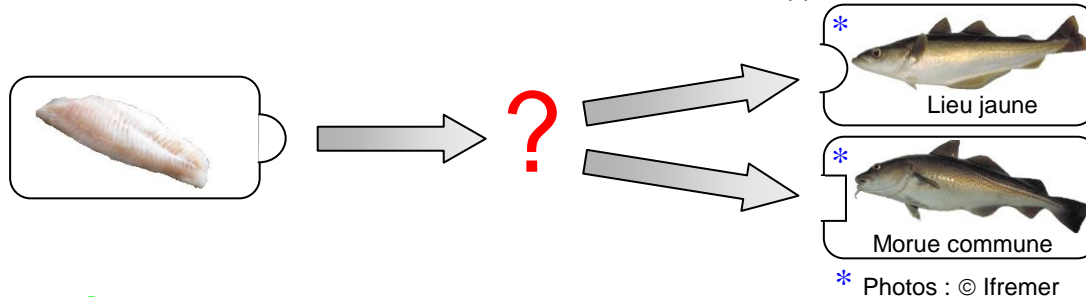


Principales méthodes d'authentification des produits de la mer

L'authentification (identification - authenticité) des produits est un élément essentiel pour vérifier la conformité des denrées alimentaires et la loyauté des pratiques commerciales. Cela est particulièrement vrai pour les produits de la mer composés d'un grand nombre d'espèces et commercialisés sous des formes variées. Dans un contexte de demande croissante en traçabilité des denrées alimentaires, de très nombreuses méthodes se sont développées.



Critères morphologiques

A partir d'observations minutieuses, une classification et une nomenclature précises de l'ensemble des poissons, mollusques et crustacés ont été élaborées par des spécialistes. Ce système basé sur des clés d'identification (caractères morphologiques propres à chaque espèce) est aujourd'hui à l'origine de toute diagnose d'espèce.

Cette technique offre de bons résultats mais est limitée aux animaux entiers et nécessite des experts. (quelques rares critères pour des filets mais identification beaucoup plus complexe).

[Pour en savoir plus, consulter la fiche « Exemple de clé d'identification des Gadidés »...](#)



Analyse de protéines

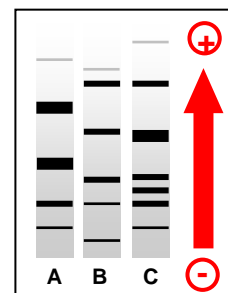
Les protéines ont été les premières molécules à être utilisées pour l'identification d'espèces de poissons. La spécificité de certaines d'entre elles permet de différencier les espèces. Les protéines sont extraites à partir de la chair (broyage dans l'eau [solubilisation] puis centrifugation).

L'**électrophorèse** est une des principales méthodes utilisées. Il s'agit d'une technique de séparation basée sur le déplacement, sous l'influence d'un champ électrique, des protéines (molécules chargées) par rapport à une phase stationnaire (liquide ou gel). L'électrophorèse permet ainsi de séparer les protéines en fonction de leur charge ou de leur taille.

• Isoélectrofocalisation (IEF)

Il existe plusieurs types d'électrophorèses parmi lesquelles l'**isoélectrofocalisation** (IEF). Sous l'influence d'un champ électrique, les protéines vont migrer **dans un gradient de pH** jusqu'à un point d'équilibre où le pH leur procure une charge globale nulle : le point isoélectrique.

Les spectres électrophorétiques obtenus sont comparés à des spectres de référence. La FDA (Food and Drug Administration) a une base de données contenant les profils obtenus par IEF pour environ 90 espèces de poissons. L'Ifremer a publié un catalogue électrophorétique en 1985.



Le **CEVPM** a également une base de données IEF, issue d'un transfert technologique avec l'Ifremer. Elle comprend **150** profils et permet la réalisation de 250 à 300 identifications d'espèce par an. Cette base est enrichie régulièrement avec de nouvelles espèces d'importation (si le poisson entier correspondant a pu être identifié par un expert).

La principale contrainte de ces méthodes est la **nécessité de travailler avec des protéines peu dénaturées**. Cette technique permet essentiellement d'identifier poissons, crustacés et mollusques à l'état frais ou congelé.

• Urée - IEF

Elle diffère d'une IEF par l'utilisation d'une **solution à base d'urée** pour extraire les protéines.

• SDS – PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Les protéines sont extraites avec une solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) puis une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide est pratiquée. Le SDS va charger négativement de manière homogène toutes les protéines qui seront alors séparées en fonction de leur taille.

