperature of extraction as they have been previously described as key parameters. Two temperatures (35°C and 50°C) and seven times of extractions (1, 2, 5, 10, 20, 30 and 40 min) have been tested as illustrated in **Figure 2**. Although no least significant difference test was achieved for temperature comparison, bar plots clearly showed that a extraction temperature of 35°C allowed higher intensities peaks recording, from 5 min, compared with similar extraction times at 50°C. Concerning time of extraction, higher times led to the higher peaks intensities. Least significant difference tests tended to conclude that a significant increase of peak area was recorded between 20 min and 30 min of extraction; an increase was also recorded between 30 min and 40 min but it was not significant. Extraction is the result of two equilibriums: between matrix and headspace first and between fibre and headspace then. Lower results observed with an extraction temperature of 50°C could be explained by the fact that equilibrium between fibre and headspace is shift to the headspace as previously mentioned (Jia, Zhang, & Min, 1998). Knowing this, improving the time of extraction at a fixed low extraction temperature allowed adsorbing more volatile compounds on SPME fibre. Regarding these results, extractions at 35°C for 30 min were chosen as the best compromise to extract volatiles.

**Table 1: ANOVA results obtained to assess the impact of three parameters on the shapes of both trimethylamine and dimethylamine peaks.**

	Trimethylamine <sup>a</sup>		Dimethylamine <sup>b</sup>	
	FWHM <sup>c</sup>	TF <sup>d</sup>	FWHM <sup>c</sup>	TF <sup>d</sup>
TI: Temperature of injection	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***
TC: Initial temperature of the column	0.0053 **	0.74	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***
S: Split value for injection	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***
TI x TC	0.0036 **	0.05 *	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***
TI x S	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	0.0007 ***	< 0.0001 ***
TC x S	0.07	0.94	0.0012 **	< 0.0001 ***
TI x TC x S	0.77	0.0023 **	0.0003 ***	< 0.0001 ***

<sup>a</sup> Data of ANOVA with trimethylamine pure solution, for each combination of split levels, injection and column temperatures, 5 replicates measurements were achieved. <sup>b</sup> Data ANOVA with dimethylamine pure solutions, for each combination of split levels, injection and column temperatures, 5 replicates measurements were achieved. <sup>c,d</sup> Influence of parameters and combination of parameters on full width half maximum<sup>c</sup> and tailing factor<sup>d</sup> shape indicators; asterisks illustrate the significance level of the parameters impacts, in accordance with probabilities (\*\*\* p<0.001, \*\* p<0.01, \* p<0.05).

### Injection and separation optimization

A comparison of the above mentioned columns concluded that Stabilwax-DB column offer the better peak shapes (data not shown). Improvement of peak shapes could be explained by the phase coated on Stabilwax-DB column that is composed of Carbowax® polyethylene glycol, more polar than 5% diphenyl/95% methyl-siloxane coated on SLB-5ms column. Apart from phase coated on column, peak resolutions and shapes are also influenced by numerous parameters, including injector temperature, oven temperature or split value. **Table 1** reports ANOVA results assessing the impact of the three parameters tested on TMA and DMA peaks shapes. Except for the initial temperature of the column that has no significant impact of the tailing factor of TMA, the three parameters had a significant impact on both tailing factor and full width half maximum of TMA and DMA. Interpretation of parameters interactions is more tedious to analyze. The shape of DMA peaks is significantly influenced by all the parameters interactions, whereas shape of TMA peaks is more likely significantly influenced by the injection parameters, *i.e.* injector temperature and split value. For each assessed parameters, the higher level led to the best values concerning shapes indicators. An injection at 210°C with a split value of 5 and an initial column temperature of 60°C were thus chosen to achieve the next analysis.

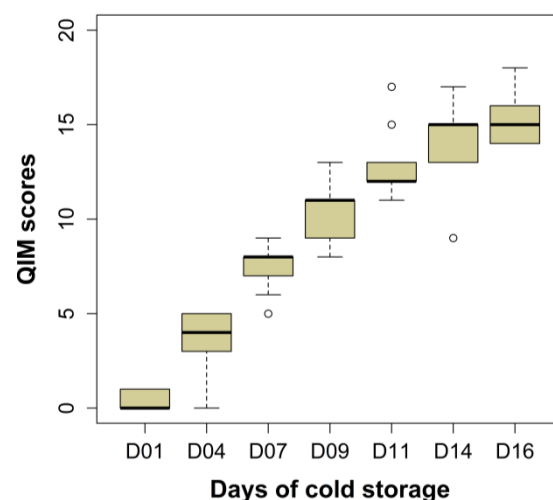
A test with injection of both TMA and DMA with two types of SPME glass liner showed that higher areas were recovered with deactivated SPME glass liner (data not shown). This type of liner was thus preferred for analysis of volatile amines.

With all these conditions, both TMA and DMA of a sample can be analysed in fifty minutes.

### Internal standard screening and quantification range

In a way to overcome signal variation an internal standard was added for sample preparation. Four compounds: 2-phenylethylamine, *sec*-butylamine, *N,N*-diisopropyl-methylamine and 1,2-dimethylpropylamine were tested, as they share structures or chemical properties close to the amines studies. As a special care in safety issue was paid for internal standard

selection, *sec*-butylamine was rapidly discarded because of its toxic, polluting and highly corrosive properties. Among the last compounds 1,2-dimethylpropylamine was the molecule that led to best linearity of the signal for both TMA and DMA (data not shown). Using 1,2-dimethylpropylamine as internal standard allow to find a quantification range from 50 µg.kg<sup>-1</sup> to 750 µg.kg<sup>-1</sup> for TMA (R<sup>2</sup>=0.98) and from 150 µg.kg<sup>-1</sup> to 1300 µg.kg<sup>-1</sup> for DMA (R<sup>2</sup>=0.99) (data not shown). No further investigations were brought to LOD estimation knowing that lower TMA and DMA values, observed in fish preparation, will



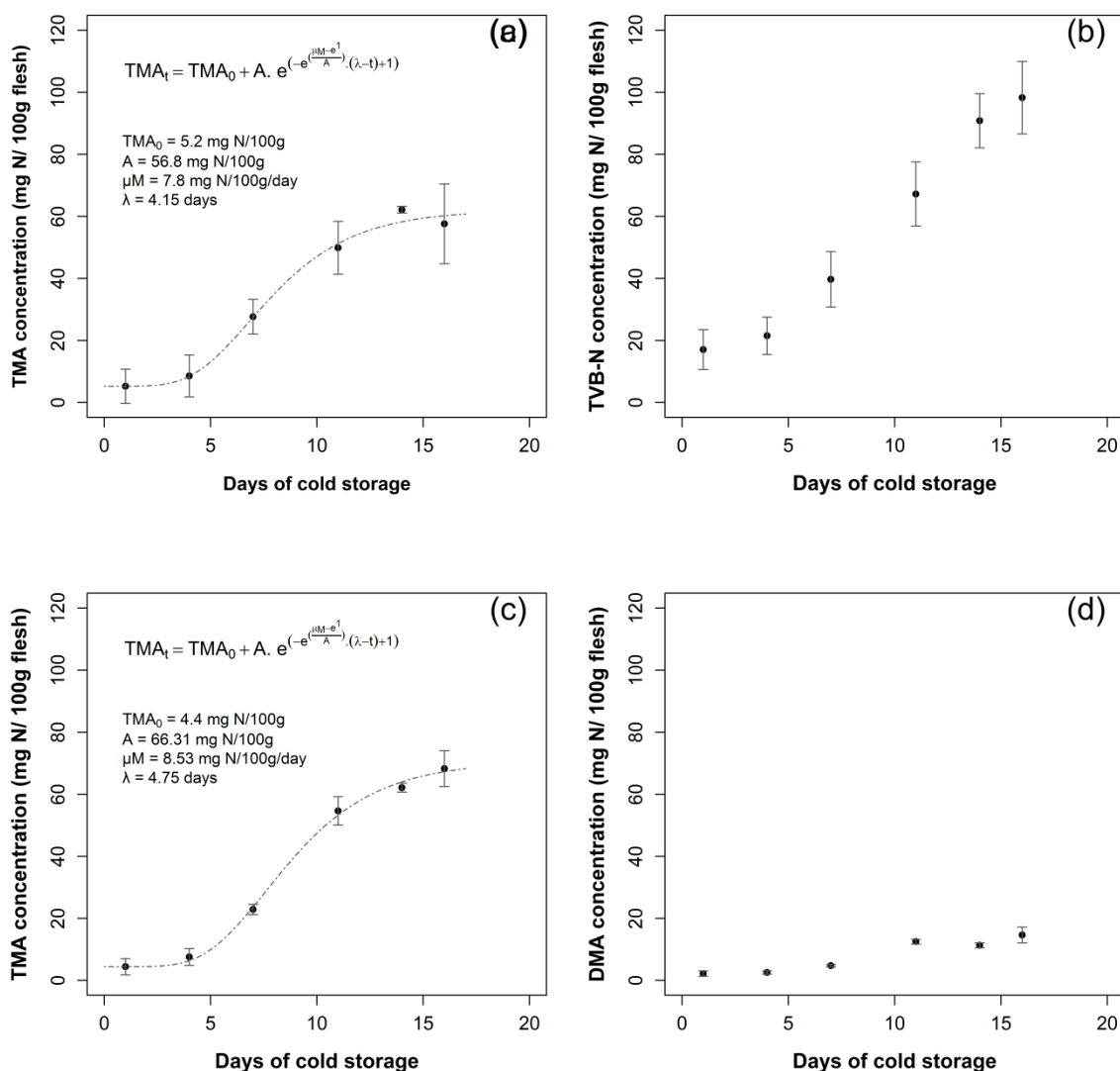
**Figure 3: Box-plot figuring QIM score values throughout the shelf-life. Each box illustrates score obtained after evaluations of three fillets by the three panelists.**

never be less than 10 mg.kg<sup>-1</sup>.

### Application to fish freshness assessment monitoring

Sensory analysis results are illustrated by a box plot on **Figure 3**. A marked evolution is recorded from day 1 to day 14 with an average QIM score increase from 0 to 15. The mean QIM score obtained for day 14 and 16 was the same; it might reflect a final spoilage state of cod fillets. Throughout the study QIM score values were linear in comparison with conservation days with an acceptable determination coefficient (R<sup>2</sup>=0.93), these results are consistent with previous published results (Cardenas Bonilla, Sveinsdottir, & Martinsdottir, 2007). It has been noticed by panellists





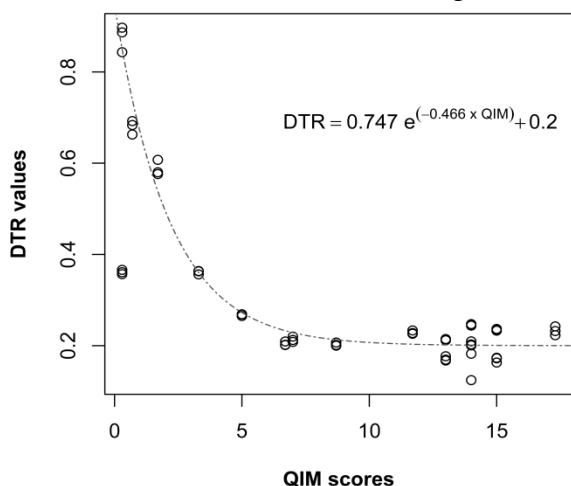
**Figure 4:** Evolution of mean TMA (a), TVB-N (b) concentrations (mg N/100g) measured by steam-distillation assay; mean TMA (c) and DMA (d) concentrations (mg N/100g) measured by SPME-GC-MS throughout shelf-life study. Each dot reflects the mean value observed for three fillets analysed in duplicate for steam-distillation assays or in triplicate for SPME-GC-MS analysis. Concerning TMA production modelling (c), parameters corresponded to maximum theoretical concentration (A), TMA concentration maximum daily increase during the exponential phase ( $\mu$ ), TMA concentration lag phase ( $\lambda$ ) and initial TMA concentration ( $TMA_0$ ).

that no blood was present on fillets throughout the study, this parameters might not be suitable for cod fillet QIM score evaluation. Moreover judges indicated difficulties to accurately differentiate opaque and milky bright in Cardenas Bonilla et al. method. Concerning QIM score data structures, variability has occurred in some days, it could be explained by two major causes: initial heterogeneity of fish as these were wild fish and heterogeneity of the panel judgment despite formation on this method recently used in the laboratory. Based on Cardenas Bonilla et al. method the rejection limit, corresponding to a QIM score of 8, was observed at the neighbourhood of day 7 (Figure 3). The use of mean QIM score values has been privileged in the development below.

Unfortunately, a technical problem at day 9 did not allow having workable data concerning biochemical analysis, this day do not appear in charts. Based on TVB-N measurement by steam distillation assays

(Figure 4 b) and regulation, fillets were considered as spoiled between day 4 and day 7, probably after day 6. These results are consistent with the sensory analysis and previous observation with the same methods of fillet processing and storage (Cardenas Bonilla, Sveinsdottir, & Martinsdottir, 2007). Comparison of TMA concentrations measured by steam distillation assay (Figure 4 a) and SPME-GC-MS (Figure 4 c) led to highly correlated values ( $r = 0.98$  - p-value <0.001), moreover TMA values obtained were very similar by coefficients obtained after a linear regression: TMA by steam distillation =  $0.92 \times$  TMA by SPME ( $R^2 = 0.96$ ). Additionally TMA concentration is highly correlated with both QIM values ( $r = 0.97$  - p-value <0.001) and days of storage ( $r = 0.93$  - p-value <0.001). Using modified Gompertz model allowed accurately modelling TMA production, with both methods, throughout the study and new insights were inferred from this study. Modelling allowed having an estimation of the

lag phase of TMA production, between 4.2 and 4.8 days, in the early steps of fish spoilage. During the exponential step marking the maximum growth rate of spoilage flora, the daily average increase of TMA concentration was of 7.8 to 8.5 mg N/100g, depending on the method. Finally, theoretical maximum TMA concentration in cod fillets range from 56.8 to 66.3 mg N/100g while the average observed TMA concentration vary from 4.4 to 5.2 mg N/100g. As with SPME-GC-MS method, PVB-N monitoring allowed a



**Figure 5:** Dot plot figuring the evolution of DMA on TMA ratio (DTR) values in function of QIM values. Each dot corresponds to a single analysis repeat for a unique fillet.

better specificity in signal detection compared with steam distillation, DMA concentration has also been monitored throughout the shelf-life (**Figure 4 d**). Compared with TMA, DMA levels remained lower than 20 mg N/100g in the flesh of cod fillet. Additionally, DMA has lower correlation values than those of TMA, but correlation factors remain acceptable for QIM values ( $r = 0.93$  -  $p$ -value  $< 0.001$ ) and days of storage ( $r = 0.90$  -  $p$ -value  $< 0.001$ ). Using PVB-N results, the range of both TMA and DMA concentration has been established using the international system of units. Thus, TMA concentrations vary from 169 to 2743 mg.kg<sup>-1</sup> throughout cold storage, while DMA concentration increases from 64 to 644 mg.kg<sup>-1</sup>.

Despite acceptable correlations with QIM scores and days of storage throughout shelf-life; neither TMA nor DMA did markedly evolve in the early steps of fish freshness decrease. It was decided to further investigations on PVB-N compounds quantities using ratio as previously stated (Malle & Poumeyrol, 1989). Many ratios were tested including: TMA/PVB-N, DMA/PVB-N, PVB-N/TMA or PVB-N/DMA, but none of them were accurately informative. By contrast, DMA/TMA ratio (DTR) led to interesting results as illustrated on **Figure 5**. Plotting DTR against QIM score values showed a marked decrease of DTR values for QIM values comprised between 0 and 7 corresponding to acceptance of fish. DTR values were found to be homogeneous to an exponential function

of QIM values (**Figure 5**). Globally, DTR values decreased from 0.9 to 0.2 throughout shelf-life, illustrating the increasing preponderance of TMA in comparison with DMA, explained by the metabolic activities of spoilage organisms. The limit of 0.2 corresponded to QIM values higher than the maximum storage time estimated for the fillets of this study. It should be mentioned that three atypical data were recorded for a QIM value in the neighbourhood of 0 with DTR value slightly lower than 0.4; it corresponds to the triplicate of a single fillet analysed on day 1. These atypical values are the result of TMA values markedly superior with the other fish and might be the fingerprint of an early development of spoilage flora.

No recovery rate, as mentioned in other studies (Timm & Jørgensen, 2002), was calculated in this study to assess the matrix effect on volatile amine extraction and analysis method. Nonetheless as SPME-GC-MS method was achieved together with steam distillation assays, well characterized and used as reference in Europe (EU regulation, 2005) and TMA results from the both methods were highly concordant. Thus, recovery rate should not be problematic, but have to be carried out in the future.

The new highlights brought above should be considered with care regarding the fact that a sole shelf-life study was achieved. Authors note that further species, catch season, fish processing have to be analysed with this method in a way to confirm or reverse the suitability of the method in fish freshness estimation. The developed method made it possible to completely dispense with the use of formaldehyde, sulphuric acid and boric acid. All these compounds require, for steam distillation assays, a special care concerning technicians securing and waste management because of polluting, highly corrosive and toxic properties. A new procedure of fillet preparation, replacing TCA solution by 30.0 % (w/w) NaCl solution, not used in this study for a better comparison of SPME-GC-MS and steam distillation assays, did not affect TMA and DMA recovering on chromatograms. In the future the use of TCA, polluting and corrosive, might be thus avoided. The main drawback of the developed method is analysis time compared with steam distillation assays; nonetheless this is quickly offset by the specificity of volatile amines detection and new perspectives brought with it. Moreover based on results of **Figure 2**, time of extraction might be markedly reduced together with dilutions of sample preparation; nevertheless linearity of the signal would have to be checked before.

#### 4. Conclusions

To conclude this paper, the development of a new SPME-GC-MS procedure for quantification of both TMA and DMA was achieved. A special care was paid to optimize different parameters as solution preparation, extraction, volatile compounds separation and

signal normalization thanks to an internal standard. The developed method allowed analysing PVB-N, quantification of both TMA and DMA, in a sample within fifty minutes. PVB-N measurement by SPME-GC-MS procedure was applied, together with reference steam distillation assay and sensory analysis, to a shelf-life monitoring study on cod fillets conserved under melting ice. First results are encouraging, indeed TMA results using SPME-GC-MS and steam distillation assay were very highly correlated. Modelling of TMA production throughout the shelf-life was successfully carried out using Gompertz modified model. Finally, the study of DTR evolution in regard to QIM score values allowed visualizing the early freshness decrease of cod fillets, authors propose thus DTR as a new tool for monitoring the early freshness evolution in fish. Authors note that further investigations have to be carried out to confirm the reliability of the method, nevertheless the use of hazardous chemical can already be significantly reduced by this SPME-GC-MS method.

### 5. Acknowledgment

Authors wanted to thank the whole sensory panel members for their valuable help in the QIM score analysis. Bruno Le Fur and Mathieu Volz are thanked for fillets preparation as well as Charlotte Himber and Sylvie Degremont for their kind technical assistance for steam distillation assays. A. Dehaut is grateful to the Nord-Pas de Calais Regional Council (France) and Anses for providing financial support for his PhD studies.

### 6. Abbreviations

DMA: Dimethylamine; DTR: DMA on TMA ratio; GC: gaz chromatography; LRI: Linear retention indices; MS: Mass spectrometry; PVB-N: Partial volatile basic nitrogen; QIM: Quality Index Method; SIM: Single ion monitoring; SPME: Solid phase microextraction; TCA: Trichloroacetic-acid; TIC: Total ion chromatogram; TMA: Trimethylamine; TVB-N: Total basic volatile nitrogen.

### 7. References

Autheman, C., & Widmann, L. (2010). Method and device for checking the freshness of a fish. *Patent No EP2189789 A1*.

Béné, A., Hayman, A., Reynard, E., Luisier, J., & Villettaz, J. (2001). A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method: Part II. Determination of the freshness of fish. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *72*(3), 204-207.

Bono, G., & Badalucco, C. (2012). Combining ozone and modified atmosphere packaging (MAP) to maximize shelf-life and quality of striped red mullet (*Mullus surmuletus*). *LWT-Food Science and Technology*, *47*(2), 500-504.

Børresen, T., Frederiksen, M., & Larsen, E. (2003). Traceability from catch to consumer in Denmark. In J. Luten, J. Oehlenschläger & G. Ólafsdóttir (Eds.), *Quality of Fish from Catch to Consumer: Labelling, Monitoring and Traceability*, (pp. 93-100). Wageningen: Wageningen Academic Publisher.

Cardenas Bonilla, A., Sveinsdóttir, K., & Martinsdóttir, E. (2007). Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control*, *18*(4), 352-358.

Chan, S. T., Yao, M. W., Wong, Y., Wong, T., Mok, C., & Sin, D. W. (2006). Evaluation of chemical indicators for monitoring freshness of food and determination of volatile amines in fish by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, *224*(1), 67-74.

Dalgaard, P., Mejlholm, O., & Huss, H. H. (1996). Conductance method for quantitative determination of *Photobacterium phosphoreum* in fish products. *Journal of Applied Bacteriology*, *81*(1), 57-64.

Dos Santos, J.-P., Iobbi-Nivol, C., Couillault, C., Giordano, G., & Méjean, V. (1998). Molecular analysis of the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *Journal of molecular biology*, *284*(2), 421-433.

Duflos, G., Leduc, F., N'Guessan, A., Krzewinski, F., Kol, O., & Malle, P. (2010). Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(15), 2568-2575.

EU regulation. (2005). Commission Regulation (EC) No. 2074/2005 of 5 December 2005. *Official Journal of European Union*, *L338*, 27-59.

Food and Agriculture Organization. (2012). The state of world fisheries and aquaculture.

Gibson, D. M., & Ogden, I. D. (1997). Total Viable Counts. In G. Olafsdóttir, J. Luten, P. Dalgaard, M. Carreche, V. Verrez-Bagnis, E. Martinsdóttir & K. Heia (Eds.), *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industries, Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness"* (Evaluation of Fish Freshness), AIR3CT94-2283., (pp. 147-150). Nantes (France).

Gillett, M. B., Suko, J. R., Santoso, F. O., & Yancey, P. H. (1997). Elevated levels of trimethylamine oxide in muscles of deep-sea gadiform teleosts: A high-pressure adaptation? *Journal of Experimental Zoology*, *279*(4), 386-391.

Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Current opinion in biotechnology*, *13*(3), 262-266.

Hall Jr, H. (1957). Correlation of the base strengths of amines. *Journal of the American Chemical Society*, *79*(20), 5441-5444.

- Howgate, P. (2006). A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *International journal of food science & technology*, 41(4), 341-353.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO fisheries technical paper*(348).
- Hyldig, G., Martinsdóttir, E., Sveinsdóttir, K., Schelvis, R., & Bremner, A. (2010). Quality index Methods. In L. M. L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*, (pp. 463-480): CRC Press.
- Jia, M., Zhang, Q. H., & Min, D. B. (1998). Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2744-2747.
- Koutsoumanis, K. (2001). Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1821-1829.
- Leduc, F., Krzewinski, F., Le Fur, B., N'Guessan, A., Malle, P., Kol, O., & Duflos, G. (2012). Differentiation of fresh and frozen/thawed fish, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*), using volatile compounds by SPME/GC/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2560-2568.
- Li, X., Zeng, Z., Zhou, J., Gong, S., Wang, W., & Chen, Y. (2004). Novel fiber coated with amide bridged-calix [4] arene used for solid-phase microextraction of aliphatic amines. *Journal of Chromatography A*, 1041(1), 1-9.
- Lopez-Amaya, C., & Marangoni, A. (2000). Phospholipases. In N. F. Haard & B. K. Simpson (Eds.), *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, (pp. 91-120): CRC Press.
- Malle, P., & Poumeyrol, M. (1989). A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *Journal of food protection*, 52(6), 419-423.
- Marzo, A., Monti, N., Ripamonti, M., Muck, S., & Martelli, E. A. (1990). Determination of aliphatic amines by gas and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 507, 241-245.
- Miller III, A., Scanlan, R. A., Lee, J. S., & Libbey, L. M. (1972). Quantitative and selective gas chromatographic analysis of dimethyl- and trimethylamine in fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(3), 709-711.
- Oehlenschläger, J., Luten, J., & Ólafsdóttir, G. (2003). Measurement of freshness quality of fish based on electrical properties. In J. Luten, J. Oehlenschläger & G. Ólafsdóttir (Eds.), *Quality of Fish from Catch to Consumer: Labelling, Monitoring and Traceability*, (pp. 237-249). Wageningen: Wageningen Academic Publisher.
- Oehlenschläger, J., & Sørensen, N. K. (1997). Criteria of seafish freshness and quality aspects. In G. Ólafsdóttir, J. Luten, P. Dalgaard, M. Carreche, V. Verrez-Bagnis, E. Martinsdóttir & K. Heia (Eds.), *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industries, Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness"*(Evaluation of Fish Freshness), AIR3CT94-2283., (pp. 30-35). Nantes (France).
- Ólafsdóttir, G., & Jónsdóttir, R. (2010). Volatile aroma compounds in Fish. In L. M. L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*, (pp. 97-117): CRC Press.
- Sotelo, C. G., & Rehbein, H. (2000). TMAO-Degrading Enzymes. In N. F. Haard & B. K. Simpson (Eds.), *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, (pp. 167-190): CRC Press.
- Timm, M., & Jørgensen, B. M. (2002). Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. *Food chemistry*, 76(4), 509-518.
- Veciana-Nogues, M., Albala-Hurtado, M., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. (1996). Validation of a gas-chromatographic method for volatile amine determination in fish samples. *Food chemistry*, 57(4), 569-573.
- Warm, K., Boknass, N., & Nielsen, J. (1998). Development of quality index methods for evaluation of frozen cod (*Gadus morhua*) and cod fillets. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 7(1), 45-59.
- Zwietering, M., De Koos, J., Hasenack, B., De Witt, J., & Van't Riet, K. (1991). Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1094-1101.

### III. Contribution de l'approche et perspectives

L'étude décrite a permis de développer une méthode de quantification spécifique de la TMA et la DMA par SPME-GC-MS suivi d'une application lors d'une étude sur l'altération de poissons.

Les premiers résultats obtenus avec cette méthode sont très prometteurs. L'utilisation du mode single ion monitoring (SIM) a permis de détecter, sélectionner et suivre spécifiquement les signaux issus de la TMA et de la DMA. De plus, l'utilisation d'un standard interne a rendu possible la normalisation des aires obtenues ce qui permet de s'affranchir des variations d'aires observables. Enfin lors du suivi, il a pu être montré que les valeurs obtenues pour la TMA étaient bien corrélées à celles des techniques de références utilisées, *i.e* mesure de l'ABVT/TMA et QIM score. En plus d'une excellente corrélation avec l'analyse de TMA par la méthode de distillation/titrage, la méthode de SPME-GC-MS conduit à l'obtention de teneurs très similaires.