L'**urée-IEF** et la **SDS-PAGE** sont des électrophorèses en conditions dénaturantes qui permettent notamment d'identifier des **poissons fumés ou salés**.

Principales protéines utilisées

Pour l'**IEF et l'urée-IEF**, ce sont en général les protéines **hydrosolubles*** contenues dans le muscle blanc qui sont extraites chez les poissons, telles que les **protéines sarcoplasmiques** : myoglobine, parvalbumines (qui résistent bien à la chaleur si le traitement n'est pas trop long), ...

Pour la technique de **SDS-PAGE**, ce sont plutôt les **protéines myofibrillaires** qui sont utilisées : myosine, actine, ...

Il existe d'autres méthodes d'identification moins couramment employées qui utilisent les protéines.

[Pour en savoir plus, consulter la fiche « autres méthodes d'authentification basées sur les protéines »](#)



Les conditions opératoires influent beaucoup sur le profil électrophorétique. Pour pouvoir comparer deux spectres électrophorétiques et les résultats obtenus à ceux des banques de données, il est indispensable qu'ils aient été obtenus dans les mêmes conditions. Il existe des **procédures standardisées**.



Ces méthodes d'authentification basées sur les protéines donnent de bons résultats mais ne sont **pas applicables aux produits fortement transformés comme les conserves**. En outre, les spectres peuvent être altérés par l'état de fraîcheur.



Analyse de l'ADN

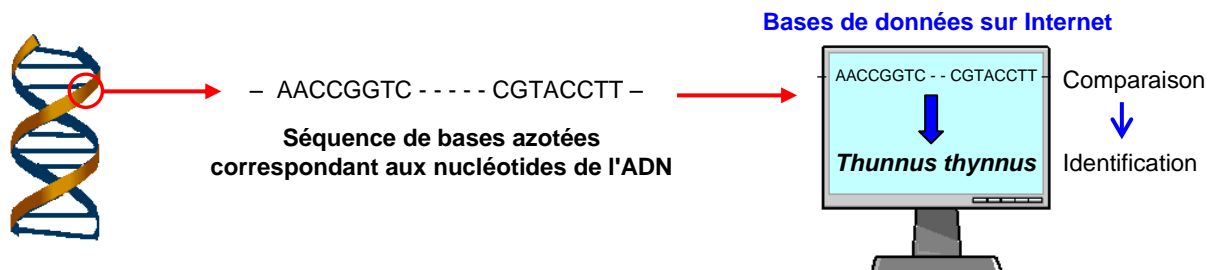
La majorité des méthodes d'analyse de l'ADN comprend une étape d'amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette étape permet de copier en grand nombre une séquence ciblée d'ADN.

[Pour en savoir plus, consulter la fiche « Extraction de l'ADN »...](#)

[Pour en savoir plus, consulter la fiche « Principe de l'amplification par PCR »...](#)

• Séquençage de l'ADN

Le principe du séquençage est de déterminer la séquence – c'est-à-dire l'ordre des **nucléotides*** – d'une partie d'ADN. La séquence du **gène du cytochrome b** contenu dans l'**ADN mitochondrial*** a, par exemple, largement été utilisée pour différencier des espèces.



Le projet européen **Fishtrace** a notamment permis de constituer une base de données contenant la séquence de deux gènes (celui du **cytochrome b** et une partie de celui de la **rhodopsine**) pour plus de 200 espèces de poissons des eaux européennes.

Cette base de données est en ligne à l'adresse suivante : <http://www.fishtrace.org/gb/main.htm>.

Il existe d'autre base de données en ligne, par exemple, <http://www.barcodinglife.org>. Sur cette base, est disponible la séquence de la **sous-unité 1 du gène de la cytochrome c oxydase (gène COI)** pour de très nombreuses espèces de l'ensemble du règne animal dans le monde entier. La base concernant les poissons s'appelle **Fish-BOL**.

La technique **PCR-FINS** (Forensically informative nucleotide sequencing) se base également sur le séquençage mais d'un plus petit fragment d'ADN. Elle est utilisée lorsque l'ADN risque d'être coupé par le procédé technologique comme, par exemple, pour les conserves de sardines.

Grâce à l'automatisation du séquençage et à la diminution de son coût, **cette technique est de plus en plus employée.**

- **Méthodes basées sur des différences de longueur de fragments d'ADN**

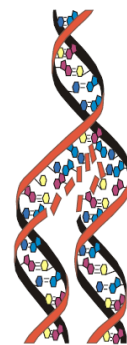
L'identification d'espèces peut se faire grâce à des différences dans la longueur de fragments d'ADN. Plusieurs techniques utilisent ce principe.