Une autre innovation apportée par cette étude est la définition du concept de l'Azote Basique Volatil Partiel (ABVP) et de son utilisation. Ce concept a été défini « en écho » à l'ABVT, car il ne permet de suivre que les quantités de deux des amines volatiles rencontrées dans le poisson. La détection spécifique de ces amines et de la diméthylamine plus spécifiquement n'était pas novatrice en soit. Cependant, basée sur une réflexion issue des travaux de [Malle & Poumeyrol \(1989\)](#), une utilisation originale des données a pu être proposée. C'est en effet une réflexion menée sur l'utilisation du % P qui a conduit à l'utilisation du ratio de la DMA sur la TMA (DTR). Celui-ci permet d'illustrer l'importance relative de la part de produits de dégradation de l'OTMA résultant des voies de dégradation endogènes et exogènes. Le DTR s'est révélé être un marqueur intéressant pour les premières étapes du déclin de la fraîcheur correspondant aux scores les plus faibles de l'indice QIM.

Certaines optimisations de la méthode pourraient être envisagées. La première consisterait à accroître la taille de la colonne, de façon à augmenter la séparation des pics et donc la spécificité du signal. En second lieu, la méthode étant très sensible, il peut être raisonnablement envisagé de diminuer le niveau de dilution de l'échantillon de concert avec la diminution du temps d'extraction de façon à augmenter la cadence d'analyse de l'appareil. Ceci pourrait à terme constituer un levier d'amélioration de la rentabilité de l'analyse.

A moyen terme, de nouveaux suivis d'altération doivent être menés de façon à pouvoir utiliser les données à des fins de modélisation et élargir à d'autres espèces. Dans le prolongement des améliorations envisageables, une validation de la méthode doit être réalisée via des mesures de répétabilité, justesse, incertitude. Il serait également intéressant de pouvoir réaliser des essais inter-laboratoires.

A plus long terme, enfin, une réflexion sur la limitation de la destruction de la matrice analysée doit être amorcée. L'utilisation de technologies infra-rouges peut être raisonnable-

ment envisagée, cela a d'ailleurs fait l'objet de réflexions préliminaires en partenariat avec l'équipe du laboratoire de Physico-Chimie de l'Atmosphère de l'ULCO de Dunkerque.

Dans une approche d'évaluation de l'authenticité, la méthode pourrait également être testée sur des échantillons frais issus de décongélation. Cette pratique est considérée comme frauduleuse si aucune mention de l'étape de congélation n'est mentionnée. Or il est connu que lors de l'étape de congélation, de la DMA est produite via l'action de l'OTMA dé-méthylase. L'application de la quantification de l'ABVP sur des échantillons issus de décongélation devrait alors conduire à l'obtention de valeurs de DTR élevées. La cinétique du DTR d'échantillons issus de décongélation serait également un paramètre à étudier.

---

## **Partie III : Qualité de poissons transformés au sens large – applications de méthodes SPME-GC-MS et HPLC pour évaluer la qualité d’anchois.**

Cette dernière partie est consacrée à la qualité des produits dans un sens plus large. L’impact de la conservation sur la qualité d’anchois transformés a été étudié. Deux approches ont été réalisées en parallèle : une approche de suivi du volatilome grâce à la méthode SPME-GC-MS précédemment développée au laboratoire, évoquée dans la [Partie II.](#), et une approche de quantification des amines biogènes par HPLC.

Ces travaux ont été menés dans le cadre de l’appel à projet FranceAgriMer 2010 « Soutien à l’innovation dans la filière des produits de la pêche et de l’aquaculture ». Pour y répondre, une méthode d’analyse des composés volatils, développée au laboratoire et la technique de référence de dosage des amines biogènes ont été utilisées. Ceci a permis de réaliser une surveillance d’anchois salés et marinés tout au long de leurs processus de conservation.

Afin de suivre l’évolution des produits lors de leur conservation deux types de transformations ont été étudiés. Pour chacun des types de préparations, deux types de conservations sont testés : avec ou sans augmentation de la température de stockage. Les données ont été analysées grâce à des analyses en composantes principales, pour l’approche sur les composés volatils et des analyses de variance pour la partie sur les amines biogènes. Cette surveillance a permis d’avoir une double approche en suivant la qualité intrinsèque de l’aliment par l’étude des composés du volatilome. En parallèle, un paramètre de sécurité sanitaire des aliments a été suivi en quantifiant la production d’amines biogènes au sein des mêmes échantillons.

### **I. Principaux résultats obtenus**

Cette approche a fait l’objet de la rédaction d’un article scientifique, publié dans le *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

**Dehaut A, Himber C, Mulak V, Grard T, Krzewinski F, Le Fur B & Duflos G (2014) Evolution of volatile compounds and biogenic amines throughout the shelf-life of marinated and salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J. Agric. Food Chem.* 62 (32) : 8014-8022. <http://dx.doi.org/10.1021/jf5021736>**

Le contenu de cet article est communiqué sur les pages suivantes.

## Evolution of Volatile Compounds and Biogenic Amines throughout the Shelf life of Marinated and Salted Anchovies (*Engraulis encrasicolus*)

Alexandre Dehaut<sup>1</sup>, Charlotte Himber<sup>1</sup>, Véronique Mulak<sup>2</sup>, Thierry Grard<sup>3</sup>, Frédéric Krzewinski<sup>4</sup>, Bruno Le Fur<sup>2</sup> and Guillaume Duflos<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments – Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France

<sup>2</sup> Plate-forme d'Innovation Nouvelles Vagues, 15 - 17 Rue Magenta, 62200 Boulogne-sur-Mer, France

<sup>3</sup> Unité Biochimie des Produits Aquatiques – Université du Littoral-Côte d'Opale, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France

<sup>4</sup> Université de Lille I, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle – UGSF, Bâtiment C9 - Cité Scientifique, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

\*Corresponding author: E-mail: guillaume.duflos[at]anses.fr. Phone: +33 321 992 500. Fax: +33 321 991 725

**Producers of processed anchovies have developed hazard analysis and critical control points (HACCP) to guarantee the quality of their products. Nonetheless there is a lack of objective data to determine products' shelflife. The quality of a product is usually established on the basis of its safety and organoleptic properties. These parameters were assessed by monitoring the profiles of volatile compounds and quantitating six biogenic amines in samples of two types of processed anchovies during their shelflife. With regard to biogenic amines, quantities were below the regulatory limits throughout shelf life, except when a temperature abuse was applied for marinated samples. Moreover, this work highlights an optimum volatile profile at 5 and 6 months of storage for salted and marinated anchovies, respectively. This is the result of higher content of six aldehyde and nine ketone compounds, mainly from lipid oxidation.**

**Keywords:** Anchovies, Shelf life assessment, Volatile compounds, Biogenic amines, SPME-GC-MS

### 1. Introduction

Anchovies are one of the most caught fish species in the world with an estimated 3.5 million tons landed in 2010<sup>1</sup> and quantities consumed estimated at 369,000 tons in 2008. Anchovies can be processed using a wide range of techniques, such as salt ripening or marination in vinegar. Consumers are more and more aware of food quality and food safety. To manage such issues, the European Union has encouraged the application of good manufacturing practices and the development of hazard analysis and critical control points (HACCP). This approach has been developed in industry with specific applications for salted and marinated anchovies.

After their catch, anchovies can be ripened in salt or marinated in vinegar for a specified period and preserved until consumption. The shelf life of processed anchovies has only been empirically estimated and there is a real lack of objective information on how the properties of products change during storage. The assessment of optimal shelf life will ensure consumers a safe product with good quality.

Numerous studies have described the microbial flora present in salted and marinated anchovies. *Lactobacillus* and *Micrococcus* genera have been identified as the main bacteria present in processed marinated anchovies,<sup>2</sup> presence of *Enterobacteriaceae* was also demonstrated.<sup>3,4</sup> In salted anchovies, potential histaminogenic floras, such as *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus*, have been reported.<sup>3-5</sup> In a study on brined anchovies,<sup>6</sup> halophilic and psychrophilic floras

increased respectively at room temperature and in chilled conditions for samples conserved in low NaCl concentrations brines. A consensus is observed from previous authors to conclude that hygiene management provides a better control of these bacteria. In addition, a study on the ingredients added during the marination process showed that they have no impact on microbiological quality.<sup>7</sup>

Histamine is a biogenic amine resulting from the enzymatic decarboxylation of histidine. This molecule is responsible for many cases of food poisoning, with various symptoms.<sup>8</sup> Due to the high histidine content in their flesh, numerous fish families (Scombridae, Clupeidae or Engraulidae) show a high histamine risk. This is the major food safety risk encountered in such products. European regulations (Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 and Commission Regulation (EC) No. 1019/2013) have defined a limit of 400 mg.kg<sup>-1</sup> of histamine for a single product having undergone enzymatic maturation treatment in brine.<sup>9,10</sup> Other biogenic amines have been reported, especially tyramine, putrescine, cadaverine, spermine and spermidine.<sup>11-13</sup> Studies tracing biogenic amines during the storage period indicate changes in tyramine, histamine and tryptamine.<sup>11,13,14</sup> Very few studies have been carried out on the storage of marinated samples and focus mainly on the marination step itself.<sup>2,12</sup> Furthermore, refrigeration limits the biogenic amine content.<sup>6,13,14</sup> Analysis of volatile compounds in different food matrices has been increasing over the past decade.<sup>15-17</sup> The volatilome of a matrix can



be analyzed by trapping volatiles on a solid phase microextraction (SPME) fiber, in the headspace of a vial.<sup>18</sup> Finally, volatiles can be quantitated thanks to GC-MS device. To date, most studies on the volatile compounds of processed anchovies have been carried out to assess the maturation step of salted anchovies. Thus, indicators of maturation have been defined for salted anchovies as aldehydes, alkadienals, alcohols and ketones.<sup>19,20</sup> Acetaldehyde, 2-methylbutanal and 3-methylpropanal have been described as the most abundant odorant compounds in ripened anchovies.<sup>21</sup> On the basis of sensory analysis, the optimal maturation of salted anchovies has been estimated at close to 160 days.<sup>22</sup>

As anchovy processing is well documented, the goal of this study was focused on the less studied shelf life assessment of processed anchovies. To this end, both salt-ripened and marinated anchovies stored in different conditions, with and without temperature change, were studied. The first half of the study was focused on volatiles monitoring throughout storage, whereas the other half dealt with safety issues by quantitating biogenic amines.

## 2. Materials et Methods

### Chemicals

NaCl used for the headspace analysis was obtained from Oxoid (Dardilly, France). An *n*-paraffin mix, C<sub>5</sub> to C<sub>15</sub>, used for the calculation of the linear retention index (LRI), was acquired from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). All pure compounds used to improve identification reliability including ethanol, dimethyl sulfide, 2-methylpropanal, 2,3-butanedione, butanal, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 1-penten-3-ol, 2-ethylfuran, 1-pentanol, 2,3-hexanedione, hexanal, heptanal, benzaldehyde, 1-octen-3-ol, (*E,E*)-2,4-heptadienal, octanal, benzeneacetaldehyde, nonanal, (*E,Z*)-2,6-nonadienal and decanal were purchased from Sigma-Aldrich. All chemicals used for quantitating biogenic amines were obtained from Sigma-Aldrich, except perchloric acid, which was purchased from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France), and toluene and acetonitrile which were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

### Anchovy processing and preservation

Samples of anchovies were provided by the Association of French Fish Processing Industries (*Confédération des Industries de Traitement des Produits de la Pêche Maritimes* (CITPPM - Paris)) and held at the innovation platform *PFI-Nouvelles Vagues* (Boulogne-sur-Mer, France). Samples of anchovy fillets (*Engraulis encrasicolus*) consisted of salted or marinated anchovies having been processed and packed.

For salted anchovies, samples were prepared by immersion in brine. Fish were gutted and beheaded and then transferred to vats, with alternating layers of salt and anchovies. Saturated brine was then added.

Vats were covered and pressure was applied to the lids to remove trapped air. Anchovies were ripened at room temperature for several months (a minimum of 3 months). After ripening, samples were packed in glass jars.

Marinated fish samples were produced from fresh anchovies that were cleaned, beheaded, gutted, and filleted. After 24 h of freezing to manage parasite risk, anchovies were then immersed in a vinegar solution. A marination period of a few days (with a minimum of 24 h) under refrigeration was carried out. Anchovies were then covered with oil and vacuum packed.

All storage times applied in this study were set to exceed the shelf life advocated by the guide to good hygiene practices. Two types of temperature of storage were applied to samples: with (wR) or without rupture (w/oR). Concerning marinated samples, storage without any change of temperature consisted of incubation at 4°C. Storage with breaks in the temperature conditions consisted of one-third of the time at 4°C and the remaining two-thirds at 8°C. For the salted anchovies, storage without any change of temperature consisted of incubation at 15°C, to ensure their inherent shelf stability. Rupture applied in the temperature conditions consisted of two-thirds of the time at 15°C and the remaining one-third at 22°C.

### Analysis of the headspace by SPME-GC-MS

Analysis of the headspace of vials containing anchovy samples was carried out as described by Duflos *et al.*<sup>17</sup> Briefly, 50 g of flesh was added to 100 mL of NaCl solution in ultrapure water at 300 g.kg<sup>-1</sup> and then ground with a stomacher at 300 rpm for 2 min. Then, 45 g of filtrate was centrifuged at 10000 g, for 10 min at 4°C. The supernatant (11 mL) was then distributed in 20 mL SPME vials and tightly sealed. SPME vials were placed at 4°C on a refrigerated tray. The vials were handled using a combiPAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). The vial was placed for 10 min at 50°C and shaken at 500 rpm. A 75 µm CAR/PDMS fiber (Supelco, Lyon, France) was introduced into the headspace of the vial to collect volatile compounds for 40 min at 50°C under the same conditions. The fiber was then removed and placed for 1 min in splitless mode in a Merlin Microseal injector (at 250°C) of a gas chromatograph GC-2010 equipped with a QP2010 Plus mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The GC was equipped with an SLB-5 MS capillary column (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm) from Supelco (St-Quentin-Fallavier, France), and helium was used as carrier gas at a flow of 1.78 mL/min. The temperature conditions applied in the oven were as follows: 5 min at 35°C, increased to 100°C at a rate of 10°C/min, then increased to 280°C at a rate of 20°C/min, and maintained for 5 min. Spectrometric analysis was performed with the following conditions: interface temperature at 280°C, ionization voltage at 70 eV, mass range from

**Table 1: Settings used to perform automatic integration of the chromatograms.**

compound <sup>a</sup>	LRI <sup>d</sup>	reliability <sup>e</sup>	ions used for integration (m/z) <sup>f</sup>
ethanol <sup>c</sup>	477	MS, LRI, Std	<b>45</b> (46 43)
dimethyl sulfide	516	MS, LRI, Std	<b>62</b> (47 45 46 61)
trimethylamine <sup>c</sup>	522	tentative	<b>58</b> (59 42)
2-methylpropanal <sup>c</sup>	549	MS, LRI, Std	<b>43</b> (41 72)
2,3-butanedione <sup>c</sup>	586	MS, LRI, Std	<b>43</b> (86)
Butanal	591	MS, LRI, Std	<b>44</b> (43 72 57 41)
2-butanone <sup>b,c</sup>	595	Tentative	<b>43</b> (72 57)
3-methylbutanal <sup>c</sup>	652	MS, LRI, Std	<b>41</b> (44 58 43 39)
2-methylbutanal <sup>c</sup>	662	MS, LRI, Std	<b>41</b> (57 58 39)
1-penten-3-ol <sup>c</sup>	684	MS, LRI, Std	<b>57</b> (41 43 39 58)
2,3-pentanedione	697	Tentative	<b>43</b> (57 100)
2-ethylfuran <sup>b,c</sup>	700	MS, LRI, Std	<b>81</b> (96 53)
3-methyl-1-butanol	753	Tentative	<b>55</b> (42 43 70)
(E)-2-pentenal <sup>b,c</sup>	755	Tentative	<b>55</b> (84 83 41)
1-pentanol	768	MS, LRI, Std	<b>42</b> (55 41 70)
2,3-hexanedione	785	MS, LRI, Std	<b>43</b> (41 71 57)
hexanal <sup>b,c</sup>	799	MS, LRI, Std	<b>44</b> (56 41 43 72 82)
(E)-2-hexenal <sup>b,c</sup>	855	Tentative	<b>41</b> (42 39 83 69)
(Z)-4-heptenal <sup>c</sup>	898	Tentative	<b>41</b> (68 55 84 43)
heptanal <sup>b,c</sup>	900	MS, LRI, Std	<b>70</b> (41 55 57 81 44)
6-methyl-2-heptanone	956	Tentative	<b>43</b> (58 71 95 110 41)
(E)-2-heptenal <sup>b,c</sup>	960	MS, LRI, Std	<b>41</b> (68 55 84 43)
benzaldehyde <sup>b,c</sup>	970	MS, LRI, Std	<b>77</b> (106 105 51)
1-octen-3-ol	981	MS, LRI, Std	<b>57</b> (43 72 55 85)
2,3-octanedione <sup>b,c</sup>	983	Tentative	<b>43</b> (71 99)
(E,E)-2,4-heptadienal [1] <sup>b,c</sup>	997	MS, LRI, Std	<b>81</b> (110 53 41 67 79)
octanal	1002	MS, LRI, Std	<b>43</b> (44 56 84 69 100)
(E,E)-2,4-heptadienal [2] <sup>b,c</sup>	1014	tentative	<b>81</b> (110 53 41 67 79)
benzeneacetaldehyde <sup>b,c</sup>	1053	MS, LRI, Std	<b>91</b> (120 92 65)
(E)-2-octenal	1064	Tentative	<b>70</b> (55 41 83 57 69)
(E,E)-3,5-octadien-2-one [1] <sup>c</sup>	1073	tentative	<b>95</b> (43 81 109 124)
2-nonanone <sup>c</sup>	1091	Tentative	<b>43</b> (58 71 57 41)
(E,E)-3,5-octadien-2-one [2] <sup>c</sup>	1096	Tentative	<b>95</b> (43 81 109 124)
nonanal	1106	MS, LRI, Std	<b>57</b> (41 56 70 82 98)
(E,Z)-2,6-nonadienal <sup>b,c</sup>	1159	MS, LRI, Std	<b>41</b> (69 70 53)
decanal	1224	MS, LRI, Std	<b>43</b> (57 70 82 95 112)

<sup>a</sup> Numbers in brackets correspond to identifiers of peaks when a double peak is recorded on chromatograms for one identified compound. <sup>b</sup> Compounds used for multivariate analysis of marinated samples. <sup>c</sup> Compounds used for multivariate analysis of salted samples. <sup>d</sup> Linear retention index (LRI). <sup>e</sup> MS, LRI, Std: identification confirmed by mass spectrometry, LRI and pure standard; Tentative: tentative identification by mass spectrometry and LRI; tentative: tentatively identified compounds by mass spectrometry only. <sup>f</sup> Bold-face number, target ion for the method; numbers in parentheses, ions of reference to improve the integration process

m/z 33 to 200 and a scan frequency of 500 Hz. After each injection, the fiber was reconditioned at 300°C with helium flow for 10 min. Volatile compounds were automatically integrated by GC-MS postrun analysis (Shimadzu), with a given retention time, a target ion and reference ions for each volatile compound (**Table 1**). A normalization of each area (*i.e.*, division of the area by the sum of areas of all compounds) was realized. Compounds were identified by comparing them with mass spectra in the NIST 08 library database and with LRI found in the literature,<sup>23</sup> calculated using the equation in van den Dool and Kratz.<sup>24</sup> The headspace analysis was performed in duplicate for all samples.

## Separation and quantitation of biogenic amines

Quantitative assay of biogenic amines was carried out using the method recommended by Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 with high-performance liquid chromatography (HPLC).<sup>25,26</sup> Briefly, to extract biogenic amines, 5 g of anchovies was added to 100 µL of 1,3-diaminopropane used as internal standard and 10 mL of 0.2 M perchloric acid. The mix was blended with an Ultraturrax homogenizer and centrifuged at 7000 g for 5 min at 4°C. Then, 100 µL of supernatant was transferred in 300 µL of sodium carbonate and 400 µL of dansyl chloride, homogenized and kept in the dark at 60°C for 5 min. After derivatization, 100 µL of L-proline was added to remove excess dansyl chloride and kept in the dark at room temperature for 15 min. Then, 500 µL of toluene was added; after settling, the aqueous phase was frozen and the organic phase containing dansyl derivatives was specifically recovered and evaporated under nitrogen flow for 5 min. The dry residue was dissolved in 200 µL of acetonitrile, then filtered at 0.2 µm and injected in a high-performance liquid chromatograph. Biogenic amines were separated on a Kromasil C18 reverse phase column (250 mm x 4.6 mm x 5µm) from Alltech (Deerfield, IL, USA) with a water/acetonitrile gradient and a flow of 1 mL/min. After 30 min of separation, the chromatogram showed the peaks of the six biogenic amines: putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine, and spermine, and the internal standard (1,3-diaminopropane). Quantitation of biogenic amines was performed by calculating each response factor against 1,3-diaminopropane and using a calibration curve.

## Experimental design and statistical analysis

For the analysis of volatile compounds, marinated samples were studied for 9 months and salted samples for 18 months, to reach or exceed the shelf life recommended by good manufacturing practices. Samples were irregularly supplied by producers, but a minimum of two samples was analyzed in duplicate each month for the duration of the tested shelf life. A principal component analysis (PCA) was carried out on the data using open-source data-mining software Tanagra 1.4.<sup>27</sup> For each PCA, the two first principal components (PCs) were retained for interpretations. Correlations with PCs resulting from analysis determined which volatile compounds best characterized each group, as visualized by PCA. Experiments on biogenic amines were designed as follows: for each pair of parameters (methods of preparation and storage conditions), five samples were taken for initial measurements (M0) and threesamples for remaining months. Samples were analyzed every 2 months for 8 months (marinated samples) and 14 months (salted anchovies). For each analysis, measures were performed in duplicate. Comparisons of average results

**Table 2: Correlation coefficients between chemical compounds and the two first axes determined by PCA. Three PCA were carried out per maturation process.**

Whole data set		Marinated anchovies	
		Preoptimum phase	Postoptimum phase
PC 1	benzaldehyde ( <b>0.93</b> ) <sup>a</sup>	benzaldehyde ( <b>0.95</b> )	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [2] ( <b>0.96</b> )
	2,3-octanedione ( <b>0.88</b> )	( <i>E</i> )-2-heptenal ( <b>0.93</b> )	heptanal ( <b>0.95</b> )
	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [2] <sup>b</sup> ( <b>0.86</b> )	2,3-octanedione ( <b>0.9</b> )	hexanal ( <b>0.83</b> )
	( <i>E</i> )-2-heptenal ( <b>0.85</b> )	( <i>E,Z</i> )-2,6-nonadienal ( <b>0.86</b> )	( <i>E</i> )-2-heptenal ( <b>0.83</b> )
	benzeneacetaldehyde ( <b>0.83</b> )	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [2] ( <b>0.81</b> )	( <i>E</i> )-2-hexenal ( <b>0.83</b> )
	heptanal ( <b>0.82</b> )	benzeneacetaldehyde ( <b>0.78</b> )	( <i>E</i> )-2-pentenal ( <b>0.8</b> )
	( <i>E,Z</i> )-2,6-nonadienal ( <b>0.75</b> )	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [1] ( <b>0.75</b> )	2,3-octanedione ( <b>0.76</b> )
hexanal ( <b>0.71</b> )		2-ethylfuran ( <b>0.74</b> )	
		benzaldehyde ( <b>0.71</b> )	
(Inertia)	(49.3%) <sup>c</sup>	(48.8%)	(56.4%)
PC 2	( <i>E</i> )-2-pentenal ( <b>0.92</b> )	( <i>E</i> )-2-hexenal ( <b>-0.95</b> )	( <i>E,Z</i> )-2,6-nonadienal ( <b>-0.9</b> )
	2-ethylfuran ( <b>0.92</b> )	( <i>E</i> )-2-pentenal ( <b>-0.91</b> )	
	( <i>E</i> )-2-hexenal ( <b>0.84</b> )	2-ethylfuran ( <b>-0.9</b> )	
(Inertia)	(27.9%)	(29.9%)	(25.6%)

Whole data set		Salted anchovies	
		Preoptimum phase	Postoptimum phase
PC 1	( <i>E,E</i> )-3,5-octadien-2-one [1] ( <b>0.97</b> )	( <i>E,E</i> )-3,5-octadien-2-one [1] ( <b>0.98</b> )	( <i>E,E</i> )-3,5-octadien-2-one [2] ( <b>0.95</b> )
	( <i>Z</i> )-4-heptenal ( <b>0.96</b> )	heptanal ( <b>0.97</b> )	( <i>E,E</i> )-3,5-octadien-2-one [1] ( <b>0.93</b> )
	( <i>E,E</i> )-3,5-octadien-2-one [2] ( <b>0.95</b> )	2-nonanone ( <b>0.97</b> )	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [1] ( <b>0.91</b> )
	heptanal ( <b>0.95</b> )	( <i>Z</i> )-4-heptenal ( <b>0.97</b> )	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [2] ( <b>0.91</b> )
	( <i>E</i> )-2-heptenal ( <b>0.94</b> )	( <i>E,E</i> )-3,5-octadien-2-one [2] ( <b>0.97</b> )	( <i>Z</i> )-4-heptenal ( <b>0.89</b> )
	hexanal ( <b>0.94</b> )	( <i>E</i> )-2-heptenal ( <b>0.95</b> )	( <i>E</i> )-2-heptenal ( <b>0.85</b> )
	2-nonanone ( <b>0.92</b> )	hexanal ( <b>0.95</b> )	( <i>E</i> )-2-pentenal ( <b>0.82</b> )
	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [2] ( <b>0.92</b> )	benzaldehyde ( <b>0.92</b> )	benzeneacetaldehyde ( <b>0.78</b> )
	2,3-octanedione ( <b>0.87</b> )	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [2] ( <b>0.9</b> )	hexanal ( <b>0.75</b> )
	benzaldehyde ( <b>0.85</b> )	benzeneacetaldehyde ( <b>0.9</b> )	heptanal ( <b>0.73</b> )
( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [1] ( <b>0.79</b> )	2,3-octanedione ( <b>0.87</b> )	2,3-octanedione ( <b>0.71</b> )	
benzeneacetaldehyde ( <b>0.77</b> )	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal [1] ( <b>0.72</b> )	trimethylamine ( <b>-0.84</b> )	
	1-penten-3-ol ( <b>-0.7</b> )		
(Inertia)	(52.9%)	(57.7%)	(45.4%)
PC 2	( <i>E</i> )-2-pentenal ( <b>-0.83</b> )	3-methylbutanal ( <b>-0.78</b> )	3-methylbutanal ( <b>0.85</b> )
		2-methylbutanal ( <b>-0.74</b> )	2-nonanone ( <b>0.76</b> )
		( <i>E</i> )-2-hexenal ( <b>-0.72</b> )	2-methylbutanal ( <b>0.73</b> )
(Inertia)	(12.0%)	(15.2%)	(18.2%)

<sup>a</sup> Coefficient in parenthesis correspond to the correlation of the volatile compound with the PC concerned (row) for a given PCA (column). <sup>b</sup> Numbers in brackets correspond to identifiers of peaks when a double peak is recorded on chromatograms for one identified compound. <sup>c</sup> Percentage in parenthesis correspond to the inertia harbored by the PC concerned for a given PCA (e.g. 49.3% means that PC1 harbored 49.3% of the dataset inertia in the PCA achieved on the marinated anchovies whole dataset).

of assays, for biogenic amines, were carried out using nonparametric Kruskal-Wallis tests and *post hoc* pairwise Wilcoxon rank sum tests because the results did not follow a normal distribution and there was not homoscedasticity of variances. The tests were performed using the package "stats" from R software version 3.0.0. Kruskal-Wallis tests leading to significant results ( $p$ -value < 0.05) indicated that significant differences were observed for the concentration of the biogenic amines with respect to storage time. Pairwise Wilcoxon rank sum tests with  $p$ -values < 0.05 indicated that the two compared means were significantly different.

### 3. Results

#### Selection of the volatile compounds for PCA analysis

From the whole data set obtained by chromatogram integration, 36 compounds were selected as useful

for our analysis (Table 1). These mostly included aldehydes, ketones and alcohols and three compounds that do not belong to these chemical classes: 2-ethylfuran (furan), dimethyl sulfide (organosulfur) and trimethylamine (TMA) (amine).

Among the compounds selected for statistical analysis, none allowed differentiation of storage conditions with or without rupture (data not shown). This study thus focused on the change in the volatilome with regard to each method of anchovy preparation.

#### Volatile compounds in marinated samples

Integration failed to retrieve all of the volatile compounds for each sample. Compounds or sample duplicates with missing values were removed from the data set. Thus, of the 36 compounds, only 13 were analyzed as shown in Table 1. Among the samples, only one sample was completely removed (*i.e.*, both duplicates), a sample preserved for 9 months without

any change in storage temperature. For the remaining samples, only four samples had data from only one duplicate.

**Figure 1** illustrates the results of the PCA according to storage time. The global analysis (**Figure 1 a**) showed that samples were relatively homogeneous, especially in the first months of storage (from M0 to M4). Groups of sample storage were differentiated primarily along the x-axis. The composition of volatile compounds appeared to change during the first 5 months of preservation, and the product appeared to stabilize in the following months. **Table 2** shows that the samples of the fifth month stand out from the other months with higher proportions of (*E,E*)-2,4-heptadienal, (*E,Z*)-2,6-nonadienal, 2,3-octanedione, (*E*)-2-heptenal, hexanal, heptanal, benzeneacetaldehyde and benzaldehyde. The fifth month may be designated as the month when the volatile compounds reach their optimum with regard to the storage of marinated anchovies.

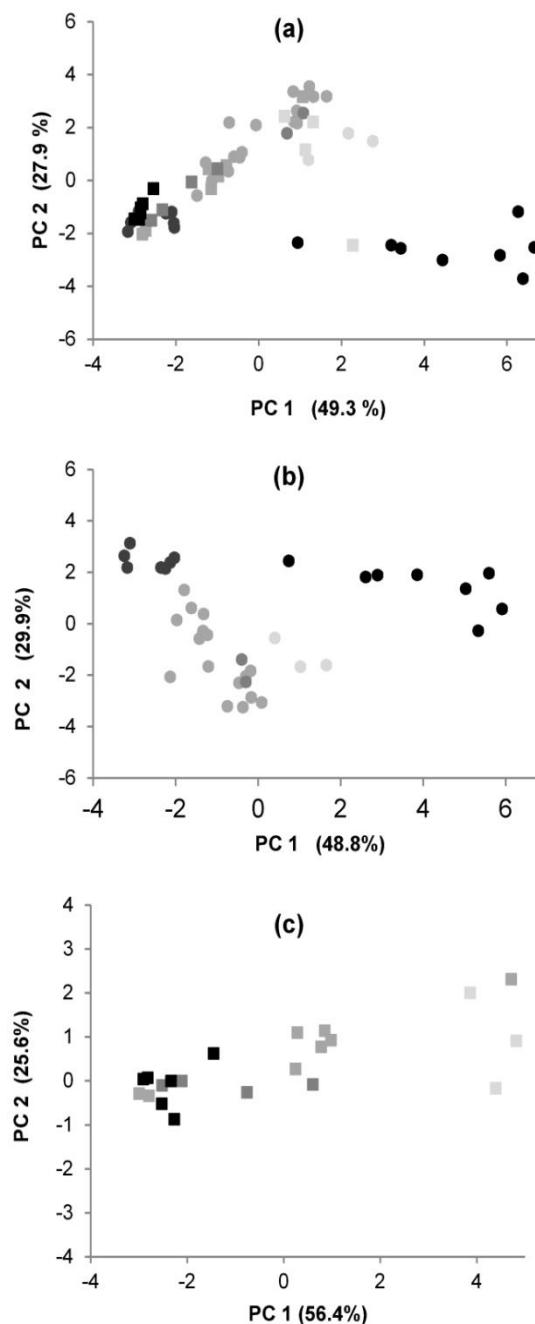
On the basis of this 5 month optimum, the data set was then split into a preoptimal phase and a postoptimal phase. The preoptimal phase (**Figure 1 b**) shows that months 0-4 are characterized by smaller proportions in the above-mentioned compounds compared to the fifth month, except for hexanal and heptanal. Moreover, months 4 and 5 have higher proportions of 2-ethylfuran, (*E*)-2-hexenal, and (*E*)-2-pentenal than the other months. In the postoptimal phase (**Figure 1 c**), groups were differentiated only along the x-axis. Thus from month 6 to month 9, proportions of 2,3-octanedione, (*E,E*)-2,4-heptadienal, 2-ethylfuran, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-pentenal, (*E*)-2-heptenal, hexanal, heptanal, and benzeneacetaldehyde decreased.

Splitting the dataset into two phases according to this putative month 5 optimum showed an overall decrease in the proportions of 2-ethylfuran, (*E*)-2-hexenal and (*E*)-2-pentenal throughout the study. However, for some compounds, proportions increased up until month 5 before decreasing, for example, 2,3-octanedione, 2,4-heptadienal, (*E*)-2-heptenal, and benzeneacetaldehyde.

#### Volatile compounds in salted samples

For these samples also, integration failed to retrieve all the volatile compounds for each duplicate. Samples with missing values were discarded. Ultimately, data from 24 compounds of the 36 were analyzed as shown in **Table 1**. Five duplicates were discarded due to missing data.

**Figure 2** shows the results according to storage time. The storage month groups were differentiated mainly along the x-axis (**Figure 2 a**). Groups were relatively homogeneous, especially during the first months of storage (from M0 to M4). This can be observed, in particular, for samples analyzed at the initial stage. A change in the profile of volatile compounds was recorded at 6 months. Month 6 thus appeared to corre-



**Figure 1:** PCA obtained on the marinated anchovy samples for the whole dataset (a), from the pre-optimal phase (b) and from the post-optimal phase (c). Symbols indicate the tested month (M) of storage: (M0 ●, M2 ●, M3 ●, M4 ●, M5 ●, M6 ■, M7 ■, M8 ■ and M9 ■).

spond to the volatile compound optimum for salted anchovies. **Table 2** shows that samples from month 2 stand out with higher proportions of 2-pentenal. Samples from month 6 differ from the other groups, probably due to higher relative quantities in the following compounds: (*E,E*)-2,4-heptadienal, (*Z*)-4-heptenal, (*E*)-2-heptenal, benzeneacetaldehyde, 2-nonanone, (*E,E*)-3,5-octadien-2-one, heptanal, hexanal, 2,3-octanedione, and benzaldehyde. Finally, samples corresponding to the last few months (10, 16, and 18) do not appear different from each other.

According to this putative optimum, the data set was divided into two phases, a preoptimal phase and a postoptimal phase. The PCA of the preoptimal phase (**Figure 2 b**) shows that months 0, 2, and 6 were characterized by higher proportions of (*E*)-2-hexenal, 2-methylbutanal, and 3-methylbutanal compared to month 4. In the same phase, month 6 differs from the other months, showing higher levels for the compounds described for the overall data set and lower proportions of 1-penten-3-ol. The PCA of the postoptimal phase (**Figure 2 c**) shows that month 8 stands out due to higher levels of 2,3-octanedione, (*E,E*)-2,4-heptadienal, (*E*)-2-pentenal, (*E,E*)-3,5-octadien-2-one, (*Z*)-4-heptenal, (*E*)-2-heptenal, benzeneacetaldehyde, heptanal and hexanal. Moreover, months 10-16 show higher relative quantities in TMA. Lastly, there seem to be no differences between month 16 and month 18: they both show higher proportions of 2-methylbutanal, 3-methylbutanal and 2-nonanone compared to previous months.

During the two phases, relative quantities of 2,3-octanedione, (*E,E*)-2,4-heptadienal, (*Z*)-4-heptenal, (*E*)-2-heptenal, (*E,E*)-3,5-octadien-2-one, hexanal, heptanal, and benzeneacetaldehyde appeared to increase until reaching the optimum level before decreasing. During the same period, a continuous increase of 2-nonanone was recorded.

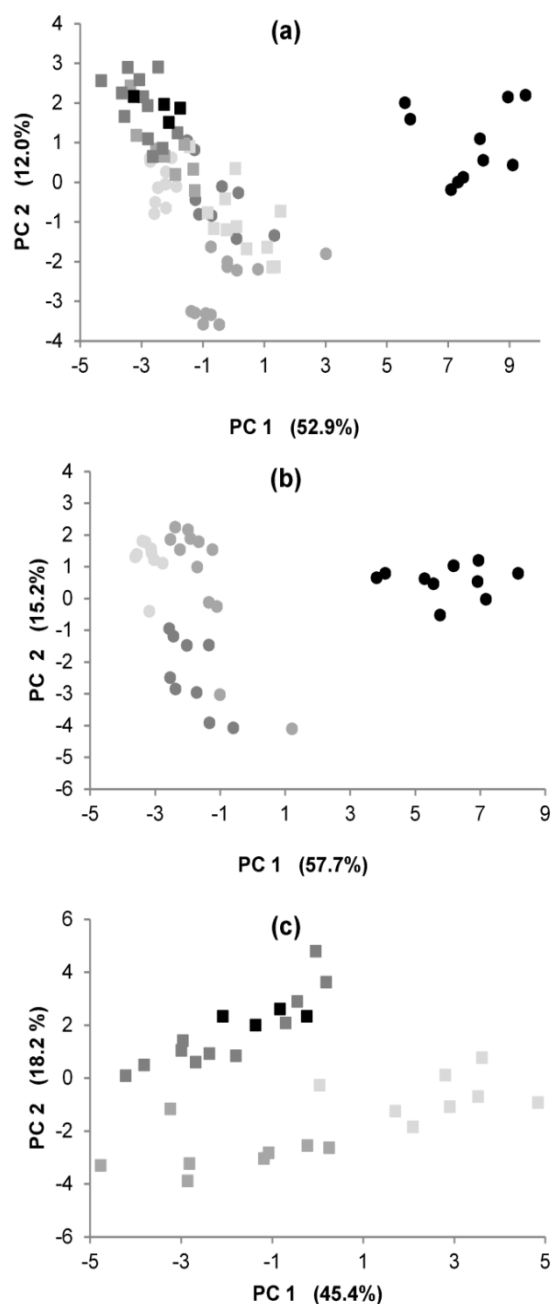
#### Changes in biogenic amines

The overall results are summarized in **Table 3**. In the large majority of cases, no samples ever exceeded the limit defined by the regulation (Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 and Commission Regulation (EC) No. 1019/2013) during the study. Only marinated anchovies that underwent a break in the cold chain showed a significant change ( $p$ -value < 0.001) in the quantity of histamine, exceeding the prescribed limit from month 6. With regard to putrescine, cadaverine, and tyramine, a significant change ( $p$ -value  $\leq$  0.003) was also demonstrated with a maximum concentration of nearly 50 mg/kg between months 4 and 6.

Finally, a significant change ( $p$ -value < 0.001) in the concentrations of spermidine and spermine was recorded, although levels remained low, near 20 mg/kg. The experiment carried out on samples that did not undergo a break in the cold chain shows similar patterns, although all of the amine concentrations were lower. Thus, the concentrations of histamine, putrescine, cadaverine, tyramine, spermidine, and spermine did not exceed the threshold values of 40 mg/kg. With regard to the salted anchovies, although significant changes were recorded throughout the storage of samples, the threshold of 20 mg/kg was never reached for any amine at any storage time or either storage condition.

#### 4. Discussion

Principal component analysis helped to visualize a si-



**Figure 2:** PCA obtained on the salted samples for the whole dataset (a), from the pre-optimal phase (b) and from the post-optimal phase (c). Symbols indicate the tested month (M) of storage (M0○, M2●, M4○, M6●, M8□, M10■, M16□ and M18■).

gnificant proportion of the variance contained in the data sets analyzed. For each analysis, principal components explained at least 64% of the variability in the whole data set, which is an acceptable level (**Figure 1 and 2**).

In these analyses, a difference in the volatile profile between marinated and salted samples was observed. Generally, it was found that the marinated samples did not show as many compounds as those identified for salted anchovy samples. As a result, multivariate statistical analysis could not be carried

**Table 3:** Changes in the concentrations of biogenic amines throughout a shelf life of 14 months<sup>a</sup>. Values are listed according to curing method and storage conditions with (wR) or without (w/oR) rupture in the temperature of storage.

	histamine (mg.kg <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>				putrescine (mg.kg <sup>-1</sup> )			
	marinated		salted		marinated		salted	
	wR	w/oR	wR	w/oR	wR	w/oR	wR	w/oR
M0	4 ± 1 a	4 ± 1 a	1 ± 1 a	1 ± 1	4 ± 1 a	4 ± 1 a	3 ± 1 a	3 ± 1 a
M2	11 ± 2 b	6 ± 1 a	n.d. <sup>d</sup>	2 ± 2	4 ± 0 a	3 ± 1 a	2 ± 2 a	3 ± 2 ab
M4	28 ± 15 b	21 ± 11 b	1 ± 2 a	1 ± 2	25 ± 14 b	17 ± 8 b	3 ± 1 a	2 ± 0 ab
M6	2826 ± 2356 c	4 ± 2 a	n.d.	n.d.	48 ± 13 b	4 ± 0 a	7 ± 1 b	7 ± 1 b
M8	369 ± 269 c	7 ± 4 ab	n.d.	n.d.	21 ± 6 b	4 ± 1 a	3 ± 1 a	4 ± 0 b
M10			n.d.	n.d.			6 ± 4 ab	5 ± 1 ab
M12			1 ± 1 a	n.d.			8 ± 1 b	6 ± 1 b
M14			1 ± 1 a	n.d.			4 ± 0 a	4 ± 1 ab
<i>p</i> <sup>c</sup>	< 0.001	0.003	0.007	0.291	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001
	tyramine (mg.kg <sup>-1</sup> )				cadaverine (mg.kg <sup>-1</sup> )			
	marinated		salted		marinated		salted	
	wR	w/oR	wR	w/oR	wR	w/oR	wR	w/oR
M0	14 ± 3 a	14 ± 3 a	7 ± 2 a	7 ± 2 a	15 ± 2 a	15 ± 2 a	12 ± 2 a	12 ± 2 a
M2	4 ± 0 b	5 ± 2 b	7 ± 1 a	7 ± 1 a	n.d.	12 ± 1 a	2 ± 1 b	2 ± 2 ab
M4	38 ± 25 a	20 ± 11 b	4 ± 1 a	3 ± 1 a	48 ± 23 b	36 ± 13 b	3 ± 0 b	4 ± 1 ab
M6	6 ± 3 b	2 ± 1 a	10 ± 1 a	9 ± 1 a	36 ± 8 b	38 ± 1 b	7 ± 1 ab	8 ± 1 ab
M8	10 ± 9 ab	3 ± 2 b	5 ± 1 a	4 ± 0 a	14 ± 4 a	14 ± 1 a	4 ± 1 b	3 ± 0 b
M10			8 ± 2 a	5 ± 1 a			7 ± 2 ab	5 ± 1 ab
M12			10 ± 2 a	5 ± 0 a			6 ± 1 ab	4 ± 1 b
M14			5 ± 0 a	4 ± 0 a			4 ± 0 ab	3 ± 0 b
<i>p</i>	0.003	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	spermidine (mg.kg <sup>-1</sup> )				spermine (mg.kg <sup>-1</sup> )			
	marinated		salted		marinated		salted	
	wR	w/oR	wR	w/oR	wR	w/oR	wR	w/oR
M0	10 ± 3 a	10 ± 3 a	18 ± 3 a	18 ± 3 a	2 ± 1 a	2 ± 1 a	4 ± 1 a	4 ± 1 a
M2	22 ± 2 b	20 ± 5 b	15 ± 4 ab	14 ± 3 ab	13 ± 2 b	12 ± 4 b	11 ± 4 ab	11 ± 3 b
M4	8 ± 3 a	13 ± 4 ab	9 ± 4 ab	13 ± 1 ab	6 ± 3 ab	8 ± 2 b	3 ± 0 ab	2 ± 1 ab
M6	7 ± 3 a	10 ± 1 a	8 ± 1 b	8 ± 1 b	n.d.	1 ± 1 a	n.d.	n.d.
M8	15 ± 3 ab	11 ± 1 a	8 ± 1 b	7 ± 1 b	1 ± 1 a	5 ± 2 b	2 ± 2 b	4 ± 1 ab
M10			11 ± 2 ab	9 ± 1 ab			n.d.	n.d.
M12			9 ± 2 b	8 ± 0 b			n.d.	2 ± 1 ab
M14			8 ± 0 b	7 ± 2 b			3 ± 0 b	4 ± 0 ab
<i>p</i>	< 0.001	0.013	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

<sup>a</sup> Means with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) throughout the tested period. <sup>b</sup> Means of the concentrations  $\pm 2$  standard-error of the mean (95% confidence interval). <sup>c</sup> *p* value calculated with the Kruskal-Wallis test. <sup>d</sup> n.d.: values below the limit of quantitation.

out on the same number of compounds for both types of processing methods. A significant amount of acetic acid in the headspace of marinated samples may explain the lower number of compounds recovered, possibly due to saturation of the SPME fiber.

With regard to the nature of compounds allowing the discrimination among samples, a large majority originated from the degradation of fatty acids of the  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 series (Table 4). This origin is consistent with observations of increased levels of free fatty acids throughout the maturation process of anchovies.<sup>3, 28</sup> The presence of products of catabolism of amino acids was also recorded as well as some products such as TMA or 2-ethylfuran, which are frequently observed in fish matrices. All compounds selected for the analysis of marinated samples were used in the statistical analysis of salted anchovy data set. Among the compounds included in the analysis of salted samples, five come from the degradation of fatty acids, three from the catabolism of amino acids, two

from sugar degradation, and one from the degradation of trimethylamine N-oxide (TMAO) (Table 4).

The PCA traced the changes in the composition of the headspace over time. From those analyses, volatile optima appear to occur at 6 months for salted anchovies and at 5 months for marinated anchovies. Only a small change in the composition of volatile compounds was recorded after this period of storage.

The results of salted samples corroborate those of a study carried out on the selection of sensory attributes for the evaluation of the maturation of processed anchovies: the smell of Iberian ham is a reliable marker of maturation of salted anchovies.<sup>22</sup>

SPME-GC-MS studies have specifically shown the presence of heptanal, with a maximum at the sixth month of storage. This compound is described in the literature as having a characteristic odor of ham, fat, even rancidity.<sup>29,30</sup> Moreover, higher proportions of 2,3-octanedione, 2-nonanone, (*Z*)-4-heptenal, (*E*)-2-heptenal, benzaldehyde, hexanal, benzeneacetalde-

**Table 4: Compounds used in the multivariate statistical analysis of anchovies and their assumed origins.**

Compounds	Assumed origin
ethanol	Fermentation of sugar
trimethylamine	Trimethylamine-N oxide (TMAO) reduction, degradation of choline <sup>36</sup>
2-methylpropanal	Amino-acid catabolism (L-valine) <sup>37</sup>
2,3-butanedione	Fermentation of sugar <sup>38,39</sup>
2-butanone	Degradation of 2,3-butanedione <sup>40</sup>
3-methylbutanal	Amino-acid catabolism (L-leucine) <sup>37</sup>
2-methylbutanal	Amino-acid catabolism <sup>41</sup>
1-penten-3-ol	Eicosapentaenoic acid (EPA) ( $\omega$ -3) oxidation <sup>42</sup>
(E)-2-pentenal	$\alpha$ -Linolenic acid (ALA) ( $\omega$ -3) oxidation <sup>43</sup>
hexanal	Linoleic acid (LA) ( $\omega$ -6) oxidation and 2,4-decadienal degradation <sup>43-45</sup>
2-ethylfuran	$\omega$ -3 fatty acid oxidation (ALA, EPA, Docosaheptaenoic acid (DHA)) <sup>46</sup>
(E)-2-hexenal	EPA ( $\omega$ -3) oxidation <sup>42</sup>
(Z)-4-heptenal	EPA ( $\omega$ -3) oxidation <sup>42</sup>
(E)-2-heptenal	Linoleic acid (LA) ( $\omega$ -6) oxidation <sup>47</sup>
heptanal	Auto-oxidation of MUFA and PUFA ( $\omega$ -6) <sup>36,48</sup>
benzaldehyde	Amino-acid catabolism <sup>37,40</sup>
2,3-octanedione	Lipid oxidation <sup>49</sup>
(E,E)-2,4-heptadienal	EPA and ALA ( $\omega$ -3) oxidation <sup>42,50</sup>
benzeneacetaldehyde	Amino-acid catabolism <sup>40</sup>
2-nonanone	Lipid auto-oxidation
(E,E)-3,5-octadien-2-one	EPA ( $\omega$ -3) auto-oxidation <sup>42</sup>
(E,Z)-2,6-nonadienal	$\omega$ -3fatty acid oxidation (ALA, EPA, DHA) <sup>51</sup>

hyde, (E,E)-2,4-heptadienal and (E,E)-3,5-octadien-2-one were recorded for these samples. After 6 months, the proportions of all compounds decreased except for benzaldehyde. Among the above-mentioned compounds, only 2,3-octanedione and 2-nonanone have never been described in the total volatile profile in previous studies on ripened anchovy maturation.<sup>19-21</sup> On the basis of the aromatic qualifiers defined by Leduc *et al.*,<sup>16</sup> odors can be divided into the following classes: earthy/woody smell, vegetable odor, and floral smell.<sup>30-32</sup> Moreover, anchovy samples from the 10<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> month are characterized by higher proportions of TMA compared to the 8<sup>th</sup> month. This suggests that the increase in total volatile basic nitrogen (TVB-N), the chemical class to which TMA belongs,<sup>33</sup> recorded during the anchovy maturation process<sup>3</sup> continues during storage.

For marinated anchovies, the fifth month appears to mark the volatilome optimum of the product. These samples were characterized by a high proportion of benzeneacetaldehyde, (E,E)-2,4-heptadienal, (E)-2-heptenal, benzaldehyde, (E,Z)-2,6-nonadienal, and 2,3-octanedione compared with other months. Only 2,3-octanedione has never been described in other studies on salted anchovies<sup>19-21</sup> (there are no published studies on the volatilome of marinated anchovies). The proportion of the above-mentioned compounds decreased except benzaldehyde. These compounds are characterized by respective odors of moss/solvent,<sup>32</sup> fat/soap,<sup>34,35</sup> cardboard/fat,<sup>30,31</sup> almond/woody<sup>29,30</sup> and cucumber for the latter two.<sup>31,34</sup>

Five compounds were present in maximum amounts at the volatilome optimum of processed anchovies,

whatever the method of preparation: (E,E)-2,4-heptadienal, benzeneacetaldehyde, (E)-2-heptenal, benzaldehyde and 2,3-octanedione. To our knowledge, this is the first time that the latter compound has been identified, only by MS and LRI, as a component of volatile compounds in anchovies. 2-Nonanone, hexanal and (E,E)-3,5-octadien-2-one appeared to be more specific to salt-ripened anchovies.

Analysis of biogenic amines showed high variability in quantities in similar samples principally in marinated anchovies stored with rupture in the temperature conditions. This probably reflects the heterogeneity of the fish that make up the samples. The initial microbiological load of the product, hygiene measures and the presence of bruises are all factors that may influence the degradation of anchovies. Despite the high variability of two samples with rupture in the storage conditions, the lower quantities observed exceeded 50 mg.kg<sup>-1</sup>, the concentration at which the first allergic symptoms could be observed.

The type of anchovy processing has an impact on the quantity of biogenic amines, because marinated samples had higher concentrations of histamine, cadaverine, putrescine, and tyramine than salted anchovies. This fact can be explained by the bacteriostatic action of salt ripening, whereas the development of lactic flora, potential producers of biogenic amines, is still possible in acidic conditions.<sup>2</sup>

The major factor that determines the production of biogenic amines, as highlighted in our study and previous papers,<sup>6,13,14</sup> is storage temperature. If the cold chain is broken during storage of marinated anchovies, the regulatory threshold of 400 mg.kg<sup>-1</sup> is excee-

ded. However, it should be noted that the producing process, mainly in salt-ripening treatment, limits the bacterial development at the origin of histamine production.<sup>52</sup>

The present work helps to visualize the changes in the profile of volatile compounds and safety for both types of anchovy processing techniques. It was shown that irregularities in temperatures of storage lead to the development of biogenic amines in marinated samples, whereas no risk was observed in salted samples. In contrast, the modification of temperature conditions did not affect the volatile profile of marinated or salted samples for which the volatilome optimum is respectively reached after 5 and 6 months. None of these results lead to the conclusion of a food safety risk caused by biogenic amines when anchovies are stored in good temperature conditions. However, the study of volatilomes suggests that marinated and salted anchovies should be consumed within 5-6 months after maturation, respectively, so as to guarantee a product with optimal flavor for consumers.

#### 5. Abbreviations used

ALA:  $\alpha$ -Linolenic acid, CAR/PDMS: Carboxen/polydimethylsiloxane, DHA: Docosahexaenoic acid, EPA: Eicosapentaenoic acid, GC: Gas chromatography, HACCP: Hazard analysis critical control point, HPLC: High performance liquid chromatography, LA: Linoleic acid, LRI: Linear retention index, MS: Mass spectrometry, MUFA: Monounsaturated fatty acid, PCA: Principal component analysis, PUFA: Polyunsaturated fatty acid, SPME: Solid phase microextraction, TMA: Trimethylamine, TMAO: Trimethylamine N-oxide, TVB-N: Total volatile basic nitrogen, wR: with rupture & w/oR: without rupture.

#### 6. Acknowledgments

We thank Assi N'Guessan, Ossarath Kol and Philippe Droin for their critical reviews of this article and Ophélie Frottier and Paul Morieux for their kind technical assistance. Funds for this study, for which the CITPPM was project leader, were provided by FranceAgriMer, run by the French Ministry of Agriculture, as part of the program "Soutien à l'innovation dans la filière des produits de la pêche et de l'aquaculture – Edition 2010". A. Dehaut is grateful to the Nord-Pas de Calais Regional Council (France) and Anses for providing financial support for his Ph.D. studies.

#### 7. Reference

1.FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2012. In Food and Agriculture Organization. FAO: Rome Italy, 2012; p 24.  
2.Fuselli, S.; Casales, M.; Fritz, R.; Yeannes, M., Microbiology of the marination process used in anchovy

(*Engraulis anchoita*) production. *LWT-Food Sci. Tech.* **1994**, *27*, 214-218.

3.Hernández-Herrero, M. M.; Roig-Sagués, A. X.; López, S. E. I.; Rodríguez-Jerez, J. J.; Mora-Ventura, M. T., Total volatile basic nitrogen and other physicochemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies. *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 344-347.

4.El-Filali, F.; Hanoune, S.; Khbaya, B.; M'Handi, N.; Kaaya, A. In *Histamine and Microbiological Change during the Storage of Semi-Preserved Anchovies*, 2<sup>nd</sup> workshop on fish technology, utilization and quality assurance in Africa, Agadir, Morocco, Nov 24-28, 2008; Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Rome, Italy, 2009; pp 133-137.

5.Rodríguez-Jerez, J.; Lopez-Sabater, E.; Hernandez-Herrero, M.; Mora-Ventura, M., Histamine, putrescine and cadaverine formation in Spanish semi-preserved anchovies as affected by time/temperature. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 993-997.

6.Karaçam, H.; Kutlu, S.; Köse, S., Effect of salt concentrations and temperature on the quality and shelf-life of brined anchovies. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2002**, *37*, 19-28.

7.Sen, M.; Temelli, S., Microbiological and chemical qualities of marinated anchovy prepared with different vegetable additives and sauce. *Rev. Méd. Vét.* **2003**, *154*, 703-708.

8.EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* **2011**, *9*, 2393.

9.Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2007**, *322*, 1-18.

10.Commission Regulation (EC) No. 1019/2013 of 23 October 2013 amending Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 as regards histamine in fishery products. *Off. J. Eur. Union* **2013**, *282*, 46-47.

11.Pons-Sanchez-Cascado, S.; Veciana-Nogues, M.; Bover-Cid, S.; Marine-Font, A.; Vidal-Carou, M., Volatile and biogenic amines, microbiological counts, and bacterial amino acid decarboxylase activity throughout the salt-ripening process of anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 1683-1689.

12.Pons-Sanchez-Cascado, S.; Vidal-Carou, M. C.; Marine-Font, A.; Veciana-Nogues, M. T., Influence of the freshness grade of raw fish on the formation of volatile and biogenic amines during the manufacture and storage of vinegar-marinated anchovies. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8586-8592.

13.Veciana-Nogues, M.; Marine-Font, A.; Vidal-Carou, M., Changes in biogenic amines during the storage of Mediterranean anchovies immersed in oil. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1385-1389.



14. Veciana-Nogues, M.; Vidal-Carou, M.; Marine-Font, A., Histamine and tyramine in preserved and semi-preserved fish products. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 1653-1655.
15. Béné, A.; Hayman, A.; Reynard, E.; Luisier, J. L.; Villettaz, J. C., A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method: Part II. Determination of the freshness of fish. *Sensor Actuat B-Chem.* **2001**, *72*, 204-207.
16. Leduc, F.; Tournayre, P.; Kondjoyan, N.; Mercier, F.; Malle, P.; Kol, O.; Berdagué, J. L.; Duflos, G., Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chem.* **2012**, *131*, 1304-1311.
17. Duflos, G.; Leduc, F.; N'Guessan, A.; Krzewinski, F.; Kol, O.; Malle, P., Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 2568-2575.
18. Leduc, F.; Krzewinski, F.; Le Fur, B.; N'Guessan, A.; Malle, P.; Kol, O.; Duflos, G., Differentiation of fresh and frozen/thawed fish, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*), using volatile compounds by SPME/GC/MS. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 2560-2568.
19. Triqui, R.; Reineccius, G. A., Changes in flavor profiles with ripening of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1883-1889.
20. Triqui, R.; Reineccius, G. A., Flavor development in the ripening of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 453-458.
21. Triqui, R.; Guth, H., Determination of potent odorants in ripened anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) by aroma extract dilution analysis and by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. In *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods*, American Chemical Society: 1997; Vol. 674, pp 31-38.
22. Besteiro, I.; Rodriguez, C. J.; Tilve-Jar, C.; Pascual, C., Selection of attributes for the sensory evaluation of anchovies during the ripening process. *J. Sens. Stud.* **2000**, *15*, 65-77.
23. Kondjoyan, N.; Berdagué, J.-L., A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds. Ed. du Laboratoire Flaveur: 1996.
24. Van den Dool, H.; Dec Kratz, P., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, **1963**, *11*, 463-471.
25. Malle, P.; Valle, M.; Bouquelet, S., Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Int.* **1995**, *79*, 43-49.
26. Duflos, G.; Dervin, C.; Malle, P.; Bouquelet, S., Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *J. AOAC Int.* **1999**, *82*, 1097-1101.
27. Rakotomalala, R., TANAGRA : un logiciel gratuit pour l'enseignement et la recherche. In *Extraction et Gestion des Connaissances EGC 2005*, Cépaduès-Éditions, Ed. Toulouse, 2005; Vol. 2, pp 697-702.
28. Roldan, H. A.; Barassi, C. A.; Trucco, R. E., Increase on free fatty acids during ripening of anchovies (*Engraulis anchoíta*). *Int. J. Food Sci. Technol.* **1985**, *20*, 581-585.
29. García-González, D. L.; Tena, N.; Aparicio-Ruiz, R.; Morales, M. T., Relationship between sensory attributes and volatile compounds qualifying dry-cured hams. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 315-325.
30. Giri, A.; Osako, K.; Okamoto, A.; Ohshima, T., Olfactometric characterization of aroma active compounds in fermented fish paste in comparison with fish sauce, fermented soy paste and sauce products. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1027-1040.
31. Ólafsdóttir, G.; Fleurence, J., Evaluation of fish freshness using volatile compounds - Classification of volatile compounds in fish. In *Methods to determine the freshness of fish in research and industries*, Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action (Evaluation of Fish Freshness), Nantes, France, Nov 12-14 1997, Institut International du Froid Publication, Paris, 1997.
32. Varlet, V.; Knockaert, C.; Prost, C.; Serot, T., Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3391-3401.
33. Gill, T. A., Objective analysis of seafood quality. *Food Reviews International* **1990**, *6*, 681-714.
34. Triqui, R.; Bouchriti, N., Freshness assessments of moroccan sardine (*Sardina pilchardus*) : comparison of overall sensory changes to instrumentally determined volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7540-7546.
35. Jónsdóttir, R. s.; Sveinsdóttir, K. n.; Magnússon, H.; Arason, S. n.; Lauritzsen, K.; Thorarinsdóttir, K. A., Flavor and quality characteristics of salted and de-salted cod (*Gadus morhua*) produced by different salting methods. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3893-3904.
36. Duflos, G.; Coin, V. M.; Cornu, M.; Antinelli, J.-F.; Malle, P., Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 600-611.
37. Sinz, Q.; Schwab, W., Metabolism of amino acids, dipeptides and tetrapeptides by *Lactobacillus sakei*. *Food Microbiol.* **2012**, *29*, 215-223.
38. Yaylayan, V. A.; Keyhani, A., Origin of 2,3-pentanedione and 2,3-butanedione in d-glucose/l-alanine maillard model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3280-3284.
39. Álvarez-Martín, P.; Belén Flórez, A.; Hernández-Barranco, A.; Mayo, B., Interaction between dairy

- yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control* **2008**, *19*, 62-70.
40. McSweeney, P. L. H.; Sousa, M. J., Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* **2000**, *80*, 293-324.
41. Jaffrès, E.; Lalanne, V.; Macé, S.; Cornet, J.; Cardinal, M.; Sérot, T.; Dousset, X.; Joffraud, J.-J., Sensory characteristics of spoilage and volatile compounds associated with bacteria isolated from cooked and peeled tropical shrimps using SPME–GC–MS analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *147*, 195-202.
42. Kawai, T.; Sakaguchi, M., Fish flavor. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1996**, *36*, 257-298.
43. Hsieh, R. J.; Kinsella, J. E., Oxidation of polyunsaturated fatty acids : Mechanisms, Products, and Inhibition with emphasis on Fish. Academic Press, Inc.: 1989; Vol. 33, p 109.
44. Josephson, D. B.; Lindsay, R. C., Retro-aldol related degradations of 2,4-decadienal in the development of staling flavors in fried foods. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 1186-1190.
45. Iglesias, J.; Medina, I., Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1192*, 9-16.
46. Medina, I.; Satué-Gracia, M.; Frankel, E., Static headspace gas chromatographic analyses to determine oxidation of fish muscle lipids during thermal processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 231-236.
47. Grosch, W., Reactions of hydroperoxides - products of low molecular weight. In *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Chan, H. W. S., Ed. Academic Press London, 1987; pp 95-139.
48. Meynier, A.; Genot, C.; Gandemer, G., Volatile compounds of oxidized pork phospholipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 1-7.
49. Young, O. A.; Berdagué, J. L.; Viallon, C.; Rousset-Akrim, S.; Theriez, M., Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. *Meat Sci.* **1997**, *45*, 183-200.
50. Frankel, E. N., Volatile lipid oxidation products. *Prog. Lipid Res.* **1983**, *22*, 1-33.
51. Frankel, E., *Lipid Oxidation*. Second Edition ed.; The Oily Press Lipid Library: 2005; Vol. 18, p 470.
52. Nei, D., Evaluation of Non-bacterial factors contributing to histamine accumulation in fish fillets. *Food Control* **2014**, *35*, 142-145.

## II. Contribution de l'approche et perspectives

Cette étude à double focalisation a donc permis de réaliser une estimation de la durée de conservation d'anchois transformés en se basant non seulement sur l'aspect sanitaire mais aussi sur l'aspect organoleptique. Ainsi, l'aspect sanitaire qui prime sur tous les autres en matière d'alimentation, a montré que les durées de conservation même importantes ne présentaient pas de risques en termes de sécurité sanitaire lorsque les conditions de conservation sont bien maîtrisées. En regardant les composés volatils, des optima aromatiques sont enregistrés au bout de 5 et 6 mois de conservation, suggérant qu'il conviendrait de conseiller une consommation au cours de cette période de façon à pouvoir profiter d'un produit possédant bien les notes aromatiques attendues par le consommateur. Il aurait été intéressant de confronter les résultats obtenus à des données d'analyses sensorielles de façon à voir si les composés illustrés par l'approche étaient en lien avec des ressentis sensoriels. Une analyse sensorielle a été entreprise mais n'a pu être menée à terme compte-tenu de l'absence de descripteurs sensoriels appropriés et surtout d'un risque de sécurité sanitaire présentés par certains produits. Néanmoins, de par les types de produits étudiés (anchois marinés et salés), le temps de l'étude (jusqu'à 18 mois pour les échantillons salés), les conditions de conservation des produits (avec et sans rupture des températures) et enfin les molécules analysées (amines biogènes et composés volatils), l'étude s'est révélée innovante dans le domaine de l'évaluation de la qualité de poissons transformés.

Cette technique de SPME-GC-MS, développée au laboratoire, possède l'avantage d'être facilement transposable à d'autres approches d'évaluation de la qualité. Ainsi, elle a également été appliquée dans le cadre de la cuisson des poissons en association avec le chef de projet, ingénieur d'étude au sein de l'unité. La finalité de cette approche était de proposer des marqueurs du niveau de cuisson des poissons. Pour ce faire, plusieurs types d'échantillons : pavé de saumon, dos de cabillaud et truite entière ont été analysés après avoir subi différents barèmes de cuisson. Un travail de statistique basé sur des analyses en composantes principales a été conduit afin de caractériser les profils de composés volatils des différents barèmes de cuisson. Les premiers résultats ont permis de mettre en évidence des composés et familles de composés pouvant jouer ce rôle de marqueurs, mais leur nature ne peut être indiquée dans ce manuscrit compte tenu de la confidentialité inhérente à ce projet mené dans le cadre du Programme d'Investissement d'Avenir. En outre, ce travail fait l'objet d'une publication en cours de rédaction, intitulée : « *Characterization of volatile compounds recovered from cooked cod fillets (*Gadus morhua*), salmon fillets (*Salmo salar*) and whole trout (*Oncorhynchus mykiss*) by SPME-GC-MS* ».

---

## Conclusions et Perspectives

Le but de ces travaux était d'évaluer, avec des outils de biologie moléculaire et de biochimie, la qualité et la fraîcheur du poisson.

Lors d'une première approche, des travaux de microbiologie ont été conduits sur des filets de merlan (*Merlangius merlangius*) altérés. Quatre souches ont été isolées et identifiées comme membres de l'espèce *Shewanella baltica* par séquençage partiel de l'ARNr 16S, du gène *gyrB* et analyse du protéome par MALDI-TOF. Le fait le plus marquant a été de constater qu'une des souches était H<sub>2</sub>S négative, or dans le cadre d'études microbiologiques sur la conservation de poisson, le caractère de production d'H<sub>2</sub>S est largement utilisé pour rechercher la flore d'altération. Les membres du groupe *Shewanella putrefaciens* ont été décrits comme étant la flore spécifique d'altération du poisson réfrigéré ; la mise en évidence d'une souche de *S. baltica* H<sub>2</sub>S négative sur du poisson altéré est un fait nouveau. Il est nécessaire désormais d'évaluer le potentiel d'altération d'une telle souche et de tenter, à plus large échelle, sur un nombre plus important d'échantillons et de zones de pêches, d'estimer la part de souches présentant le caractère H<sub>2</sub>S négatif. Ceci permettra alors de conclure quant à la pertinence de l'utilisation de techniques microbiologiques ciblant la production d'H<sub>2</sub>S dans l'estimation de l'état de fraîcheur des poissons.

Une seconde approche s'est focalisée sur la détection de la flore d'altération par une approche de biologie moléculaire. Celle-ci présente des avantages en comparaison avec les méthodes microbiologiques notamment en termes de rapidité, spécificité, sensibilité et d'automatisation de l'analyse. Un couple d'amorces a été sélectionné en utilisant plusieurs outils informatiques et en réalisant des tests *in vitro*. Celui-ci a démontré une bonne efficacité d'amplification pour les genres *Photobacterium* et *Vibrio*, en revanche il manquait de spécificité pour l'amplification de souches de *Shewanella*. Lors d'une application sur un suivi d'altération de filets de merlan sous atmosphère modifiée, le couple d'amorces a permis de voir que les résultats obtenus par qPCR étaient prometteurs. Une décroissance claire des valeurs de C<sub>q</sub>, de paire avec la diminution de la fraîcheur, a été observée lors des premiers jours d'altération. Cette observation a pu être corrélée avec des mesures d'ABVT et de TMA par distillation à la vapeur. Enfin, il a été montré au cours de cette étude, grâce au séquençage des produits PCR, que la diminution des C<sub>q</sub> était due à un développement de *P. phosphoreum* précédemment décrit comme étant la flore d'altération du poisson conservé sous atmosphère modifiée. Ce travail a permis de montrer la faisabilité de l'approche mais nécessite la réalisation de développements complémentaires comme l'addition de contrôles, le remplacement potentiel des dégénérescences du couple sélectionné et le dessin d'une nouvelle paire d'amorces pour *S. putrefaciens*. A plus long terme une validation de méthode se-

ra à réaliser, tout comme l'application de cette méthode sur d'autres espèces pour voir si elle peut constituer un indicateur de fraîcheur fiable et « universel ».

Après avoir développé des travaux de recherches axés sur une des causes de l'altération, les études se sont ensuite focalisées sur une conséquence de l'altération la production de TMA et de DMA via la dégradation de l'OTMA. Grâce à une méthode de SPME-GC-MS, la quantification spécifique de la TMA et la DMA, définie comme étant l'ABVP, a été rendue possible. L'utilisation d'un standard interne a permis la normalisation du signal et des gammes de quantification en fonction de chacune des molécules ont pu être établies. La méthode a été appliquée pour l'analyse de filets de cabillaud conservés sous glace fondante. En parallèle, l'application d'autres méthodes : QIM, mesure de l'ABVT et de la TMA, a permis de comparer les résultats obtenus à des références. De bonnes corrélations ont été obtenues entre les différentes méthodes de suivis et les deux technologies aboutissent à des valeurs de TMA sensiblement proches. A partir des mesures d'ABVP, le ratio de la DMA sur la TMA (DTR) a pu être calculé et, en le confrontant aux scores de QIM, il a été montré que le DTR décroît rapidement pour des valeurs du QIM comprises entre 0 et 5, correspondant à des poissons frais. Pour cette méthode également, des études complémentaires sont nécessaires. Un premier approfondissement doit consister à multiplier des études similaires de façon à confirmer ces premiers résultats. Des études sur d'autres espèces doivent également être réalisées, notamment les espèces de poisson gras pour tester si le DTR peut être un indicateur pertinent, là où ABVT et TMA n'ont pas montré de résultats probants.

Les deux méthodes développées au cours de ce travail de thèse ont permis de mettre en évidence de potentiels marqueurs du déclin précoce de la fraîcheur et ce dès les premiers stades d'altération correspondant aux premiers jours de conservation du poisson. Comme indiqué précédemment, la répétition de suivis sera nécessaire afin d'acter la faisabilité des méthodes. Une application conjointe de ces méthodes lors des suivis est d'ailleurs envisageable. A moyen terme ces répétitions d'analyses ouvriront également de nouvelles perspectives en termes de modélisation, notamment pour transformer ces outils actuels de suivi global en dispositifs d'aide à la décision. A plus long terme, un enjeu plus ambitieux serait la réduction de la prise d'essai, puisqu'à l'heure actuelle la totalité du filet est détruite pour l'analyse pour des questions de représentativité. L'étude de zones particulières du filet serait à planifier pour voir si les résultats issus de l'analyse de certaines régions sont corrélés à la qualité globale du filet. Dans le cas de la quantification de la TMA et la DMA, molécules volatiles, l'étude de l'environnement proche du filet est envisagée pour s'affranchir de sa destruction. De nouvelles technologies, comme celles liées à l'infrarouge, aideraient à sonder cet environnement ; il faudrait alors établir si l'analyse de l'atmosphère autour du filet permet de rendre compte efficacement de la fraîcheur de ce dernier.

La thématique de la caractérisation de la fraîcheur des poissons est importante pour la filière aquacole afin de pouvoir garantir des produits de qualité. Néanmoins, la globalisation des échanges commerciaux a conduit à l'émergence des échanges de produits majoritairement congelés. Une technique de fraude découlant de ces évolutions consiste à décongeler les produits et les commercialiser en tant que produits frais. Lors d'une collaboration au cours de cette thèse, une étude a été réalisée en utilisant l'analyse du protéome d'exsudat de filets décongelés. Les études ont mis en évidence deux protéines marqueurs de congélation/décongélation : les parovalbumines  $\alpha$  et  $\beta$ . Ceci est vérifié quelque soit l'état de fraîcheur initial du poisson. Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée avec révision mineure dans *Food Chemistry*. A terme la détection spécifique et rapide de ces protéines sera nécessaire, le développement d'une technique ELISA pourrait répondre à un tel cahier des charges. Afin de poursuivre sur la thématique du poisson frais/décongelé, la technique SPME-GC-MS de quantification de l'ABVP doit être appliquée sur cette thématique et devrait pouvoir donner des résultats intéressants notamment concernant le DTR. En effet, la congélation mène à l'enregistrement de teneurs plus élevées en DMA dans la chair des poissons, l'OTMA déméthylase étant active à température négative.

Une dernière partie des travaux était consacrée à la qualité du poisson *lato sensu*. Une méthode SPME-GC-MS, précédemment développée au laboratoire, permettant l'analyse du volatilome et la méthode HPLC de dosage des amines biogènes ont été utilisées pour le suivi de la conservation d'anchois transformés. Cette double approche a permis de suivre des paramètres en lien avec la sécurité sanitaire et les qualités organoleptiques du produit au cours de sa conservation. Ceci a permis de montrer qu'après l'étape de maturation ou de marinage, les produits continuent d'évoluer. Du point de vue de la sécurité sanitaire aucun risque n'a été constaté pour les amines biogènes, sous réserve du respect de la chaîne du froid. Du point de vue de l'étude du volatilome, il a été constaté que l'optimum aromatique correspondait à des échantillons ayant des teneurs plus importantes en certains composés comme le (E,E)-2,4-heptadienal, le (E)-2-heptenal, le benzèneacétaldehyde, le benzaldehyde, ou la 2,3-octanedione. Malheureusement, cette étude ne permet pas d'établir le lien entre composé volatil et propriété odorante de la molécule, aussi la perspective d'un tel travail serait d'analyser les mêmes types d'échantillons en utilisant une technologie différente, comme la GC-O/MS, le lien entre composés et propriétés odorantes serait alors établi.

En « échos » à ces travaux, une étude annexe menée dans le cadre d'un programme initié par des partenaires privés portant sur la cuisson de différentes espèces de poisson a permis d'analyser leurs volatilomes et de suggérer des marqueurs de bonne cuisson. Pour ce développement, le lien avec les propriétés odorantes des molécules n'est toujours pas établi, néanmoins, en amont de l'étude, le choix des barèmes de cuisson utilisés a été réalisé suite à des analyses sensorielles. Ainsi les molécules du volatilome ont été utilisées com-

me marqueur, pour tenter d'établir si certains composés volatils permettent de caractériser une bonne cuisson, conduisant à la préparation d'un produit de qualité. Les perspectives sont, à terme, d'utiliser les statistiques multivariées de façon à sélectionner objectivement les candidats marqueurs et d'utiliser ces informations pour développer des capteurs sensoriels.

Ce travail de thèse a permis de s'intéresser à la notion de qualité du poisson et a mis en avant le fait que ce terme renferme plusieurs facettes. L'altération du poisson, résultant de causes endogènes et exogènes, a pour conséquence majeure la modification des propriétés organoleptiques du produit. Différents outils d'évaluation de la qualité du poisson ont pu être développés et testés au cours de ces travaux. Ils ont permis d'avoir une vision depuis l'évaluation précoce du déclin de la fraîcheur jusqu'à la caractérisation de l'évolution de produits transformés lors de leur conservation.

Ces travaux esquissent de nouveaux projets de recherches en tenant compte des différentes perspectives formulées précédemment. L'application conjointe des méthodes SPME-GC-MS et qPCR permet d'envisager le développement de modèles dans le but d'obtenir des outils de caractérisation du risque d'altération.

---

## Valorisation des travaux

### Publications scientifiques

A. Dehaut, C. Himber, V. Mulak, T. Grard, F. Krzewinski, B. Le Fur and G. Duflos. Evolution of volatile compounds and biogenic amines throughout the shelf-life of marinated and salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014** 62 (32), 8014 – 8022. DOI : 10.1021/jf5021736

A. Dehaut, G. Midelet-Bourdin, A. Brisaboïs and G. Duflos. Phenotypic and genotypic characterization of H<sub>2</sub>S-positive and H<sub>2</sub>S-negative strains of *Shewanella baltica* isolated from spoiled whiting (*Merlangius merlangus*). *Letters in Applied Microbiology*. **2014**. 59 (5), 542 – 548. DOI : 10.1111/lam.12312

A. Dehaut, F. Krzewinski, T. Grard, M. Chollet, P. Jacques, A. Brisaboïs, and G. Duflos. Development of a qPCR method targeting *torA* gene and application for the freshness monitoring of modified atmosphere-packed chilled whiting (*Merlangius merlangus*). *Food Control*. Article soumis (1<sup>er</sup> Août 2014).

A. Dehaut, S. Duthen, F. Krzewinski, T. Grard, A N'Guessan, A. Brisaboïs and G. Duflos. Quantification of trimethylamine and dimethylamine by SPME-GC/MS and use of partial volatile basic nitrogen concept for freshness monitoring of cod fillets (*Gadus morhua*). *Food chemistry*. Article soumis (28 Novembre 2014).

A. Dehaut, F. Katrou, F. Krzewinski, T. Grard, O. Kol, A. N'Guessan, P. Jacques, A. Brisaboïs and G. Duflos. Characterization of volatile compounds recovered from cooked cod fillets (*Gadus morhua*), salmon fillets (*Salmo salar*) and whole trout (*Oncorhynchus mykiss*) by SPME-GC/MS. *Food chemistry*. Article en préparation.

P. Ethuin, S. Marlard, M. Gobert, C. Carapito, D. Thierse, A. Dehaut, V. Lencel, G. Duflos and T. Grard. Differentiation between fresh and frozen/thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional electrophoresis. *Food chemistry*. Article accepté avec révisions mineures (26 Août 2014).

I.S Zakari, A. Mkhadri, A. N'Guessan, A. Dehaut and G. Duflos. Variable selection and quantile regression on freshness characterization of whiting (*Merlangius merlangus*). *Applied Mathematics*. Article en cours de soumission.

### Communications lors de congrès internationaux

A. Dehaut, F. Krzewinski, A.N'Guessan, O. Kol, T. Grard, A. Brisaboïs and G. Duflos. Quantification of fish partial volatile basic nitrogen by SPME-GC/MS (Oral communication). Juin 2014 – 44<sup>th</sup> WEFTA congress (Bilbao, Espagne).

A. Dehaut, M.Chollet, P. Jacques, F. Krzewinski, A.N'Guessan, O. Kol, T. Grard, A. Brisaboïs and G. Duflos. Use of degenerate primers to detect and quantify *torA* gene harbored by specific spoilage organisms of fish (Poster en [Annexe 6](#)). September 2014 – 24<sup>th</sup> International ICFMH conference (Nantes, France)

### Communications lors de congrès nationaux

A. Dehaut. Recherche de marqueurs biochimiques et moléculaires pour l'évaluation de la fraîcheur du poisson (Communication orale). Avril 2014 - Journées de la Société Française d'Ichtyologie (Boulogne-sur-Mer).

A. Dehaut. Dessin d'amorces dégénérées pour caractériser la qualité/fraîcheur du poisson par une approche de biologie moléculaire (Communication orale). Novembre 2013 - Journées des Doctorants et Post-Doctorants de l'Anses (Maison Alfort).

A. Dehaut, P. Jacques, F. Krzewinski, A.N'Guessan, O. Kol, T. Grard, A. Brisaboïs, G. Duflos. Caractérisation de la qualité/fraîcheur du poisson par des approches de biochimie et de biologie moléculaire (Communication orale). Octobre 2013 - 1<sup>ère</sup> Doctoriales de la Mer (Boulogne-sur-mer)

A. Dehaut, S.Duthen and G.Duflos. Quantification of TMA & DMA by SPME-GC/MS for the freshness assessment of fish (Poster en [Annexe 7](#)). Novembre 2013 - Journées des Doctorants et Post-Doctorants de l'Anses (Maison Alfort).



## Références bibliographiques

- Aaen B, Jessen F & Jensen B (1995) Partial purification and characterization of a cellular acidic phospholipase A2 from cod (*Gadus morhua*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 110: 547–554.
- Abbas H & Comeau L (2003) Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 589–595.
- Abe H & Okuma E (1991) Rigor-mortis progress of carp acclimated to different water temperatures. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 57.
- Académie Française (2013a) Définition du mot "poisson". <http://www.academie-francaise.fr> (Accessed October 15, 2013).
- Académie Française (2013b) Définition du mot "qualité." <http://www.academie-francaise.fr> (Accessed October 15, 2013).
- Agustsson I & Strøm A (1981) Biosynthesis and turnover of trimethylamine oxide in the teleost cod, *Gadus morhua*. *Journal of Biological Chemistry* 256: 8045–8049.
- Alarcon B, Vicedo B & Aznar R (2006) PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *Journal of applied microbiology* 100: 352–364.
- Alasalvar C, Taylor KDA & Shahidi F (2005) Comparison of Volatiles of Cultured and Wild Sea Bream (*Sparus aurata*) during Storage in Ice by Dynamic Headspace Analysis/Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2616–2622.
- Allen J, Leach N & Ferguson S (2005) The histidine of the c-type cytochrome CXXCH haem-binding motif is essential for haem attachment by the *Escherichia coli* cytochrome c maturation (Ccm) apparatus. *Biochem. J* 389: 587–592.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215: 403–410.
- Álvarez-Martín P, Belén Flórez A, Hernández-Barranco A & Mayo B (2008) Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control* 19: 62–70.
- Amlacher E (1961) Rigor mortis in fish. *Fish as food*, Vol. 1, pp. 385–409.
- Anderson A, Pietsch K, Zucker R, Mayr A, Müller-Hohe E, Messelhäusser U, Sing A, Busch U & Huber I (2011) Validation of a duplex real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in different food products. *Food Analytical Methods* 4: 259–267.
- Angerosa F, Camera L, d' Alessandro N & Mellerio G (1998) Characterization of Seven New Hydrocarbon Compounds Present in the Aroma of Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 648–653.
- Angerosa F, Mostallino R, Basti C & Vito R (2001) Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry* 72: 19–28.
- Angerosa F, Mostallino R, Basti C & Vito R (2000) Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry* 68: 283–287.
- Ansaldi M, Bordi C, Lepelletier M & Méjean V (1999) TorC apocytochrome negatively autoregulates the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase operon in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 33: 284–295.
- Ansaldi M, Jourlin-Castelli C, Lepelletier M, Théraulaz L & Méjean V (2001) Rapid dephosphorylation of the TorR response regulator by the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 183: 2691–2695.
- Ansaldi M, Simon G, Lepelletier M & Méjean V (2000) The TorR High-Affinity Binding Site Plays a Key Role in Both *torR* Autoregulation and *torCAD* Operon Expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 182: 961–966.
- Ansaldi M, Théraulaz L, Baraquet C, Panis G & Méjean V (2007) Aerobic TMAO respiration in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 66: 484–494.
- Ansaldi M, Théraulaz L & Méjean V (2004) TorI, a response regulator inhibitor of phage origin in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9423–9428.
- Anthoni U, Børresen T, Christophersen C, Gram L & Nielsen PH (1990) Is trimethylamine oxide a reliable indicator for the marine origin of fish? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 97: 569–571.
- Antoine F, Wei C, Littell R, Quinn B, Hogle A & Marshall M (2001) Free Amino Acids in Dark-and White-muscle Fish as Determined by O-phthalaldehyde Precolumn Derivatization. *Journal of food science* 66: 72–77.
- Aparecida de Oliveira M, Abeid Ribeiro EG, Morato Bergamini AM & Pereira De Martinis EC (2010) Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR. *Food microbiology* 27: 19–23.
- Aparicio R, Rocha SM, Delgadillo I & Morales MT (2000) Detection of rancid defect in virgin olive oil by the electronic nose. *Journal of agricultural and food chemistry* 48: 853–860.
- Aprodu I, Walcher G, Schelin J, Hein I, Norling B, Rådström P, Nicolau A & Wagner M (2011) Advanced sample preparation for the molecular quantification of *Staphylococcus aureus* in artificially and naturally contaminated milk. *International journal of food microbiology* 145: S61–S65.
- Apun K, Yusof AM & Jugang K (1999) Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. *International Journal of Environmental Health Research* 9: 285–292.
- Aro T, Tahvonen R, Koskinen L & Kallio H (2003) Volatile compounds of Baltic herring analysed by dy

- nameric headspace sampling–gas chromatography–mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 216: 483–488.
- Arthur CL & Pawliszyn J (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry* 62: 2145–2148.
- Austin B (2002) The Bacterial Microflora of Fish. *The Scientific World Journal* 2: 558–572.
- Autheman C & Widmann L (2010) *Procédé et dispositif de contrôle de la qualité de fraîcheur du poisson*. Brevet N°EP2189789A1.
- Bach V, Kidmose U, Kjeldsen Bjørn G & Edelenbos M (2012) Effects of harvest time and variety on sensory quality and chemical composition of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers. *Food Chemistry* 133: 82–89.
- Baixas-Nogueras S, Bover-Cid S, Veciana-Nogués T, Nunes M & Vidal-Carou M (2003) Development of a quality index method to evaluate freshness in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of food science* 68: 1067–1071.
- Balasubramanian S & Panigrahi S (2011) Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review. *Food and Bioprocess Technology* 4: 1–26.
- Baraquet C, Théraulaz L, Guiral M, Lafitte D, Méjean V & Jourlin-Castelli C (2006) TorT, a member of a new periplasmic binding protein family, triggers induction of the Tor respiratory system upon trimethylamine N-oxide electron-acceptor binding in *Escherichia coli*. *Journal of biological chemistry* 281: 38189–38199.
- Barrière C, Centeno D, Lebert A, Leroy-Sétrin S, Berdagué JL & Talon R (2001) Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xyloso* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters* 201: 181–185.
- Bartowsky EJ & Henschke PA (2008) Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine: A review. *International Journal of Food Microbiology* 125: 60–70.
- Baudot A, Floury J & Smorenburg HE (2001) Liquid-liquid extraction of aroma compounds with hollow fiber contactor. *AIChE journal* 47: 1780–1793.
- Bella J, Eaton M, Brodsky B & Berman HM (1994) Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* 266: 75–81.
- Béné A, Hayman A, Reynard E, Luisier JL & Villettaz JC (2001) A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method: Part II. Determination of the freshness of fish. *Sensors and Actuators B: Chemical* 72: 204–207.
- Berdagué JL, Monteil P, Montel MC & Talon R (1993) Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science* 35: 275–287.
- Berghof-Jäger K (2013) Standardization of Real-time PCR Methods in Food Microbiology. *Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*, pp. 45–55. Caister Academic Press.
- Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Molecular microbiology* 22: 393–404.
- Bertrand E (2005) La listériolysine O: une toxine sous influence. Production et activité hémolytique de la listériolysine O lors de culture de *Listeria monocytogenes* EGDe en condition de stress. Université de Rennes 1, Rennes.
- Besteiro I, Rodriguez CJ, Tilve-Jar C & Pascual C (2000) Selection of attributes for the sensory evaluation of anchovies during the ripening process. *Journal of Sensory Studies* 15: 65–77.
- Bicchi C, Cordero C, Liberto E, Rubiolo P & Sgorbini B (2004) Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyse the volatile fraction of food matrices. *Journal of Chromatography A* 1024: 217–226.
- Bjørlykke GA, Roth B, Sørheim O, Kvamme BO & Slinde E (2011) The effects of carbon monoxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Chemistry* 127: 1706–1711.
- Bjornsdottir-Butler K, Jones JL, Benner R & Burkhardt III W (2011) Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish. *Food microbiology* 28: 356–363.
- Bjornsdottir-Butler K, Jones JL, Benner RA & Burkhardt W (2011) Quantification of total and specific gram-negative histamine-producing bacteria species in fish using an MPN real-time PCR method. *Food Microbiology* 28: 1284–1292.
- Bjornsdottir-Butler K, McCarthy S, Burkhardt I & Benner Jr RA (2013) Importance of Histamine-Producing *Clostridium perfringens* in Scombrotoxin-Forming Fish. *Journal of Food Protection* 76: 1283–1287.
- Bockelie T & Fortey RA (1976) An early Ordovician vertebrate. *Nature* 260: 36–38.
- Bœuf G & Payan P (2001) How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130: 411–423.
- Böhme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Calo-Mata P & Canas B (2010) Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Journal of proteome research* 9: 3169–3183.
- Bonjoch X, Calvo L, Soler M, Ruiz-Rueda O & Garcia-Gil LJ (2010) A new multiplexed real-time PCR assay to detect *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Food Analytical Methods* 3: 40–46.
- Borderias AJ & Sanchez-Alonso I (2011) First Processing Steps and the Quality of Wild and Farmed Fish. *J Food Sci* 76: R1–R5.
- Le Boucher R *et al.* (2012) Selection for Adaptation to Dietary Shifts: Towards Sustainable Breeding of Carnivorous Fish. *PLoS one* 7: e44898.
- Bouquelet S (2008) Réactions de brunissement. <http://biochim-agro.univ-lille1.fr> (Accessed January 4, 2014).
- Brakstad OG, Aasbakk K & Maeland JA (1992) Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 1654–1660.

- Bremner H (1985) A convenient easy to use system for estimating the quality of chilled seafood. *Fish Processing Bulletin* 7: 59–70.
- Bremner HA & Hallett IC (1985) Muscle fiber-connective tissue junctions in the fish blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*). A scanning electron microscope study. *Journal of Food Science* 50: 975–980.
- Brunak S, Danchin A, Hattori M, Nakamura H, Shinosaki K, Matisse T & Preuss D (2002) Nucleotide sequence database policies. *Science* 298: 1333.
- Busconi M, Foroni C, Corradi M, Bongiorni C, Cattapan F & Fogher C (2003) DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food chemistry* 83: 127–134.
- Bushdid C, Magnasco MO, Vosshall LB & Keller A (2014) Humans Can Discriminate More than 1 Trillion Olfactory Stimuli. *Science* 343: 1370–1372.
- Caballero M, Betancor M, Escrig J, Montero D, Espinosa de los Monteros A, Castro P, Ginés R & Izquierdo M (2009) Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 291: 210–216.
- Campbell NA & Reece JB (2004) *Biologie*. De Boeck Université. De Boeck & Larcier s.a., Bruxelles.
- Cañigral I, Moreno Y, Alonso JL, González A & Ferrús MA (2010) Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiological Research* 165: 657–664.
- Capell C, Vaz-Pires P & Kirby R (1997) Use of counts of hydrogen sulphide producing bacteria to estimate remaining shelf life of fresh fish. *Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness,"* pp. 175–182. Nantes.
- Cardenas Bonilla A, Sveinsdottir K & Martinsdottir E (2007) Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control* 18: 352–358.
- Careche M, Tryggvadóttir SV, Herrero A, Lågel B, Petermann U, Schubring R & Nesvadba P (2003) Instrumental methods for measuring texture of fish. *Quality of fish from catch to consumer—labelling, monitoring and traceability*, pp. 265–272. J.B Luten, J. Oehlenschläger, G. Olafsdottir.
- Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W & Faustman C (2005) Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food chemistry* 93: 607–617.
- Chan ST, Yao MW, Wong Y, Wong T, Mok C & Sin DW (2006) Evaluation of chemical indicators for monitoring freshness of food and determination of volatile amines in fish by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 224: 67–74.
- Charif D & Lobry JR (2007) SeqinR 1.0-2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. *Structural Approaches to Sequence Evolution*, pp. 207–232. Springer.
- Che Harun FK, Covington JA & Gardner JW (2009) Portable e-Mucosa System: Mimicking the biological olfactory. *Proceedings of the Eurosensorys XXIII conference*, Vol. 1, pp. 991–994. Procedia Chemistry.
- Che Harun FK, Taylor JE, Covington JA & Gardner JW (2009) An electronic nose employing dual-channel odour separation columns with large chemosensor arrays for advanced odour discrimination. *Sensors and Actuators B: Chemical* 141: 134–140.
- Chen J, Shi X, Gehring AG & Paoli GC (2014) Automated immunomagnetic separation for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 from spinach. *International journal of food microbiology* 179: 33–37.
- Chen J, Zhang L, Paoli GC, Shi C, Tu S-I & Shi X (2010) A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *International journal of food microbiology* 137: 168–174.
- Cheng J, Sun D, Han Z & Zeng X (2014) Texture and Structure Measurements and Analyses for Evaluation of Fish and Fillet Freshness Quality: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13: 52–61.
- Chéret R, Delbarre-Ladrat C, Lamballerie-Anton M de & Verrez-Bagnis V (2007) Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry* 101: 1474–1479.
- Chisholm MG, Wilson MA & Gaskey GM (2003) Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour and Fragrance Journal* 18: 106–115.
- Cochrane G, Karsch-Mizrachi I & Nakamura Y (2011) The international nucleotide sequence database collaboration. *Nucleic acids research* 39: D15–D18.
- Collignon J, Dorer G & Jacques F (1984) Le poisson en filets et en tranches. *Science et Pêche* 340: 5–64.
- Conseil européen (1996) *Règlement (CE) N°2406/96 du conseil du 26 novembre 1996 fixant des normes communes de commercialisation pour certains produits de la pêche*.
- Cortes HJ, Winniford B, Luong J & Pursch M (2009) Comprehensive two dimensional gas chromatography review. *Journal of separation science* 32: 883–904.
- Curioni P & Bosset J (2002) Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal* 12: 959–984.
- Czjzek M, Dos Santos J-P, Pommier J, Giordano G, Méjean V & Haser R (1998) Crystal structure of oxidized trimethylamine N-oxide reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å resolution. *Journal of molecular biology* 284: 435–447.
- Dadáková E, Křížek M & Pelikánová T (2009) Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry* 116: 365–370.

- Dalgaard P (1995a) Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology* 26: 305–317.
- Dalgaard P (1997) *Photobacterium phosphoreum* - A microbial parameter for prediction of remaining shelf life in map cod fillets. *Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness,"* pp. 166–174. Nantes.
- Dalgaard P (1995b) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 26: 319–333.
- Debusca A, Tahergorabi R, Beamer SK, Matak KE & Jaczynski J (2014) Physicochemical properties of surimi gels fortified with dietary fiber. *Food chemistry* 148: 70–76.
- Delaherche A, Claisse O & Lonvaud-Funel A (2004) Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and "ropy" *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of applied microbiology* 97: 910–915.
- Derby HA & Hammer BW (1931) Bacteriological Studies on Surface Taint Butter. *Bacteriology of Butter, Research Bulletin*. C. F. Curtis.
- Le Dréan G, Mounier J, Vasseur V, Arzur D, Habrylo O & Barbier G (2010) Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *International journal of food microbiology* 138: 100–107.
- Drumm TD & Spanier AM (1991) Changes in the content of lipid autoxidation and sulfur-containing compounds in cooked beef during storage. *Journal of agricultural and food chemistry* 39: 336–343.
- Duflos G, Coin VM, Cornu M, Antinelli J-F & Malle P (2006) Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 600–611.
- Duflos G, Dervin C, Malle P & Bouquelet S (1999) Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangius merlangus*). *Journal-AOAC International* 82: 1357–1363.
- Duflos G, Le Fur B, Mulak V, Becel P & Malle P (2002) Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 1341–1345.
- Duflos G, Leduc F, N'Guessan A, Krzewinski F, Kol O & Malle P (2010) Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 2568–2575.
- Duflos G, Theraulaz L, Giordano G, Mejean V & Malle P (2010) Quantitative PCR Method for Evaluating Freshness of Whiting (*Merlangius merlangus*) and Plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Food Protection* 73: 1344–1347.
- Dupont D & Steen D (2004) Colorimétrie: Mesure des couleurs de surface. *Techniques de l'ingénieur. Mesures et contrôle*.
- Eastman JT (2005) The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Polar Biology* 28: 93–107.
- Eckert R (1999) *Physiologie animale: Mécanismes et adaptations*. De Boeck Supérieur.
- Edgar RC (2004a) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* 5: 113.
- Edgar RC (2004b) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32: 1792–1797.
- EFSA (2014) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12: 3547.
- Ekman E, Börjeson H & Johansson N (1999) Flavobacterium psychrophilum in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. *Diseases of aquatic organisms* 37: 159–163.
- Elizaquível P, Gabaldón J & Aznar R (2011) Quantification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis. *Food Control* 22: 158–164.
- Emborg J, Dalgaard P & Ahrens P (2006) *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56: 2473–2479.
- Erickson M (2000) Chemical Treatments to Control Enzymes in Fishery Products. *Seafood Enzyme: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality* 489–504.
- European commission (2013) Commission Regulation (EC) n°1019/2013 of 23 October 2013 amending Annex I to Regulation (EC) n°2073/2005. *Official Journal of the European Union* L282: 46–47.
- European commission (2007) Commission Regulation (EC) n°1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) n°2073/2005 on microbiological criteria for foodstuff. *Official Journal of the European Union* L322: 1–26.
- European commission (2005a) Commission Regulation (EC) n°2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L338: 1–26.
- European commission (2005b) Commission Regulation (EC) n°2074/2005 of 5 December 2005. *Official Journal of the European Union* L338: 27–59.
- Falcy M & Malard S (2005) Comparaison des seuils olfactifs de substances chimiques avec des indicateurs de sécurité utilisés en milieu professionnel. 7–21.
- FAO (2010) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO, Rome.
- FAO (2012) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO, Rome.
- Ferrario C, Pegollo C, Ricci G, Borgo F & Fortina MG (2012) PCR Detection and Identification of His

- tamine-Forming Bacteria in Filleted Tuna Fish Samples. *Journal of food science* 77: 115–120.
- FranceAgriMer (2013) *Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture*. FranceAgriMer.
- Frankel E (2005) *Lipid Oxidation*. Second Edition. The Oily Press Lipid Library.
- Frankel E. (1983) Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research* 22: 1–33.
- Fu X, Xu S & Wang Z (2009) Kinetics of lipid oxidation and off-odor formation in silver carp mince: The effect of lipoxygenase and hemoglobin. *Food Research International* 42: 85–90.
- Fukushima H, Katsube K, Hata Y, Kishi R & Fujiwara S (2007) Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 92–100.
- Fusco V, Quero GM, Morea M, Blaiotta G & Visconti A (2011) Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. *International journal of food microbiology* 144: 528–537.
- García-González DL, Tena N, Aparicio-Ruiz R & Morales MT (2008) Relationship between sensory attributes and volatile compounds qualifying dry-cured hams. *Meat Science* 80: 315–325.
- Gargouri M, Ben Akacha N, Kotti F & Ben Rejeb I (2008) Lipoxygenase pathway: valorization of plant oils and aroma biosynthesis. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 12: 185–202.
- Genest O, Seduk F, Ilbert M, Méjean V & Ibbi-Nivol C (2006) Signal peptide protection by specific chaperone. *Biochemical and biophysical research communications* 339: 991–995.
- Gibson DM & Ogden ID (1997) Total Viable Counts. *Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness,"* pp. 147–150. Nantes.
- Giordano G, Dos Santos J-P & Méjean V (2001) Séquences nucléotidiques issues de gènes codant pour la triméthylamine N-oxide réductase et leurs utilisantes, notamment pour la détection de bactéries. Brevet N°FR2798393.
- Giri A, Osako K, Okamoto A & Ohshima T (2010) Olfactometric characterization of aroma active compounds in fermented fish paste in comparison with fish sauce, fermented soy paste and sauce products. *Food Research International* 43: 1027–1040.
- Gisch W (1991) *NRDB - nonredundant database generator*. [goo.gl/UPzfmS](http://goo.gl/UPzfmS) (Accessed July 12, 2014).
- Glebe B (2012) L'effet de la photopériode sur la croissance et la maturation du saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) dans la baie de Fundy. *Fiches techniques du Programme coopératif de recherche et développement en aquaculture (PCRDA)* 14.
- Goll D, Neti G, Mares S & Thompson V (2008) Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *Journal of animal science* 86: E19–E35.
- Gon S, Giudici-Ortoni M-T, Méjean V & Ibbi-Nivol C (2001) Electron transfer and binding of the cytochrome TorC to the trimethylamine N-oxide reductase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 11545–11551.
- Gon S, Jourlin-Castelli C, Théraulaz L & Méjean V (2001) An unsuspected autoregulatory pathway involving apocytochrome TorC and sensor TorS in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 11615–11620.
- Gonçalves A, Pereira T, Bettencourt F, Nunes M & Quinta R (1997) Nucleotide degradation as an indicator of freshness in groundfish and small pelagic fish species. *Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness,"* pp. 273–276. Nantes.
- Gonçalves C & Alpendurada M (2004) Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. *Journal of chromatography A* 1026: 239–250.
- Gouy M & Delmotte S (2008) Remote access to ACNUC nucleotide and protein sequence databases at PBIL. *Biochimie* 90: 555–562.
- Gram L & Dalgaard P (2002) Fish spoilage bacteria - problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 262–266.
- Gram L & Huss HH (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33: 121–137.
- Gram L, Trolle G & Huss HH (1987) Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 4: 65–72.
- Grattepanche F, Lacroix C, Audet P & Lapointe G (2005) Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by a mixed culture. *Applied microbiology and biotechnology* 66: 414–421.
- Grigorakis K, Giogios I, Vasilaki A & Nengas I (2010) Effect of the fish oil, oxidation status and of heat treatment temperature on the volatile compounds of the produced fish feeds. *Animal Feed Science and Technology* 158: 73–84.
- Grigorakis K, Taylor K & Alexis M (2003) Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): sensory differences and possible chemical basis. *Aquaculture* 225: 109–119.
- Grisez L, Reyniers J, Verdonck L, Swings J & Ollevier F (1997) Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture* 155: 387–399.
- Gronostajski RM (1986) Analysis of nuclear factor I binding to DNA using degenerate oligonucleotides. *Nucleic acids research* 14: 9117–9132.
- Grosch W (1987) Reactions of Hydroperoxides - Products of Low Molecular Weight. *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, (Chan, HWS, ed), pp. 95–139. Academic Press, London.
- Haakensen M, Butt L, Chaban B, Deneer H, Ziola B & Dowgiert T (2007) *horA*-specific real-time PCR for detection of beer-spoilage lactic acid bacteria.

- Journal of the American Society of Brewing Chemists* 65: 157–165.
- Hall HK (1957) Correlation of the Base Strengths of Amines. *Journal of the American Chemical Society* 79: 5441–5444.
- Han F, Huang X, Teye E, Gu F & Gu H (2014) Nondestructive detection of fish freshness during its preservation by combining electronic nose and electronic tongue techniques in conjunction with chemometric analysis. *Analytical Methods* 6: 529–536.
- Hansen G & Olafsen J (1999) Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38: 1–26.
- Hardy RW (1996) Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Animal Feed Science and Technology* 59: 71–80.
- Hartvigsen K, Lund P, Hansen LF & Holmer G (2000) Dynamic Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry Characterization of Volatiles Produced in Fish Oil Enriched Mayonnaise during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4858–4867.
- Hatzixanthis K, Clarke TA, Oubrie A, Richardson DJ, Turner RJ & Sargent F (2005) Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8460–8465.
- Hebard C, Flick G & Martin R (1982) Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. *Chemistry and biochemistry of marine food products* 149–304.
- Heising JK, Dekker M, Bartels PV & van Boekel MAJS (2012) A non-destructive ammonium detection method as indicator for freshness for packed fish: Application on cod. *Journal of Food Engineering* 110: 254–261.
- Helfman PG, Collette B & Facey D (1997) *The Diversity of Fishes*. 1st ed. Wiley-Blackwell.
- Helgason E, Økstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I & Kolstø A-B (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence. *Applied and environmental microbiology* 66: 2627–2630.
- Henehan G, Proctor M, Abu-Ghannam N, Wills C & McLoughlin J (1997) Adenine nucleotides and their metabolites as determinants of fish freshness. *Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness,"* pp. 266–272. Nantes.
- Hennion M-C (1999) Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 856: 3–54.
- Herbert RA, Ellis JR & Shewan JM (1975) Isolation and identification of the volatile sulphides produced during chill-storage of north sea cod (*Gadus morhua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26: 1187–1194.
- Hird H, Lloyd J, Goodier R, Brown J & Reece P (2003) Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *European Food Research and Technology* 217: 265–268.
- Ho C-T & Chen Q (1994) Lipids in Food Flavors. *Lipids in Food Flavors*, Vol. 558 ACS Symposium Series, pp. 2–14. American Chemical Society.
- Ho M, Chen G & Jiang S (2000) Effects of mackerel cathepsins L and L-like, and calpain on the degradation of mackerel surimi. *Fisheries Science* 66: 558–568.
- De Hoffmann E, Charette J & Stroobant V (1999) *Spectrométrie de masse*. 2ème Edition. Dunod, Paris.
- Howgate P (2006) A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *International journal of food science & technology* 41: 341–353.
- Hsieh RJ & Kinsella JE (1989) *Oxidation of polyunsaturated fatty acids: Mechanisms, Products, and Inhibition with emphasis on Fish*. Academic Press, Inc.
- Hughes R & Jones N (1966) Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material, with a comment on flavour relations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 17: 434–436.
- Huidobro A, Pastor A & Tejada M (2000) Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science* 65: 1202–1205.
- Huss HH (1999) La qualité et son évolution dans le poisson frais. *FAO Doc. Tech. sur les Pêches* 196.
- Hyldeg G, Martinsdóttir E, Sveinsdóttir K, Schlevig R & Bremner A (2010) Quality Index Method. *Handbook of seafood and seafood products analysis*, pp. 463–480. CRC Press.
- Ifremer (2011) A quelle profondeur évoluent les espèces marines ? <http://goo.gl/ZWAozq> (Accessed March 20, 2013).
- Ifremer (2008a) Fiche de synthèse sur l'ABVT. *Bibliomer* <http://goo.gl/6MLChx> (Accessed September 8, 2013).
- Ifremer (2008b) Les limites de l'utilisation de l'ABVT. *Bibliomer* <http://goo.gl/6MLChx> (Accessed January 12, 2014).
- Iglesias J & Medina I (2008) Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *Journal of Chromatography A* 1192: 9–16.
- Ikeda S (1980) Other organic components and inorganic components. *Advances in fish science and technology*, pp. 111–124. J.J Connell, Aberdeen.
- Ilbert M, Méjean V, Giudici-Ortoni M-T, Samama J-P & Iobbi-Nivol C (2003) Involvement of a mate chaperone (TorD) in the maturation pathway of molybdoenzyme TorA. *Journal of Biological Chemistry* 278: 28787–28792.
- Iobbi-Nivol C & Leimkühler S (2013) Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1827: 1086–1101.

- Ip YK & Chew SF (2010) Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Frontiers in physiology* 1.
- Iwamoto M, Yamanaka H, Watabe S & Hashimoto K (1987) Effect of Storage Temperature on Rigor-Mortis and ATP Degradation in Plaice *Paralichthys olivaceus* Muscle. *Journal of Food Science* 52: 1514–1517.
- Jaffrès E, Lalanne V, Macé S, Cornet J, Cardinal M, Sérot T, Dousset X & Joffraud J-J (2011) Sensory characteristics of spoilage and volatile compounds associated with bacteria isolated from cooked and peeled tropical shrimps using SPME–GC–MS analysis. *International Journal of Food Microbiology* 147: 195–202.
- Jaques L (1973) Protamine—antagonist to heparin. *Canadian Medical Association Journal* 108: 1291.
- Jeya Shakila R, Vasundhara T & Kumudavally K (2001) A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food chemistry* 75: 255–259.
- Jia M, Zhang QH & Min DB (1998) Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 2744–2747.
- Jiang S-T (2000) Enzymes and their effects on seafood texture. *Seafood Enzyme: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality* 411–450.
- Jiang S-T, Lee J-J & Chen H-C (1996) Proteolysis of actomyosin by cathepsins B, L, L-like, and X from mackerel (*Scomber australasicus*). *Journal of agricultural and food chemistry* 44: 769–773.
- Jiang S-T, Lee J-J & Chen H-C (1994) Purification and characterization of cathepsin B from ordinary muscle of mackerel (*Scomber australasicus*). *Journal of agricultural and food chemistry* 42: 1073–1079.
- Jöborn A, Dorsch M, Olsson JC, Westerdahl A & Kjelleberg S (1999) *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49: 1891–1898.
- Joffraud JJ, Leroi F, Roy C & Berdagué JL (2001) Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 66: 175–184.
- Johnston IA (1999) Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177: 99–115.
- Jónsdóttir R, Sveinsdóttir K, Magnússon H, Arason S, Lauritzsen K & Thorarinsdóttir KA (2011) Flavor and Quality Characteristics of Salted and Desalted Cod (*Gadus morhua*) Produced by Different Salting Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 3893–3904.
- Josephson DB (1991) Seafood. *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, Vol. 44 *Food Science and Technology*, pp. 179–202. Henk Maarse.
- Josephson DB & Lindsay RC (1987) Retro-Aldol Related Degradations of 2,4-Decadienal in the Development of Staling Flavors In Fried Foods. *Journal of Food Science* 52: 1186–1190.
- Jourlin C, Ansaldi M & Méjean V (1997) Transphosphorylation of the TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 267: 770–777.
- Jourlin C, Simon G, Pommier J, Chippaux M & Méjean V (1996) The periplasmic TorT protein is required for trimethylamine N-oxide reductase gene induction in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 178: 1219–1223.
- Journal officiel de la République Française (1979) Arrêté du 21 décembre 1979 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale. <http://goo.gl/TQxbDJ> (Accessed January 22, 2014).
- Kanda K, Hanabusa K & Takeuchi N (1993) Suri-mi manufacturing process. Patent No 5223301.
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M & Tanabe M (2012) KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research* 40: D109–D114.
- Kanki M, Yoda T, Ishibashi M & Tsukamoto T (2004) *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *International journal of food microbiology* 92: 79–87.
- Karube I, Matsuoka H, Suzuki S, Watanabe E & Toyama K (1984) Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 314–319.
- Kato J, Funa N, Watanabe H, Ohnishi Y & Hironouchi S (2007) Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 2378–2383.
- Kause A, Ritola O, Paananen T, Mäntysaari E & Eskelinen U (2003) Selection against early maturity in large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the quantitative genetics of sexual dimorphism and genotype-by-environment interactions. *Aquaculture* 228: 53–68.
- Kawabata T (1953) Studies on the trimethylamine oxide-reductase-I. Reduction of trimethylamine oxide in the dark muscle of pelagic migrating fish under aseptic condition. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 19: 505–512.
- Kawai M, Okiyama A & Ueda Y (2002) Taste enhancements between various amino acids and IMP. *Chemical senses* 27: 739–745.
- Kawai T & Sakaguchi M (1996) Fish flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36: 257–298.
- Ke PJ, Nash DM & Ackman RG (1976) Quality Preservation in Frozen Mackerel. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 9: 135–138.
- Kestemont P, Micha JC & Falter U (1989) Les Méthodes de Production d'Alevins de *Tilapia nilotica*. Département des pêches de la FAO. <http://goo.gl/F35UTA> (Accessed July 31, 2014).
- Khalil MAK & Rasmussen RA (1984) Global sources, lifetimes and mass balances of carbonyl sulfide (OCS) and carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) in the earth's

- atmosphere. *Atmospheric Environment* (1967) 18: 1805–1813.
- Kim S-K, Park P-J, Kim J-B & Shahidi F (2002) Purification and characterization of a collagenolytic protease from the filefish, *Novodon modestrus*. *Journal of biochemistry and molecular biology* 35: 165–171.
- Koivula T, Juvonen R, Haikara A & Suihko M (2006) Characterization of the brewery spoilage bacterium *Obesumbacterium proteus* by automated ribotyping and development of PCR methods for its biotype 1. *Journal of applied microbiology* 100: 398–406.
- Kolmogorov AN (1933) Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione. *Giornale dell'Istituto Italiano degli Attuari* 4: 83–91.
- Komes D, Ulrich D & Lovric T (2006) Characterization of odor-active compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. *European Food Research and Technology* 222: 1–7.
- Konosu S, Watanabe K & Shimizu T (1974) Distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts of eight species of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 40.
- Konosu S & Yamaguchi K (1982) The flavor components in fish and shellfish. *Chemistry and biochemistry of marine food products*, pp. 367–404. Martin, R.E., Westport.
- Koskela KA, Matero P, Blatny JM, Fykse EM, Olsen JS, Nuotio LO & Nikkari S (2009) A multiplatform real-time polymerase chain reaction detection assay for *Vibrio cholerae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 65: 339–344.
- Koutsoumanis K, Taoukis P, Drosinos ES & Nychas G-JE (1997) Lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* - The dominant spoilage microflora of mediterranean fresh sea fish stored under modified atmosphere packaging conditions. *Proceedings of the final meeting of the concerted action "Evaluation of fish freshness,"* pp. 158–165. Nantes.
- Kovács Á, Simon-Sarkadi L & Ganzler K (1999) Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 836: 305–313.
- Kröger M (2003) Image analysis for monitoring the quality of fish. *Quality of fish from catch to consumer—labelling, monitoring and traceability*, pp. 211–224. J.B Luten, J. Oehlenschläger, G. Olafsdottir.
- Kruskal WH & Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association* 47: 583–621.
- Kuchta T (2013) Sample Preparation for Real-time PCR in Food Science. *Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*, pp. 27–34. Caister Academic Press.
- Kuo H-W & Ding W-H (2004) Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1027: 67–74.
- Kurtovic I & Marshall SN (2013) Potential of fish by-products as a source of novel marine lipases and their uses in industrial applications. *Lipid Technology* 25: 35–37.
- Laleye L, Simard R, Gosselin C, Lee B & Giroux R (1987) Assessment of Cheddar cheese quality by chromatographic analysis of free amino acids and biogenic amines. *Journal of Food Science* 52: 303–305.
- Landaud S, Helinck S & Bonnarme P (2008) Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 1191–1205.
- Larsen R, Stormo SK, Dragnes BT & Elvevoll EO (2007) Losses of taurine, creatine, glycine and alanine from cod (*Gadus morhua* L.) fillet during processing. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 396–402.
- Leduc F (2011) Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques. Thèse de doctorat, Université de Lille 1.
- Leduc F, Krzewinski F, Le Fur B, N'Guessan A, Malle P, Kol O & Duflos G (2012) Differentiation of fresh and frozen/thawed fish, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*), using volatile compounds by SPME/GC/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2560–2568.
- Leduc F, Tournayre P, Kondjoyan N, Mercier F, Malle P, Kol O, Berdagué JL & Duflos G (2012) Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry* 131: 1304–1311.
- Lee J-L & Levin RE (2007) Quantification of total viable bacteria on fish fillets by using ethidium bromide monoazide real-time polymerase chain reaction. *International journal of food microbiology* 118: 312–317.
- Lee S-J & Noble AC (2003) Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 8036–8044.
- Lees A, Shenstone Richards JC & Jason AC (1972) Methods and apparatus for determining the condition of food. Patent No 3665302.
- Leger C (1985) Digestion, absorption and transport of lipids. *Nutrition and feeding in fish* 299–331.
- Leger C, Bauchart D & Flanzly J (1977) Some properties of pancreatic lipase in *Salmo gairdnerii* rich.: Km, effects of bile salts and Ca<sup>2+</sup>, gel filtrations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 57: 359–363.
- Lehane L & Olley J (2000) Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology* 58: 1–37.
- Levasseur M, Keller MD, Bonneau E, D'Amours D & Bellows WK (1994) Oceanographic Basis of a DMS-Related Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Fishery Problem: Blackberry Feed. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51: 881–889.
- Li X, Zeng Z, Zhou J, Gong S, Wang W & Chen Y (2004) Novel fiber coated with amide bridged-calix [4] arene used for solid-phase microextraction of aliphatic amines. *Journal of Chromatography A* 1041: 1–9.



- Limacher A, Kerler J, Davidek T, Schmalzried F & Blank I (2008) Formation of Furan and Methylfuran by Maillard-Type Reactions in Model Systems and Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3639–3647.
- Limbo S, Sinelli N, Torri L & Riva M (2009) Freshness decay and shelf life predictive modelling of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) applying chemical methods and electronic nose. *LWT - Food Science and Technology* 42: 977–984.
- Lipman DJ & Pearson WR (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227: 1435–1441.
- Lohne P (1976) Fettfraskilling-ny kunnskap kan aapne for flere prosessmuligheter. *Inf. SSF (Nor. Oil Meal Ind. Res. Inst.)* 9–14.
- Lopez-Amaya C & Marangoni A (2000a) Lipases. *Seafood Enzyme: Utilization and Influence on Post-harvest Seafood Quality* 121–146.
- Lopez-Amaya C & Marangoni A (2000b) Phospholipases. *Seafood Enzyme: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality* 91–120.
- López-Enríquez L, Rodríguez-Lázaro D & Hernández M (2007) Quantitative detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk by real-time PCR. *Applied and environmental microbiology* 73: 3747–3751.
- Lougovois VP, Kyranas ER & Kyranas VR (2003) Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International* 36: 551–560.
- Love RM (1980) *The Chemical Biology of Fishes (Volume 2)*. Academic Press London.
- Mackie I (1980) A review of some recent applications of electrophoresis and isoelectric focusing in the identification of species of fish in fish and fish products. *Advances in fish science and technology*, pp. 444–451. J.J Connell, Aberdeen.
- Mackie I (1997) The effects of post-mortem storage on fish muscle proteins. *Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness,"* pp. 185–189. Nantes.
- Maffei ME, Mithöfer A & Boland W (2007) Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry* 68: 2946–2959.
- Maillard LC (1912) Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoïdines par voie méthodique. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, Vol. 154, pp. 66–68. Gauthier-Villars, Paris.
- Makino H, Fujimoto J & Watanabe K (2010) Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for detection and enumeration of yeasts of public health interest in dairy products. *International journal of food microbiology* 140: 76–83.
- Malle P & Poumeyrol M (1989) A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *Journal of food protection* 52.
- Marathe SA, Chowdhury R, Bhattacharya R, Nagarajan AG & Chakravorty D (2012) Direct detection of *Salmonella* without pre-enrichment in milk, ice-cream and fruit juice by PCR against hliA gene. *Food Control* 23: 559–563.
- Marcobal A, Polo M, Martín-Alvarez P & Moreno-Arribas M (2005) Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food research international* 38: 387–394.
- Marsili R (1999) Comparison of Solid-Phase Microextraction and Dynamic Headspace Methods for the Gas Chromatographic—Mass Spectrometric Analysis of Light-Induced Lipid Oxidation Products in Milk. *Journal of chromatographic science* 37: 17–23.
- Martínez N, Martín MC, Herrero A, Fernández M, Alvarez MA & Ladero V (2011) qPCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: Significance for food quality. *Trends in Food Science & Technology* 22: 367–376.
- Martínez-Blanch J, Sánchez G, Garay E & Aznar R (2009) Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *International journal of food microbiology* 135: 15–21.
- Martinsdóttir E, Luten J, Schelvis-Smit A & Hyldig G (2003) Developments of QIM-past and future. *Quality of fish from catch to consumer—labelling, monitoring and traceability*, pp. 265–272. J.B Luten, J. Oehlenschläger, G. Olafsdottir.
- Masco L, Vanhoutte T, Temmerman R, Swings J & Huys G (2007) Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and *recA* genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *International journal of food microbiology* 113: 351–357.
- McGuinness S, McCabe E, O'Regan E, Dolan A, Duffy G, Burgess C, Fanning S, Barry T & O'Grady J (2009) Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat. *Meat science* 83: 555–562.
- McSweeney PLH & Sousa MJ (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80: 293–324.
- Mebazaa R, Rega B & Camel V (2011) Analysis of human male armpit sweat after fenugreek ingestion: characterisation of odour active compounds by gas chromatography coupled to mass spectrometry and olfactometry. *Food Chemistry* 128: 227–235.
- Medina I, Gallardo JM & Aubourg SP (2009) Quality preservation in chilled and frozen fish products by employment of slurry ice and natural antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology* 44: 1467–1479.
- Medina I, Satué-Gracia M & Frankel E (1999) Static headspace gas chromatographic analyses to determine oxidation of fish muscle lipids during thermal processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76: 231–236.
- Méjean V, Lobbi-Nivol C, Lepelletier M, Giordano G, Chippaux M & Pascal M (1994) TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon. *Molecular microbiology* 11: 1169–1179.
- Melero B, Cocolin L, Rantsiou K, Jaime I & Rovira J (2011) Comparison between conventional and qPCR methods for enumerating *Campylobacter jejuni*

- in a poultry processing plant. *Food microbiology* 28: 1353–1358.
- Mercier B, Gaucher C, Feugeas O & Mazurier C (1990) Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic acids research* 18: 5908.
- Methven L, Tsoukka M, Oruna-Concha MJ, Parker JK & Mottram DS (2007) Influence of sulfur amino acids on the volatile and nonvolatile components of cooked salmon (*Salmo salar*). *Journal of agricultural and food chemistry* 55: 1427–1436.
- Meyer A & Stockmeyer L (1972) The equivalence problem for regular expressions with squaring requires exponential space. pp. 125–129.
- Meynier A, Genot C & Gandemer G (1998) Volatile compounds of oxidized pork phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75: 1–7.
- Mietz JL & Karmas E (1977) Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science* 42: 155–158.
- Miller A, Scanlan R, Lee J & Libbey L (1973) Identification of the volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. *Applied microbiology* 25: 952–955.
- Miller A, Scanlan R, Lee J, Libbey L & Morgan M (1973) Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. *Applied microbiology* 25: 257–261.
- Milo C & Grosch W (1993) Changes in the odorants of boiled trout (*Salmo fario*) as affected by the storage of the raw material. *Journal of agricultural and food chemistry* 41: 2076–2081.
- Minarovicova J, Kaclikova E & Kuchta T (2010) A method for the detection of *Cryptosporidium parvum* in apple juice based on microfiltration and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food & Nutrition Research* 49.
- Miyasaki T, Hamaguchi M & Yokoyama S (2011) Change of Volatile Compounds in Fresh Fish Meat during Ice Storage. *Journal of Food Science* 76: C1319–C1325.
- Monnet C, Correia K, Sarthou A-S & Irlinger F (2006) Quantitative detection of *Corynebacterium casei* in cheese by real-time PCR. *Applied and environmental microbiology* 72: 6972–6979.
- Montel MC, Masson F & Talon R (1998) Bacterial role in flavour development. *Meat Science* 49, Supplement 1: S111–S123.
- Moore JO & Hendrickson WA (2009) Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS. *Structure* 17: 1195–1204.
- Morales MT, Luna G & Aparicio R (2005) Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry* 91: 293–301.
- Morisset D, Štebih D, Milavec M, Gruden K & Žel J (2013) Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS One* 8: e62583.
- Mottram DS (1998) Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food chemistry* 62: 415–424.
- Mukundan M, Gopakumar K & Nair M (1985) Purification of a lipase from the hepatopancreas of oil sardine (*Sardinella longiceps* Linnaeus) and its characteristics and properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 191–203.
- Munro P, Barbour A & Birkbeck T (1994) Comparison of the gut bacterial flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. *Journal of Applied microbiology* 77: 560–566.
- Muramoto M, Yamamoto Y & Seki N (1989) Comparison of calpain susceptibility of various fish myosins in relation to their thermal stabilities. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 55.
- Murray J & Burt JR (1969) *The composition of fish*. Torry Research Station.
- Nagai T & Suzuki N (2000) Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. *Food Chemistry* 68: 277–281.
- Nalli S, Horn OJ, Grochowalski AR, Cooper DG & Nicell JA (2006) Origin of 2-ethylhexanol as a VOC. *Environmental pollution* 140: 181–185.
- Di Natale C, Olafsdottir G, Einarsson S, Martinelli E, Paolesse R & D'Amico A (2001) Comparison and integration of different electronic noses for freshness evaluation of cod-fish fillets. *Sensors and Actuators B: Chemical* 77: 572–578.
- Needleman SB & Wunsch CD (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of molecular biology* 48: 443–453.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the World*. Wiley.
- Nesvadba P (2003) Introduction to and outcome of the project "Multisensor techniques for monitoring the quality of fish (MUSTEC, FAIR CT 98 4076). *Quality of fish from catch to consumer—labelling, monitoring and traceability*, pp. 175–187. J.B Luten, J. Oehlenschläger, G. Olafsdottir.
- Nielsen GS & Poll L (2004) Determination of odor active aroma compounds in freshly cut leek (*Allium ampeloprasum* var. Bulga) and in long-term stored frozen unblanched and blanched leek slices by gas chromatography olfactometry analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 1642–1646.
- Nielsen MK & Jørgensen BM (2004) Quantitative relationship between trimethylamine oxide aldolase activity and formaldehyde accumulation in white muscle from gadiform fish during frozen storage. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 3814–3822.
- Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S & Lilius E-M (2003) Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology* 15: 443–452.
- Nordgarden U, Oppedal F, Taranger G, Hemre G & Hansen T (2003) Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - Growth and feed conversion ratio. *Aquaculture nutrition* 9: 287–293.
- Nordstrom JL, Vickery MC, Blackstone GM, Murray SL & DePaola A (2007) Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic

- Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5840–5847.
- O’Riordan P & Delahunty C (2001) Comparison of volatile compounds released during the consumption of Cheddar cheese with compounds extracted by vacuum distillation using gas chromatography–olfactometry. *Flavour and fragrance journal* 16: 425–434.
- Oberto J (2008) BAGET: a web server for the effortless retrieval of prokaryotic gene context and sequence. *Bioinformatics* 24: 424–425.
- Oehlenschläger J, Luten J & Ólafsdóttir G (2003) Measurement of freshness quality of fish based on electrical properties. *Quality of Fish from Catch to Consumer: Labelling, Monitoring and Traceability, Wageningen: Wageningen Academic Publishers*. p, pp. 237–249. J.B Luten, J. Oehlenschläger, G. Olafsdóttir.
- Oehlenschläger J & Sørensen N (1997) Criteria of fish freshness and quality aspects. *Proceedings of the final meeting of the concerted action “Evaluation of fish freshness,”* pp. 30–35. Nantes.
- Olafsdóttir G *et al.* (1997) Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology* 8: 258–265.
- Olafsdóttir G *et al.* (2004) Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science & Technology* 15: 86–93.
- Olafsdóttir G & Fleurence J (1997) Evaluation of fish freshness using volatile compounds classification of volatile compounds in fish. *Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action “Evaluation of Fish Freshness,”* pp. 55–69. Nantes.
- Olafsdóttir G, Högnadóttir Á, Martinsdóttir E & Jonsdóttir H (2000) Application of an electronic nose to predict total volatile bases in capelin (*Mallotus villosus*) for fishmeal production. *Journal of agricultural and food chemistry* 48: 2353–2359.
- Olafsdóttir G & Jonsdóttir R (2010) Volatile Aroma Compounds in Fish. *Handbook of seafood and seafood products analysis*, pp. 97–117. CRC Press.
- Olafsdóttir G, Jonsdóttir R, Lauzon HL, Luten J & Kristbergsson K (2005) Characterization of Volatile Compounds in Chilled Cod (*Gadus morhua*) Fillets by Gas Chromatography and Detection of Quality Indicators by an Electronic Nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 10140–10147.
- Olafsdóttir G, Di Natale C & Macagnano A (2003) *Measurements of quality of cod by electronic noses*. Wageningen Academic Publisher.
- Olexová L, Dovičovičová L. & Kuchta T (2004) Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. *European Food Research and Technology* 218: 390–393.
- Ong PK & Acree TE (1999) Similarities in the aroma chemistry of Gewürztraminer variety wines and lychee (*Litchi chinesis* Sonn.) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry* 47: 665–670.
- Oraby HA, Hassan AA & Abou Mossallam AA (2005) Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3’ terminator. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1974–1980.
- Osu Charles I & Asuoha Adaku N (2010) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Contamination of Soils in Automobile Mechanic Workshops in Port-Harcourt Metropolis, Rivers State, Nigeria. *Journal of American Science* 6: 242–246.
- Overton SV & Manura JJ (1995) Analysis of volatile organics in cooking oils by thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 43: 1314–1320.
- Ozogul I (2010) Methods for Freshness Quality and Deterioration. *Handbook of seafood and seafood products analysis*, pp. 189–214. CRC Press.
- Park P-J, Lee S-H, Byun H-G, Kim S-H & Kim S-K (2002) Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35: 576–582.
- Pazos M, da Rocha AP, Roepstorff P & Rogowska-Wrzęsinska A (2011) Fish proteins as targets of ferrous-catalyzed oxidation: identification of protein carbonyls by fluorescent labeling on two-dimensional gels and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 7962–7977.
- Pennacchia C, Ercolini D & Villani F (2009) Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. *International journal of food microbiology* 134: 230–236.
- Perelle S, Dilasser F, Grout J & Fach P (2007) Screening food raw materials for the presence of the world’s most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *International journal of food microbiology* 113: 284–288.
- Perera A, Pardo A, Barrettino D, Hierlermann A & Marco S (2010) Evaluation of fish spoilage by means of a single metal oxide sensor under temperature modulation. *Sensors and Actuators B: Chemical* 146: 477–482.
- Peris M & Escuder-Gilbert L (2009) A 21st century technique for food control: Electronic noses. *Analytica Chimica Acta* 638: 1–15.
- Pillonel L, Bosset J & Tabacchi R (2002) Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review. *LWT-Food Science and Technology* 35: 1–14.
- Pinto AD, Forte V, Guastadisegni MC, Martino C, Schena FP & Tantillo G (2007) A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control* 18: 76–80.
- Plutowska B & Wardencki W (2008) Application of gas chromatography–olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages—A review. *Food Chemistry* 107: 449–463.
- Poli B, Parisi G, Scappini F & Zampacavallo G (2005) Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International* 13: 29–49.

- Poli BM, Messini A, Parisi G, Scappini F, Vigiani V, Giorgi G & Vincenzini M (2006) Sensory, physical, chemical and microbiological changes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets packed under modified atmosphere/air or prepared from whole fish stored in ice. *International journal of food science & technology* 41: 444–454.
- Postollec F, Falentin H, Pavan S, Combrisson J & Sohier D (2011) Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology* 28: 848–861.
- Pourmortazavi SM & Hajimirsadeghi SS (2007) Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A* 1163: 2–24.
- Proctor LM & Gunsalus RP (2000) Anaerobic respiratory growth of *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* and *Photobacterium leiognathi* with trimethylamine N-oxide, nitrate and fumarate: ecological implications. *Environmental Microbiology* 2: 399–406.
- Qian M, Nelson C & Bloomer S (2002) Evaluation of fat-derived aroma compounds in Blue cheese by dynamic headspace GC/olfactometry-MS. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79: 663–667.
- Qian M & Reineccius G (2003) Static headspace and aroma extract dilution analysis of Parmigiano Reggiano cheese. *Journal of food science* 68: 794–798.
- Qian MC & Wang Y (2005) Seasonal variation of volatile composition and odor activity value of “Marion” (*Rubus* spp. hyb) and “Thornless Evergreen” (*R. laciniatus* L.) blackberries. *Journal of food science* 70: C13–C20.
- Quéro J-C, Vayne J-J & Monod T (1997) *Les poissons de mer des pêches françaises*. Delachaux et Niestlé.
- Rakotomalala R (2005) TANAGRA: un logiciel gratuit pour l'enseignement et la recherche. *Extraction et Gestion des Connaissances EGC 2005*, Vol. 2 (Cépaduès-Éditions, ed), pp. 697–702. Toulouse.
- Reboredo-Rodríguez P, González-Barreiro C, Cancho-Grande B & Simal-Gándara J (2012) Dynamic headspace/GC–MS to control the aroma fingerprint of extra-virgin olive oil from the same and different olive varieties. *Food Control* 25: 684–695.
- Reekmans R, Stevens P, Vervust T & De Vos P (2009) An alternative real-time PCR method to detect the *Bacillus cereus* group in naturally contaminated food gelatine: a comparison study. *Letters in applied microbiology* 48: 97–104.
- Refsgaard HHF, Haahr A-M & Jensen B (1999) Isolation and Quantification of Volatiles in Fish by Dynamic Headspace Sampling and Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1114–1118.
- Reynisson E, Lauzon HL, Magnusson H, Hreggvidsson GÓ & Marteinsson VT (2008) Rapid quantitative monitoring method for the fish spoilage bacteria *Pseudomonas*. *Journal of Environmental Monitoring* 10: 1357–1362.
- Ringo E & Birkbeck T (1999) Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research* 30: 73–93.
- Rivas-Cañedo A, Juez-Ojeda C, Nuñez M & Fernández-García E (2011) Volatile compounds in ground beef subjected to high pressure processing: A comparison of dynamic headspace and solid-phase microextraction. *Food chemistry* 124: 1201–1207.
- Robert-Pillot A, Copin S, Gay M, Malle P & Quilici ML (2010) Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 143: 190–197.
- Rodríguez-Lázaro D, Cook N & Hernández M (2013) Current Challenges in Real-time PCR Diagnostics in Food Science. *Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*, pp. 21–26. Caister Academic Press.
- Rodríguez-Lázaro D & Hernández M (2013) Introduction to the real-time polymerase chain reaction. *Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*, pp. 3–19. Caister Academic Press.
- Rodríguez-Lázaro D, Jofre A, Aymerich T, Garriga M & Pla M (2005) Rapid Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Salmon Products: Evaluation of Pre-Real-Time PCR Strategies. *Journal of Food Protection* 68: 1467–1471.
- Rossen L, Holmstrøm K, Olsen J & Rasmussen O (1991) A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *International journal of food microbiology* 14: 145–151.
- Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K & Rasmussen OF (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International journal of food microbiology* 17: 37–45.
- Roth B, Slinde E & Arildsen J (2006) Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. *Aquaculture* 257: 504–510.
- Rouessac F & Rouessac A (2000) *Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod.
- Ruskol D & Bendtsen P (1995) Invasion of *S. putrefaciens* during spoilage of fish.
- Van Ruth S, Roozen J & Jansen F (2000) Aroma profiles of vegetable oils varying in fatty acid composition vs. concentrations of primary and secondary lipid oxidation products. *Food/Nahrung* 44: 318–322.
- Ryder JM (1985) Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 678–680.
- Saito T, Arai K & Matsuyoshi M (1959) A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 24: 749–750.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4: 406–425.
- Salas JJ & Sánchez J (1999) The Decrease of Virgin Olive Oil Flavor Produced by High Malaxation Temperature Is Due to Inactivation of Hydroperoxide

- Lyase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 809–812.
- Sánchez-Alonso I, Barroso M & Careche M (2010) Instrumental texture. *Handbook of seafood and seafood products analysis*, pp. 425–437. CRC Press.
- Dos Santos J-P (1999) Etude du système respiratoire triméthylamine N-oxide réductase chez les bactéries marines: application à la détection par PCR des bactéries impliquées dans l'altération des tissus d'organismes marins. Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, Marseille.
- Dos Santos J-P, Ibbi-Nivol C, Couillault C, Giordano G & Méjean V (1998) Molecular analysis of the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *Journal of Molecular Biology* 284: 421–433.
- Santos M (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 29: 213–231.
- Satouchi K, Sakaguchi M, Shirakawa M, Hirano K & Tanaka T (1994) Lysophosphatidylcholine from white muscle of bonito *Euthynnus pelamis* (Linnaeus): involvement of phospholipase A1 activity for its production. *Biochimica et biophysica acta* 1214: 303.
- Schubring R (2010) Quality Assessment of Fish and Fishery Products by Color Measurement. *Handbook of seafood and seafood products analysis*, pp. 395–424. CRC Press.
- Sears HJ, Sawers G, Berks BC, Ferguson SJ & Richardson DJ (2000) Control of periplasmic nitrate reductase gene expression (*napEDABC*) from *Paracoccus pantotrophus* in response to oxygen and carbon substrates. *Microbiology* 146: 2977–2985.
- Selli S, Canbas A, Varlet V, Kelebek H, Prost C & Serot T (2007) Characterization of the most odor-active volatiles of orange wine made from a Turkish cv. Kozan (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of agricultural and food chemistry* 56: 227–234.
- Shapiro SS & Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591–611.
- Shen F, Du W, Kreutz JE, Fok A & Ismagilov RF (2010) Digital PCR on a SlipChip. *Lab on a Chip* 10: 2666–2672.
- Sheridan MA, Friedlander JK & Allen WV (1985) Chylomicra in the serum of postprandial steelhead trout (*Salmo gairdnerii*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 81: 281–284.
- Shewan J (1951) The chemistry and metabolism of the nitrogenous extractives in fish. Vol. 6, pp. 28–48.
- Shewan JM (1977) *The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action*. Torrey Research Station.
- Shewan JM (1976) The biochemistry and microbiology of low temperature spoilage. *Food Technology in Australia* 11: 409–410.
- Shimada K, Kimura E, Yasui Y, Tanaka H, Matsu-shita S, Hagihara H, Nagakura M & Kawahisa M (1992) Styrene formation by the decomposition by *Pichia carsonii* of trans-cinnamic acid added to a ground fish product. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1577–1582.
- Sievers F *et al.* (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7.
- Sikorski ZE & Kotakowski E (2000) Endogenous enzyme activity and seafood quality: Influence of chilling, freezing, and other environmental factors. *Seafood Enzyme: Utilization and Influence on Post-harvest Seafood Quality* 451–488.
- Šimat V & Dalgaard P (2011) Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood. *LWT-Food Science and Technology* 44: 399–406.
- Simon G, Méjean V, Jourlin C, Chippaux M & Pascal M-C (1994) The *torR* gene of *Escherichia coli* encodes a response regulator protein involved in the expression of the trimethylamine N-oxide reductase genes. *Journal of bacteriology* 176: 5601–5606.
- Simpson BK (2000) Digestive proteinases from marine animals. *Seafood Enzyme: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality* 191–214.
- Singh VK & Kumar A (2001) PCR primer design. *Mol. Biol. Today* 2: 27–32.
- Sinz Q & Schwab W (2012) Metabolism of amino acids, dipeptides and tetrapeptides by *Lactobacillus sakei*. *Food Microbiology* 29: 215–223.
- Smith MP, Sansom IJ & Repetski JE (1996) History of the first fish. *Nature* 380: 702–704.
- Smith TF & Waterman MS (1981) Comparison of biosequences. *Advances in Applied Mathematics* 2: 482–489.
- Sotelo CG & Rehbein H (2000) TMAO-degrading enzymes. *Seafood Enzyme: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality* 167–190.
- Stansby ME (1962) Proximate composition of fish. *Fish in nutrition*, Fishing News Books Ltd., pp. 55–61. Heen, E. & Kreuzer, R, Londres.
- Student (1908) The probable error of a mean. *Biometrika* 1–25.
- Suo B, He Y, Tu S-I & Shi X (2010) A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* in meat products. *Food-borne pathogens and disease* 7: 619–628.
- Surette ME, Gill TA & LeBlanc PJ (1988) Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 19–22.
- Suyama M, Hirano T, Okada N & Shibuya T (1977) Quality of wild and cultured Ayu 1. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 43: 535–540.
- Suyama M & Suzuki H (1975) Nitrogenous constituents in the muscle extracts of marine elasmobranchs. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 41.
- Suyama M & Tokuhiko T (1954) Urea content and ammonia formation of the muscle of cartilaginous

- fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 19: 1003–1006.
- Suyama M & Yoshizawa Y (1973) Free Amino Acid Composition of the Skeletal Muscle of Migratory Fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 39.
- Suzuki T, Hirano T & Suyama M (1987) Free imidazole compounds in white and dark muscles of migratory marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 87: 615–619.
- Sveinsdottir K, Martinsdottir E, Hyldig G, Jørgensen B & Kristbergsson K (2002) Application of Quality Index Method (QIM) Scheme in Shelf-life Study of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science* 67: 1570–1579.
- Tahergorabi R, Beamer SK, Matak KE & Jaczynski J (2012) Salt substitution in surimi seafood and its effects on instrumental quality attributes. *LWT-Food Science and Technology* 48: 175–181.
- Takahashi H, Kimura B, Tanaka Y, Shinozaki J, Suda T & Fujii T (2009) Real-time PCR and enrichment culture for sensitive detection and enumeration of *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods* 79: 124–127.
- Taoukis P, Koutsoumanis K & Nychas G (1999) Use of time–temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. *International Journal of Food Microbiology* 53: 21–31.
- Tapi A, Chollet-Imbert M, Scherens B & Jacques P (2010) New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Applied microbiology and biotechnology* 85: 1521–1531.
- Tejada M, De las Heras C & Kent M (2007) Changes in the quality indices during ice storage of farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *European Food Research and Technology* 225: 225–232.
- Teletchea F (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19: 265–293.
- The European Parliament & The European Council (2011) Regulation (EU) n° 1169/2011 of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) n° 1924/2006 and (EC) n° 1925/2006 of the European Parliament. *Official Journal of the European Union* L 304: 18–63.
- Theraulaz L (2007) Etude de la régulation du système respiratoire TMAO réductase chez *Escherichia coli*.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22: 4673–4680.
- Timm M & Jørgensen BM (2002) Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. *Food chemistry* 76: 509–518.
- Tocher D & Sargent J (1984) Studies on triacylglycerol, wax ester and sterol ester hydrolases in intestinal caeca of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diets rich in triacylglycerols and wax esters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 77: 561–571.
- Tocher DR (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11: 107–184.
- Tocher DR & Harvie DG (1988) Fatty acid compositions of the major phosphoglycerides from fish neural tissues; (n–3) and (n–6) polyunsaturated fatty acids in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and cod (*Gadus morhua*) brains and retinas. *Fish Physiology and Biochemistry* 5: 229–239.
- Toledo RT (2007) Wood Smoke Components and Functional Properties. *International smoked seafood conference proceedings*, (Kramer, DE & Brown, L, eds), pp. 55–62. Alaska Sea Grant College Program.
- Toranzo A *et al.* (1993) Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. *Aquaculture* 114: 189–202.
- Torrieri E, Cavella S, Villani F & Masi P (2006) Influence of modified atmosphere packaging on the chilled shelf life of gutted farmed bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Food Engineering* 77: 1078–1086.
- Tranchant J, Arpino P, Prévôt A, Serpinet J, Vergnol A & Witier P (1995) *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse*. Quatrième édition. Masson, Paris.
- Triqui R & Bouchriti N (2003) Freshness Assessments of Moroccan Sardine (*Sardina pilchardus*): Comparison of Overall Sensory Changes to Instrumentally Determined Volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7540–7546.
- Triqui R & Reineccius GA (1995) Changes in Flavor Profiles with Ripening of Anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1883–1889.
- Trust T (1975) Bacteria associated with the gills of salmonid fishes in freshwater. *Journal of Applied Microbiology* 38: 225–233.
- Undeland I (1997) Lipid-protein interactions in fish during cold storage. *Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness,"* pp. 12–14. Nantes.
- Unemoto T, Hayashi M, Miyaki K & Hayashi M (1965) Intracellular localization and properties of trimethylamine-N-oxide reductase in *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation* 110: 319–328.
- Varlet V, Knockaert C, Prost C & Serot T (2006) Comparison of Odor-Active Volatile Compounds of Fresh and Smoked Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3391–3401.
- Varlet V, Prost C & Serot T (2007) Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurrence and mechanisms of formation. *Food Chemistry* 105: 1536–1556.

- Vaubourdolle M (2007) *Toxicologie, Sciences mathématiques, Physiques et Chimiques*. Wolters Kluwer France.
- Veciana-Nogues M, Albala-Hurtado M, Izquierdo-Pulido M & Vidal-Carou M (1996) Validation of a gas-chromatographic method for volatile amine determination in fish samples. *Food chemistry* 57: 569–573.
- Vencia W, Nogarol C, Bianchi D, Gallina S, Zuccon F, Adriano D, Gramaglia M & Decastelli L (2014) Validation according to ISO 16140: 2003 of a commercial real-time PCR-based method for detecting *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in foods. *International journal of food microbiology* 177: 78–80.
- Venkateshwarlu G, Let MB, Meyer AS & Jacobsen C (2004) Chemical and olfactometric characterization of volatile flavor compounds in a fish oil enriched milk emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 311–317.
- Verma S, Ray AK & De BK (2010) Bioconversion of heptanal to heptanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27: 269–275.
- Villberg K & Veijanen A (2001) Analysis of a GC/MS thermal desorption system with simultaneous sniffing for determination of off-odor compounds and VOCs in fumes formed during extrusion coating of low-density polyethylene. *Analytical chemistry* 73: 971–977.
- Voet D & Voet J (2005) *Biochimie*. 2nd Edition, Traduction de la 3ème édition américaine. De Boeck Université, Bruxelles (Belgique).
- Wahl R, Rice P, Rice CM & Kröger M (1994) ECD—a totally integrated database of *Escherichia coli* K12. *Nucleic acids research* 22: 3450–3455.
- Weinman S & Méhul P (2004) *Toute de la biochimie*. Dunod. Paris.
- Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology* 63: 3741.
- Wisdorff A & Chaal N (2013) Pêche: les députés approuvent l'interdiction du rejet en mer de poissons. <http://goo.gl/tYVv3q> (Accessed August 8, 2013).
- Yang H, Qu L, Wimbrow AN, Jiang X & Sun Y (2007) Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. *International journal of food microbiology* 118: 132–138.
- Yano Y, Nakayama A & Yoshida K (1995) Population sizes and growth pressure responses of intestinal microfloras of deep-sea fish retrieved from the abyssal zone. *Applied and environmental microbiology* 61: 4480–4483.
- Yaylayan VA & Keyhani A (1999) Origin of 2,3-Pentanedione and 2,3-Butanedione in d-Glucose/l-Alanine Maillard Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3280–3284.
- Yoshida K, Ishikawa E, Joshi M, Lechat H, Ayouni F & Bonnefille M (2012) Profiling scotch malt whisky spirits from different distilleries using an electronic nose and an expert sensory panel. *Perception and Machine Intelligence*, pp. 155–162. Springer.
- Yoshimizu M & Kimura T (1976) Study on the intestinal microflora of salmonids. *Fish pathology* 10: 243–259.
- Young OA, Berdagué JL, Viallon C, Rousset-Akrim S & Theriez M (1997) Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. *Meat Science* 45: 183–200.
- Zago M, Bonvini B, Carminati D & Giraffa G (2009) Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Systematic and applied microbiology* 32: 514–521.
- Zhang S-D et al. (2014) Genome Sequence of Luminous Piezophile Photobacterium phosphoreum ANT-2200. *Genome Announc.* 2: e00096–14.
- Zhang Z & Pawliszyn J (1993) Analysis of organic compounds in environmental samples by headspace solid phase microextraction. *J. High Resol. Chromatogr.* 16: 689–692.
- Zheng L, Gibbs MJ & Rodoni BC (2008) Quantitative PCR measurements of the effects of introducing inosines into primers provides guidelines for improved degenerate primer design. *J Virol Methods* 153: 97–103.
- Zhou S, Hou Z, Li N & Qin Q (2007) Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *Journal of applied microbiology* 103: 1897–1906.
- Ziemke F, Höfle MG, Lalucat J & Rossellö-Mora R (1998) Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* 48: 179–186.





---

## **Annexes**

---

## Annexe 1 : Algorithme d'extraction et classement des données issues des chromatogrammes

```
# Assignation du dossier de travail
setwd('X:/Software/Logiciel R/récup air nom et temps')
# Récupération des noms de tous les fichiers *.txt du dossier
nom<-list.files(pattern = "\\*.txt$")
# Calcul du nombre de fichiers textes
Length<-length(nom)
# Traitement du premier fichier
# Récupération du nom du fichier
fichier<-as.character(nom[1])
# Récupération des données
donnee<-read.delim2(fichier,dec='.',h=T,skip=8)
# Stockage des noms, aires et temps de rétention des composés
Name<-as.vector(donnee$Name)
Area<-as.vector(donnee$Area)
Time<-as.vector(donnee$Ret.Time)
# Récupération du nombre de composés
lnames<-length(Name)
# Initialisation de trois matrices de stockage
# Une pour les noms, une pour les aires et
# Une pour les temps de rétention
matrix_name<-matrix(0,Length,150)
matrix_area<-matrix(0,Length,150)
matrix_time<-matrix(0,Length,150)
# Boucle for de remplissage des matrices avec le premier
# fichier
for(j in 1:lnames)
{
  matrix_name[1,j]<-Name[j]
  matrix_area[1,j]<-Area[j]
  matrix_time[1,j]<-Time[j]
}
# Double boucle for de remplissage des matrices avec les fichiers
# restant. Première partie de récupération et seconde boucle pour
# le stockage
for (i in 2:Length)
{
  fichier<-as.character(nom[i])
  donnee<-read.delim2(fichier,dec='.',h=T,skip=8)
  Name<-as.vector(donnee$Name)
  Area<-as.vector(donnee$Area)
  Time<-as.vector(donnee$Ret.Time)
  lnames<-length(Name)
  for(z in 1:lnames)
  {
    matrix_name[i,z]<-Name[z]
    matrix_area[i,z]<-Area[z]
    matrix_time[i,z]<-Time[z]
  }
}
# Petit code permettant de normaliser les données relatives aux aires
matrix_area_norm<-matrix_area
# Initialisation d'une matrice totale de stockage des données
nbc<-Length*3
mattot<-matrix(0,nbc,150)
# Initialisation de compteurs
f<-1
```

---

```
i<-1
# Boucle while permettant de classer sur trois lignes successives les don-
# nées issues d'un même fichier.
while (f <= nbcoll)
{
mattot[f,]<-matrix_name[i,]
mattot[f+1,]<-matrix_area_norm[i,]
  mattot[f+2,]<-matrix_time[i,]
f<-f+3
i<-i+1
}
# Création d'une matrice répétant 3 fois le nom de fichier
matnom<-matrix(0,nbcoll,1)
g<-1
f<-1
while (f <= nbcoll)
{
matnom[f,]<-nom[g]
matnom[f+1,]<-nom[g]
matnom[f+2,]<-nom[g]
f<-f+3
g<-g+1
}
# Remplacement de tous les 0 du tableau par la valeur "ASUPPRIMER"
mattot[which(mattot == 0)] <- "ASUPPRIMER"
# Transformation de la matrice totale en tableau
tableau<-cbind(matnom,mattot)
tableau<-as.data.frame(tableau)
# Export du tableau sous forme d'un fichier *.csv exploitable par Excel
export<-write.table(tableau,file=="synthèse_tot.csv",dec=".",sep=";",row.
Names = FALSE, col.names = FALSE, na = "NA")
```

---

## **Annexe 2 : Algorithme permettant la réalisation d'une analyse de variance d'une variable de la vérification des conditions de normalité à la réalisation d'un test *post-hoc*.**

```
# Chemin du répertoire de travail
setwd('X:/Software/Logiciel R/ANOVA')
# Récupération du fichier contenant les données
data<-read.csv2('data.csv',header=T)
attach(data)
# Création d'un modèle linéaire des données
modele<-lm(variable~modalité)
# Récupération des résidus du modèle
residus<-residuals(modele)
# Réalisation du test de Shapiro-Wilks
shap<-shapiro.test(residus)
# Réalisation du test de Bartlett
bart<-bartlett.test(residus~modalité)
# Réalisation de l'ANOVA
anova<-anova(modele)
# Réalisation du test LSD
## Chargement du package agricolae
library(agricolae)
## Réalisation du test LSD.
lsd<-LSD.test(modele,trt='modalité',alpha=0.05,p.adj("bonferroni"))
```

### Annexe 3 : Exemple d'une fiche Genbank sur la séquence partielle du gène *gyrB* d'une souche de *S. baltica*

#### Shewanella baltica partial *gyrB* gene for DNA gyrase B subunit 14LSABSM1SHW

GenBank: LK392308.1

[FASTA](#) [Graphics](#)Go to: 

LOCUS LK392308 1023 bp DNA linear BCT 10-SEP-2014  
DEFINITION Shewanella baltica partial *gyrB* gene for DNA gyrase B subunit,  
isolate 14LSABSM1SHW.  
ACCESSION LK392308  
VERSION LK392308.1 GI:661901674  
KEYWORDS .  
SOURCE Shewanella baltica  
ORGANISM [Shewanella baltica](#)  
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales;  
Shewanellaceae; Shewanella.  
REFERENCE 1  
AUTHORS Dehaut,A., Midelet-Bourdin,G., Brisabois,A. and Duflos,G.  
TITLE Phenotypic and genotypic characterization of H2S-positive and  
H2S-negative strains of Shewanella baltica isolated from spoiled  
whiting (Merlangius merlangus)  
JOURNAL Lett. Appl. Microbiol. 0 (2014) In press  
REMARK DOI: [10.1111/lam.12312](#)  
REFERENCE 2 (bases 1 to 1023)  
AUTHORS Dehaut,A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (22-MAY-2014) Laboratoire de Securite des Aliments,  
ANSES, Boulevard du Bassin Napoleon, 62200, FRANCE  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..1023  
/organism="Shewanella baltica"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/isolate="14LSABSM1SHW"  
/isolation\_source="Spoiled whiting (Merlangius merlangus)  
from North East Atlantic"  
/db\_xref="taxon:62322"  
/collection\_date="Jan-2014"  
gene <1..>1023  
/gene="gyrB"  
CDS <1..>1023  
/gene="gyrB"  
/codon\_start=3  
/transl\_table=11  
/product="DNA gyrase B subunit"  
/protein\_id="CDS14757.1"  
/db\_xref="GI:661901675"  
/translation="ALSKKLQMTIRRAGKVYEQFYTHGVPDAPIKEIGDATKTGTEIR  
FWPSEDTFSDVEFHFEILAKRVRELSFLNSGVGIRLVDERDNKNEFFKYEGGISAQVFD  
YLNRNKTPVNDVVFHFMQEREDGITVEVAMQWNDGYQENIFCFTNNIPQRDGGTHLVG  
FRSALTRNLSYMEENEGYNKKGKTSATGDDAREGLTAVISVKVPDPKFFSSQTKDKLVS  
SEVKTAVEQTMGEKLNLDYLLNPADAKLIVGKIVDAARAREAAARKAREMTRRKALDL  
GGLPGKLADCQEKDPLSEIYIVEGDSAGGSAKQGRNRKNQAILPLKGIKLNVEKARF  
DKMLSS"  
ORIGIN  
1 acgctttatc taaaaagctg caaatgacca ttcgtcgtgc tggcaaagtg tacgagcagt  
61 tttatactca cgggtgtgctt gatgcgcca tcaaagagat tgggtgacgog actaaaaaccg  
121 gtaccgaaat ccggtttttgg ccaagtgaag atacccttttag cgatggttgag tttoactttg  
181 aaatttttggc aaagcgcgctg cgcgaactgt cattccttaa ctcaggcgta ggtattcgtc  
241 tgggtgatga acgtgacaac aagaatgaat tctttaaata cgaaggcggg attagcgcgcat  
301 tcgtagatta tttgaaccgt aataaaaccc cgtcaacaa agacgtattc cactttatgc  
361 aagagcgtga agatggcatt accggttaag tggctatgca gtggaatgac ggttatcaag  
421 aaaaatattt ctggttttacc aacaacattc cacagcgtga tgggtggtact cacttagtgc  
481 gtttcogtag tgcgttgaca cgtaacctca acagctacat ggaaaaacgaa ggctataaca  
541 agaaaggcaa aactagcgcg actggcgcagc atgcccgtga aggtttgact gccgttatct  
601 ctggttaaagt gcctgacatc aagttcagct cgcaaaccaa agacaaactg gtttctagtg  
661 aagtgaaaac cgcggttgaa caaacctatg gtgagaagct gaacgattat ctgctggaaa  
721 acccagcga tgctaagtgt attgttgta agattgtcga tgcggcccggt gcacgtgaag  
781 cggcgcgtaa agcccgtgaa atgaccgctc gtaaaaggcgc actogattta ggtggtttgc  
841 caggtaaagt ggccgattgc caagaaaaag atcctggtct ttcagaaatt tacatagtgg  
901 aaggtgactc tgctggcggg agcgctaagc agggacgtaa ccgtaagaac caagcgattc  
961 tgccactgaa aggtaaaatt ctaaactgtg agaaaagccg cttcgataag atgtgtgctt  
1021 ctc  
//

---

**Annexe 4 : Algorithme de recherche de séquences ADN au sein de banques**

```
# Manipulation pour éviter le problème de proxy
setInternet2()
# Chemin du répertoire de travail
setwd('X:/Software/Logiciel R/RecupseQ 1.0/Fichiers générés')
# Mots clefs de la recherche, genres bactériens ciblés, banques à consul
# ter
keyword<-c("bisz", "torA", "1.6.6.9")
genus<-c("vibrio", "photobacterium", "shewanella", "escherichia")
bank<-c("genbank", "embl", "emblwgs", "bacterial", "ensbacteria")
type_sequence<-c("cds")
# Chargement du package de travail
library(seqinr)
# Calculs de tailles de vecteurs pour les boucles
s_bank<-length(bank)
s_keyword<-length(keyword)
s_genus<-length(genus)
s_type_sequence<-length(type_sequence)
# Boucle for pour screener l'ensemble des banques retenues
for (compt_bank in 1 : s_bank)
{
  # Assignation de la banque de travail
  choosebank(bank[compt_bank])
  # Boucle for pour screener l'ensemble des genres bactériens retenus
  for (compt_genus in 1:s_genus)
  {
    # Boucle for pour screener l'ensemble des mots clefs retenus
    for (compt_keyword in 1:s_keyword)
    {
      # Ecriture de la requête
      kry<-paste("sp=",genus[compt_genus], " AND ", "k=",keyword[compt_keyword]
, "AND ", "t=",type_sequence, sep = "")
      # Création d'un identifiant de recherche
      output<-paste(bank[compt_bank], '_',genus[compt_genus], sep = "")
      # Création de la requête (identifiant de recherche + requête)
      query<-query(output, kry)
      # Récupération des noms d'accessions et séquences d'ADN
      names<-getName(query)
      sequences<-getSequence(query)
      nb_access<-query$nelem
      # Génération du nom de fichier de sortie reprennant l'identifiant de
      # recherche et le mot clef associé
      fileout<-paste(output, "_",keyword[compt_keyword], ".fasta", sep="")
      # Ecriture du fichier en fonction du nombre d'accessions
      for (compt_access in 1:nb_access)
      {
        # Fichier de la séquence récupérée
        write.fasta(sequences[compt_access],names[compt_access],nbchar=80,
file.out=fileout, open = "a")
        # Fichier avec toutes les séquences du batch
        write.fasta(sequences[compt_access],names[compt_access],nbchar=80,
file.out="whole.fasta", open = "a")
      }
    }
  }
}
```

---

## Annexe 5 : Algorithme permettant le screening haut-débit de listes de potentiels oligonucléotides dans le cadre de la mise en place d'une méthode PCR

```

#Définition du répertoire de travail#
setwd('X:/Software/Logiciel R/Screening oligonulceotides NRPS primer')
#Chargement du(des) package(s)#
library(seqinr)
#Récupération des fichiers *.fasta à traiter pour le batch#
name<-list.files(pattern = "\\*.fasta$")
#Récupération du nombre de fichiers à traiter
l_name<-length(name)
#Boucle 'for' pour appliquer l'algorithme à chaque fichier
for (compteur_name in 1 : l_name)
{
#Récupération du nom du fichier (nom standardisé)#
fichier<-name[compteur_name]
#Fichier scindé pour isoler le nombre de nucléotides (nb_pb) et le nom du fichier
(name_file)#
name_split<-unlist(strsplit(fichier,"-"))
#Récupération de nb_pb et name_file#
name_file<-unlist(strsplit(name_split[2],"\\."))[1]
nb_pb<-as.numeric(name_split[1])
#Récupération du nom d'espèce#
spc_split<-unlist(strsplit(name_file,"_"))
spc<-spc_split[2]
#Forward ou reverse?#
sens<-spc_split[3]
#Récupération l'ensemble des séquences du fichier sous forme de vecteur#
sequ<-read.fasta(fichier)
#Récupération l'ensemble des séquences du fichier sous forme de chaîne de caractère#
seq_string<-read.fasta(fichier, as.string=TRUE)
#Récupération du nombre de séquence
l_sequ<-length(sequ)
#Initialisation de plusieurs matrices composées de 1 colonne et d'un nombre de
ligne égale au nombre de séquences#
tag<-matrix(,l_sequ,1)
sequence<-matrix(,l_sequ,1)
place<-matrix(,l_sequ,1)
hyc<-matrix(,l_sequ,1)
gc_content<-matrix(,l_sequ,1)
gc_end<-matrix(,l_sequ,1)
nb_deg<-matrix(,l_sequ,1)
nb_gc<-matrix(,l_sequ,1)
nb_at<-matrix(,l_sequ,1)
head_tail_inter<-matrix(,l_sequ,1)
gc_content_tail<-matrix(,l_sequ,1)
gc_deg_tail<-matrix(,l_sequ,1)
repet_seek<-matrix(,l_sequ,1)
#Boucle 'for' pour le traitement de chaque primer du fichier#
for (compteur in 1 : l_sequ)
{
#Inclusion d'un tag
tag[compteur,]<-paste("Primer_", spc, "_", "_", sens, "_", compteur, sep="")
#[1]Récupération de la séquence traitée sous forme de chaîne de caractère#
sequence[compteur,]<-seq_string[[compteur]][1]
#Récupération de la séquence traitée sous forme de vecteur#
seq<-sequ[[compteur]][1:nb_pb]
#[2] Récupération de la localisation du primer sur l'alignement#
info_place<-attr(sequ[[compteur]], "Annot")
place[compteur,]<-unlist(strsplit(info_place,":"))[2]
#[3] Récupération du coefficient d'hybridation#
info_hyc<-attr(sequ[[compteur]], "name")
hyc[compteur,]<-unlist(strsplit(unlist(strsplit(info_hyc, "/"))[1], "="))[2]
#[4] Détermination du nombre de G/C (hors dégénérescence)#
GC<-seq[seq=="g" | seq=="c"]

```

```
gc<-length(GC)
nb_gc[compteur,]<-gc
#[5] Détermination du nombre de A/T (hors dégénérescence)#
AT<-seq[seq=="a"|seq=="t"]
at<-length(AT)
nb_at[compteur,]<-at
#[6] Détermination du nombre de dégénérescence(s)#
deg<-nb_pb-(at+gc)
nb_deg[compteur,]<-deg
#[7] Détermination du pourcentage de G/C estimé (dégénérescence(s) non prise en
compte)#
pourc_gc<-round(100*(gc/(gc+at)),1)
gc_content[compteur,]<-pourc_gc
#[8] Boucle 'if' déterminant si la séquence est terminée par un 'G' ou un 'C'#
if (tail(seq,1)=="g"|tail(seq,1)=="c")
{
    gc_end[compteur,]<-c("Yes")
}
else
{
gc_end[compteur,]<-c("No")
}
#[9] Boucle 'if' déterminant si il existe un risque d'appariement 5'/3' G/C ou C/G#
if((tail(seq,1)=="g"&&head(seq,1)=="c")|(tail(seq,1)=="c"&&head(seq,1)=="g"))
{
head_tail_inter[compteur,]<-c("Yes")
}
else
{
head_tail_inter[compteur,]<-c("No")
}
#Récupération du nombre de G/C parmi les 5 derniers nucléotides en 3'#
nb_gc_content_tail<-length(tail(seq,5)[tail(seq,5)=="g"|tail(seq,5)=="c"])
#[10] Boucle 'if' déterminant s'il n'y a pas plus de 3 G ou C parmi les 5 derniers
nucléotides en 3'#
if (nb_gc_content_tail<4)
{
gc_content_tail[compteur,]<-c("No")
}
else
{
gc_content_tail[compteur,]<-c("Yes")
}
#Récupération du nombre de nucléotides différent de A,T,C,G et W parmi les 5 der-
niers nucléotides en 3'#
control_deg_GC<-tail(seq,5)[tail(seq,5)!="a"&tail(seq,5)!="t"&tail(seq,5)
!="c"&tail(seq,5)!="g"&tail(seq,5)!="w"]
#[11] Boucle 'if' déterminant s'il n'y a pas de G ou C "cachés" (dégénérescences)
parmi les 5 derniers nucléotides en 3'#
if (length(control_deg_GC)!=0)
{
gc_deg_tail[compteur,]<-c("Yes")
}
else
{
gc_deg_tail[compteur,]<-c("No")
}
#Initialisation d'une matrice de contrôle des répétitions de nucléotides
mat_repet<-matrix(,1,nb_pb)
mat_repet[,1]<-0
mat_repet[,nb_pb]<-0
#Boucle 'for' pour screener les répétitions de nucléotides (comparaisons de n-1 et
n+1 par rapport à n)#
for (i in 2 : (nb_pb-1))
{
#Comparaison de n au n-1 et n+1#
n_moins<-seq[i]==seq[i-1]
n_plus<-seq[i]==seq[i+1]
```



```

#[12] Boucle 'if' signalisant la présence d'une répétition de 3 nucléotides iden-
tiques par la valeur '1'#
if (n_moins=="TRUE"&n_plus=="TRUE")
{
mat_repet[,i]<-1
}
else
{
mat_repet[,i]<-0
}
#Création d'un index de répétition (si différent de 0 il y a au moins trois nucléo-
tides répétés dans la séquence#
index_repet<-as.numeric(rowSums(mat_repet))
#Boucle 'if' permettant le contrôle de la présence de répétition dans le primer#
if (index_repet==0)
{
repet_seek[compteur,]<-c("No")
}
else
{
repet_seek[compteur,]<-c("Yes")
}
}
#Création d'une matrice regroupant tous les paramètres suivant
[1][2][6][3][4][5][7][8][9][10][11][12]#
array_tot<-cbind(tag,sequence,place,nb_deg,hyc,nb_gc,nb_at,gc_content,
gc_end,head_tail_inter,gc_content_tail,gc_deg_tail,repet_seek)
#Récupération du nombre de colonne de la matrice précédente#
l_array<-ncol(array_tot)
#Mise en place de restriction sur divers paramètres [7][8][5][10][11][12]#
array_tot<-subset(array_tot,gc_end=='Yes'&head_tail_inter=='No'&gc_content
>40&gc_content<60&gc_content_tail=='No'&gc_deg_tail=='No'&repet_seek=='No')
#Création d'une matrice pour export amplifx
array_amplifx<-cbind(array_tot[,2],array_tot[,1])
#Récupération du nombre de ligne de array#
n_row<-nrow(array_tot)
#Calcul du pourcentage de séquences écartées#
percent<-round((1-(n_row/l_sequ))*100,1)
#Construction d'une phrase de conclusion sur le traitement du fichier#
ecart<-matrix(,1,l_array)
ecart[,1]<-paste(percent,"% des primers ont été écartés grâce à l'algorithme")
ecart<-rbind(ecart,matrix(,1,l_array))
#Création du titres pour les colonnes#
head<-c('ID','Sequence','Situation in the alignment','Number of degeneration','Hyc
Number','Number of G/C','Number of A/T','Estimated % GC','End by G or C','Head and
Tail Annealing Risk ?','No more than 3 GC in the tail?','No hidden GC (degenera-
tion)in the tail?','No more than 2 identical nucleotides near by?')
#Regroupement de la matrice et des titres#
array_tot<-rbind(ecart,head,array_tot)
#Génération d'un fichier *.csv contenant les informations sélectionnées précédem-
ment#
array_tot<-as.data.frame(array_tot)
export<-write.table(array_tot,file=paste(name_file,".csv",sep=""),dec=".",
sep=";",row.names = FALSE,col.names = FALSE,na = "")
#Génération d'un fichier pour traitement par amplifx#
export<-write.table(array_amplifx,file=paste(name_file,"_amplifx.txt",
sep=""),sep="\t",row.names = FALSE,col.names = FALSE)
}

```

# Annexe 6 : Poster présenté au congrès FoodMicro 2014

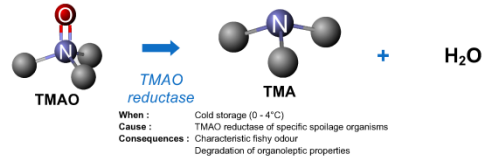
## Use of degenerate primers to detect and quantify *torA* gene harbored by specific spoilage organisms of fish

DEHAUT Alexandre<sup>1</sup>, CHOLLET Mariène<sup>2</sup>, JACQUES Philippe<sup>2</sup>, KRZEWSKI Frédéric<sup>3</sup>, N'GUESSAN Assi<sup>4</sup>, KOL Ossarath<sup>2</sup>, GRARD Thierry<sup>5</sup>, BRISABOIS Anne<sup>1</sup> & DUFLOS Guillaume<sup>1</sup>



### Introduction

- Fish is a highly perishable food matrix. To date, most of the developed techniques are more rejection tool than monitoring methods. Moreover, these techniques become reliable once the early freshness step exceeded.
- The major cause of the freshness decay is due to the development of spoilage flora called specific spoilage organisms (SSO). During fish spoilage SSO reduce trimethylamine N-oxide (TMAO), present in the fish flesh, thanks to an enzyme called TMAO reductase encoded by *torA* gene. This reaction lead to the production of trimethylamine (TMA), part of the total volatile basic nitrogen (TVB-N), responsible of the specific, fishy off-odor.
- The aim of this work was to develop and apply a molecular technique (qPCR) targeting *torA* gene harbored by SSO and use this technique for the monitoring of fish spoilage.



### Materials & Methods

#### Primers design and in silico characterization

- Database screening (EMBL, Genbank) using SegnerR package.
- Control of the collected data.
- Use of an alignment algorithm (Muscle).
- Recovery of aligned sequences.
- Use of a degenerate primers retrieval software based on Hyc value developed at ProBioGEM laboratory (retrieving of primers lists).
- Careful screening of the previously obtained primers in conformity with habitual design specifications.
- Verifying the proper recognition of sequences of bacterial genes by the primers selected.
- Checking for the absence of nonspecific reactions.

#### DNA extractions

- DNA extraction achieved thanks to Qiagen Blood & Tissue kit for both pure culture and fish spoiling flesh.
- Quantity and quality controlled with Denovix DS-11.

#### In vitro characterization of the primers

- Selection of promising primer pairs.
- Efficiency tests & optimization of amplifications conditions.
- Specificity tests.

#### Methods used for the monitoring of fish shelf-life

- Study of modified-atmosphere packed whitening filets (*Merlangius merlangus*), stored at +1.0°C and prepared as follow:

- .3 fish analyzed each day (D1, D3, D6, D8, D10, D13, D15) for:

- Method development: qPCR
- Freshness indicators: TVB-N & TMA
- Microbial burden: Total viable count

### Results

- More than 750 forward and reverse primers were suggested by ProBioGEM software for each genera *Vibrio*, *Photobacterium* & *Shewanella*, with Hyc values comprised between 1 and 32.
- Screening algorithm allowed to discard more than 88% of above mentioned primers. AmpliX permitted to find 13600 potential amplicons from the 3 genera. 6 pairs were retained to further *in vitro* characterization.
- A pair VF239 x VR353 gave positive results with a single band at 420 bp.

**Table 1: Efficiency test for VF239/VR353 according to qPCR parameters**

Strains	Primers TMAO				Primers TVB-N			
	62°C	64°C	67°C	68°C	62°C	64°C	67°C	68°C
<i>Photobacterium</i>	37.3	38.4	36.1	41.4	37.8	38.8	36.6	40.0
<i>Shewanella</i>	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9
<i>Vibrio</i>	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9	35.9

- Primers pair VF239 x VR353 amplified the expected PCR product for two species of both *Photobacterium* and *Vibrio* genera.
- Impact of both annealing temperature and primers concentration on pair efficiency for all tested strains.
- Best amplification efficiency, higher than 90%, recorded at 62°C with primers concentration of 1 µM for the four studied species.

**Table 2: Results of the specificity study**

Strains	Mean C <sub>q</sub>	Band at the expected size	Sequencing results
<i>V. anguillarum</i> ATCC 35061	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> ATCC 35061
<i>V. anguillarum</i> DSM 5962	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> DSM 5962
<i>V. anguillarum</i> CP 10118	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10118
<i>V. anguillarum</i> CP 10119	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10119
<i>V. anguillarum</i> CP 10120	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10120
<i>V. anguillarum</i> CP 10121	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10121
<i>V. anguillarum</i> CP 10122	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10122
<i>V. anguillarum</i> CP 10123	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10123
<i>V. anguillarum</i> CP 10124	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10124
<i>V. anguillarum</i> CP 10125	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10125
<i>V. anguillarum</i> CP 10126	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10126
<i>V. anguillarum</i> CP 10127	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10127
<i>V. anguillarum</i> CP 10128	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10128
<i>V. anguillarum</i> CP 10129	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10129
<i>V. anguillarum</i> CP 10130	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10130
<i>V. anguillarum</i> CP 10131	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10131
<i>V. anguillarum</i> CP 10132	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10132
<i>V. anguillarum</i> CP 10133	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10133
<i>V. anguillarum</i> CP 10134	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10134
<i>V. anguillarum</i> CP 10135	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10135
<i>V. anguillarum</i> CP 10136	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10136
<i>V. anguillarum</i> CP 10137	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10137
<i>V. anguillarum</i> CP 10138	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10138
<i>V. anguillarum</i> CP 10139	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10139
<i>V. anguillarum</i> CP 10140	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10140
<i>V. anguillarum</i> CP 10141	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10141
<i>V. anguillarum</i> CP 10142	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10142
<i>V. anguillarum</i> CP 10143	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10143
<i>V. anguillarum</i> CP 10144	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10144
<i>V. anguillarum</i> CP 10145	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10145
<i>V. anguillarum</i> CP 10146	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10146
<i>V. anguillarum</i> CP 10147	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10147
<i>V. anguillarum</i> CP 10148	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10148
<i>V. anguillarum</i> CP 10149	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10149
<i>V. anguillarum</i> CP 10150	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10150
<i>V. anguillarum</i> CP 10151	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10151
<i>V. anguillarum</i> CP 10152	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10152
<i>V. anguillarum</i> CP 10153	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10153
<i>V. anguillarum</i> CP 10154	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10154
<i>V. anguillarum</i> CP 10155	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10155
<i>V. anguillarum</i> CP 10156	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10156
<i>V. anguillarum</i> CP 10157	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10157
<i>V. anguillarum</i> CP 10158	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10158
<i>V. anguillarum</i> CP 10159	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10159
<i>V. anguillarum</i> CP 10160	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10160
<i>V. anguillarum</i> CP 10161	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10161
<i>V. anguillarum</i> CP 10162	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10162
<i>V. anguillarum</i> CP 10163	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10163
<i>V. anguillarum</i> CP 10164	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10164
<i>V. anguillarum</i> CP 10165	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10165
<i>V. anguillarum</i> CP 10166	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10166
<i>V. anguillarum</i> CP 10167	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10167
<i>V. anguillarum</i> CP 10168	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10168
<i>V. anguillarum</i> CP 10169	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10169
<i>V. anguillarum</i> CP 10170	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10170
<i>V. anguillarum</i> CP 10171	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10171
<i>V. anguillarum</i> CP 10172	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10172
<i>V. anguillarum</i> CP 10173	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10173
<i>V. anguillarum</i> CP 10174	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10174
<i>V. anguillarum</i> CP 10175	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10175
<i>V. anguillarum</i> CP 10176	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10176
<i>V. anguillarum</i> CP 10177	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10177
<i>V. anguillarum</i> CP 10178	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10178
<i>V. anguillarum</i> CP 10179	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10179
<i>V. anguillarum</i> CP 10180	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10180
<i>V. anguillarum</i> CP 10181	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10181
<i>V. anguillarum</i> CP 10182	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10182
<i>V. anguillarum</i> CP 10183	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10183
<i>V. anguillarum</i> CP 10184	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10184
<i>V. anguillarum</i> CP 10185	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10185
<i>V. anguillarum</i> CP 10186	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10186
<i>V. anguillarum</i> CP 10187	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10187
<i>V. anguillarum</i> CP 10188	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10188
<i>V. anguillarum</i> CP 10189	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10189
<i>V. anguillarum</i> CP 10190	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10190
<i>V. anguillarum</i> CP 10191	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10191
<i>V. anguillarum</i> CP 10192	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10192
<i>V. anguillarum</i> CP 10193	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10193
<i>V. anguillarum</i> CP 10194	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10194
<i>V. anguillarum</i> CP 10195	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10195
<i>V. anguillarum</i> CP 10196	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10196
<i>V. anguillarum</i> CP 10197	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10197
<i>V. anguillarum</i> CP 10198	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10198
<i>V. anguillarum</i> CP 10199	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10199
<i>V. anguillarum</i> CP 10200	39.99 ± 0.02	Yes	No 100% identity with <i>V. anguillarum</i> CP 10200

- Reference method assessing microbial burden
- Total Viable Count led to non-workable results: firstly increase from day 1 to day 6, then decrease until day 15.

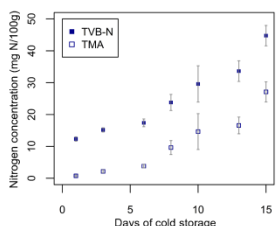


Figure 1: Average TVB-N & TMA values (n=8) per fish throughout the shelf-life.

- Reference method assessing freshness grade throughout shelf-life (Fig. 1)
- Slight increase of both TMA & TVB-N values until day 6, then increase marked by more variability among fish tested.
- Based on TVB-N values, filets considered as spoiled at the neighbourhood of day 10.

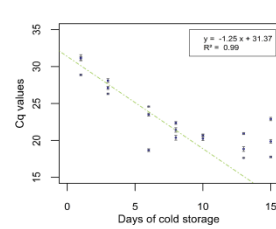


Figure 2: Mean Cq values (n=4) calculated per fish throughout the study. Green dashed line corresponds to the linear regression from day 1 to day 8.

- Shelf-life assessment by qPCR (Fig. 2)
- Clear decrease of Cq value, linear (R<sup>2</sup> = 0.99) for the 8 first days and stabilization beyond.
- Results anti-correlated with TVB-N (-0.86) and TMA (-0.81) from day 1 to day 13.
- Sequencing of PCR products range from 76% (at day 3) to 90% identity (after day 6) with *P. phosphoreum torA* gene.
- Prolonged outgrowth of *P. phosphoreum* throughout spoilage.

### Conclusions

- First results described herein are encouraging to develop a new monitoring approach, suitable for the early states of fish freshness.
- Rapid and sensitive method for the freshness estimation of more than 30 fish within a day, easily applicable in food analysis laboratories.
- Highly probable confirmation of *P. phosphoreum* outgrowth, previously described as SSO of modified-atmosphere packed chilled marine fish.
- Bioinformatics approach using different software allowed to secure primers design, from sequence retrieval to *in silico* primers characterization.
- VF239 x VR 353 primers pair displayed the best efficiency for *Vibrio* and *Photobacterium* species (at 62°C for primers concentrations of 1 µM).

### Perspectives

- Implementation of sensory analysis adapted to the matrix, should give better insights in the rejection limits of fish.
- Addition of controls: samples process control, sample negative control, environmental control, IAC has to be carry out.
- This method has to be tested on other shelf-life studies, other storage conditions and other fish species.

www.anses.fr  
alexandre.dehaut@anses.fr

<sup>1</sup> ANSES – LSAL – Département des Produits de la Pêche et de l'Aquaculture, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer (France)  
<sup>2</sup> Institut National de Recherche Charles Violette – Equipe ProBioGEM Université de Lille 1 - Avenue Paul Langevin 59655 Villeneuve d'Ascq (France)  
<sup>3</sup> Unité de Géobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université de Lille 1 – UGSF, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq (France)  
<sup>4</sup> Laboratoire Paul Painlevé - Université de Lille 1, U.F.R. de Mathématiques - Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq (France)  
<sup>5</sup> Equipe Biochimie des Produits Aquatiques, Université du Littoral Côte d'Opale - ANSES, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer (France)

## Annexe 7: Poster présenté aux Journées des Doctorants - Post-Doctorants de l'Anses 2013

# Quantification of TMA & DMA by SPME-GC-MS for the freshness assessment of fish

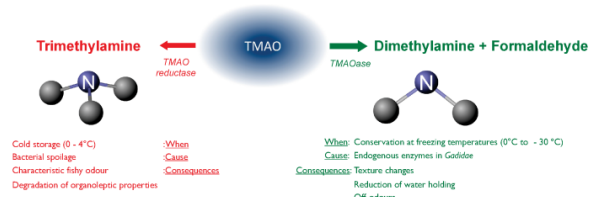
Alexandre DEHAUT, Simon DUTHEN & Guillaume DUFLOS

## Introduction :

Nowadays, the freshness of fish is assessed by numerous physical, sensory or chemical methods.

All of these techniques possess biases (subjectivity of the judges, working only on whole fishes, etc.).

The aim of this work is to follow the progress of the alteration of trimethylamine-N oxide (TMAO) with a new SPME-GC-MS approach. TMAO is a specific molecule of the flesh of marine fishes.

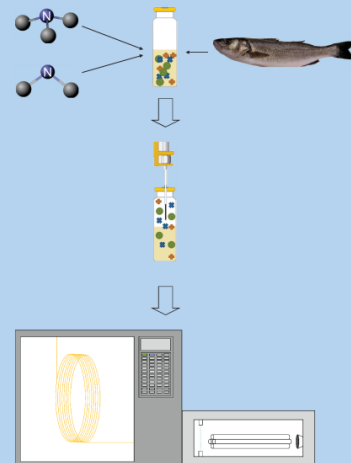


## Materials and methods:

**Simple sample preparation**  
 (Pure molecules or grinding of the flesh in a saturated saline solution and addition of KOH)

**Extraction and collection**  
 of the basic volatiles with a CAR/PDMS SPME fibre

**Separation and identification**  
 of the basic volatiles with a GC-MS device (Shimadzu Q2010-plus) equipped with a Stabilwax-DB column (Restek, France)



## Results:

### I) Optimisation of the sample preparation

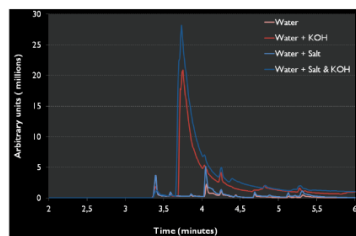


Figure 1 : Chromatograms obtained with different sample preparations (from 2 minutes to 6 minutes). The sample consists of the flesh of a whiting (*Merlangius merlangus*) kept several months at -20°C. Red curves correspond to the chromatograms of samples prepared with distilled water. Blue curves correspond to the samples prepared with saturated saline solution (30% NaCl w/w). Darker curves correspond to the samples, where a KOH pellet was added to improve the pH of solution.

- Improvement of the signal when KOH & NaCl are added in the solution.
- Higher areas obtained with an extraction of 30 minutes at 35°C.

### II) Optimisation of the separation conditions

Three major parameters were identified as key factors to improve the resolution of the peaks : Temperature of the injector (150°C & 210°C), mode of injection (splitless & split of 5) and initial temperature of the column (45°C & 60°C).

An experimental design was set up. Two levels (low and high) were applied for each parameters. Two variables were assessed: tailing factor (TF) and full width at half maximum (FWHM). They characterize the resolution of the peak.

Table 1: ANOVA tests were validated thanks to normality and homoscedasticity tests. Results of ANOVA tests were achieved on the two experimental designs (TMA & DMA) to assess the optimized parameters for getting peaks with the best resolution. For each variable (FWHM and TF) the probability of the significance of the three parameters (TI, TC & S) were given. Probabilities tagged with \* \*\* mean that results are significantly different between the two levels (low and high).

	Data with Trimethylamine		Data with Dimethylamine	
	FWHM	TF	FWHM	TF
T°C of injector (TI)	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***
T°C of the column (TC)	0.0053 **	0.74	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***
Split mode (S)	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***
TI x TC	0.0036 **	0.05 *	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***
TI x S	< 0.0001 ***	< 0.0001 ***	0.0007 ***	< 0.0001 ***
TC x S	0.07	0.94	0.0012 **	< 0.0001 ***
TI x TC x S	0.77	0.0023 **	0.0003 ***	< 0.0001 ***

- Injection at 210°C, split of 5 and an initial temperature of the column at 60°C displays peaks of TMA with the best significant markers of resolution.

### III) Specific detection of DMA and TMA in a spoiled sample.

After using total ion chromatogram (TIC) from 33 to 200 m/z a single ion monitoring (SIM) approach was performed.

It allows to follow the detection of specific ions markers of TMA (58 & 59 m/z) and DMA (44 & 45 m/z).

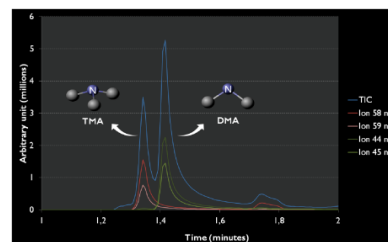


Figure 2 : Total and single ions chromatograms of a sample prepared from the flesh of a whiting (*Merlangius merlangus*) kept several months at -20°C with KOH and saturated saline solution. The blue curve corresponds to the total ions chromatogram. The red curves correspond to the specific ions of TMA : 58 m/z (darker) and 59 m/z (lighter). The green curves correspond to the specific ions of DMA : 44 m/z (darker) and 45 m/z (lighter).

- Efficient and specific detection of TMA & DMA with the SIM method.

## Conclusions and Perspectives:

- Specific detection of TMA and DMA is now effective with optimised parameters of extraction and separation.
- Screening of potential internal standards.
- Development of a method of quantification (determination of LOD & LOQ).
- Application of the method to a study of spoilage of fishes.

## References:

- Huys, H.H., Quality and quality changes in fresh fish, in *FAO Fisheries Technical Paper - 348*, Food and Agriculture Organization, Editor: 1995, FAO, p. 195.
- Gran, L and H.H. Huys, Microbiological spoilage of fish and fish products, *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 33(1): p. 121-137.
- Das Santos, J.-P., et al., Molecular analysis of the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species, *Journal of Molecular Biology*, 1998, 284(2): p. 421-433.
- Duflos, G., et al., Quantitative PCR Method for Evaluating Freshness of Whiting (*Merlangius merlangus*) and Plaice (*Pleuronectes platessa*), *Journal of Food Protection*, 2010, 73(7): p. 1344-1347.
- Nielsen, M.K. and B.M. Jørgensen, Quantitative relationship between trimethylamine oxide aldolase activity and formaldehyde accumulation in white muscle from gulf-turbot fish during frozen storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(12): p. 3814-3822.
- Duflos, G., et al., Freshness characterization of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(15): p. 2568-2575.
- Heising, J., K., et al., A non-destructive ammonium detection method as indicator for freshness for packed fish: Application on cod, *Journal of Food Engineering*, 2012, 110: p. 254-261.

anses.fr

anses  
 French agency for food, environmental  
 and occupational health & safety



Many thanks to my steering committee for their valuable advices :  
 Philippe Jacques, Anne Brisabois, Ossarath Kol, Assi N'Guessan, Frédéric Krzewinski & Thierry Gard

Laboratoire de Sécurité des Aliments  
 Site de Boulogne-sur-Mer  
 Boulevard du Bassin Napoléon  
 62200 Boulogne-sur-Mer, France