- ♦ **RFLP : polymorphisme de longueur de fragments de restriction**

Cette technique cible une séquence particulière d'ADN. Des **enzymes***, des endonucléases, coupent l'ADN amplifié, préalablement par PCR, en des points précis et génèrent ainsi des **fragments de restriction dont la longueur est spécifique de l'espèce**. Ces fragments ciblés sont généralement séparés par électrophorèse. Le profil obtenu est ensuite comparé à ceux d'une base de données.

- ♦ **AFLP : polymorphisme de longueur de fragments amplifiés**

Cette technique **implique deux PCR**, après digestion de l'ADN par deux **enzymes***. La première est dite "non sélective" et permet, grâce à des **amorces*** "universelles", d'amplifier l'ADN. La deuxième fait appel à des amorces sélectives pour ajuster le nombre de fragments à observer. Suite à une électrophorèse, le profil obtenu permet de générer une matrice de présence/absence de fragments, à comparer à une base de données.



Source : FishTrace

- ♦ **RAPD : amplification aléatoire d'ADN polymorphe**

Il s'agit d'une PCR dans laquelle **la séquence des amorces*** utilisées est définie "au hasard". Les fragments amplifiés ne sont pas connus. Ces derniers sont ensuite séparés par électrophorèse et leurs profils comparés à une base de données (difficilement reproductible).

- ♦ **PCR multiplex**

Cette technique **permet l'amplification en une seule réaction de plusieurs séquences d'ADN distinctes cibles (amplicons)**, de longueurs différentes. Elle nécessite l'utilisation simultanée de plusieurs paires d'**amorces*** spécifiques, d'où la difficulté de mise en œuvre (risques d'hybridation d'amorces entre elles) et la nécessité d'avoir une idée des espèces présentes. Les amplicons sont séparés par électrophorèse en fonction de leur taille et comparés aux références.

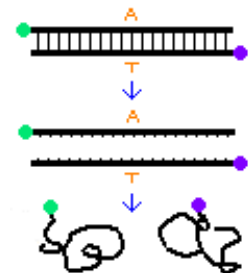
Parmi ces différentes techniques, la plus utilisée pour les produits de la mer est la PCR-RFLP.

- **Méthodes basées sur des différences de séquence d'ADN dénaturé**

L'identification des espèces peut également se faire par la distinction de variations dans la séquence d'ADN. Plusieurs méthodes existent pour détecter ces différences de séquence.

- ♦ **SSCP : polymorphisme de conformation du simple brin**

Cette technique implique l'amplification par PCR d'une séquence d'ADN précise puis **l'obtention d'un simple brin d'ADN en utilisant une solution dénaturante**. En fonction de la séquence des **nucléotides***, ce brin va adopter une forme dans l'espace (appelée conformation) spécifique et donc migrer plus ou moins lors d'une électrophorèse.



- ♦ **DGGE : électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes**

- ♦ **TGGE : électrophorèse sur gel avec gradient de température**

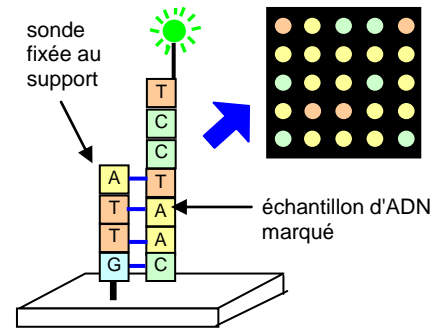
La première étape est là aussi l'amplification par PCR d'une séquence d'ADN précise mais ensuite, la dénaturation partielle du double brin d'ADN (ouverture) a lieu **en même temps** que l'électrophorèse soit **en conditions dénaturantes** (DGGE) soit **en gradient de température** (TGGE). Les fragments pourront être différenciés grâce au différentiel de migration dû à leur conformation (ouverture plus ou moins importante du double brin d'ADN en fonction de la nature des **nucléotides***).

La DGGE et la TGGE ne sont pour l'instant pas utilisées pour l'authentification d'espèces de poisson mais uniquement pour l'identification des bactéries.

• Méthodes basées sur l'hybridation de fragments d'ADN

Une **sonde*** (de séquence de **nucléotides*** choisie) est fixée à un support solide. L'échantillon marqué (par exemple par fluorescence) est mis en contact avec la **sonde*** et il s'hybridera uniquement si la séquence de la **sonde*** est complémentaire de la sienne. L'hybridation est ensuite détectée par mesure de fluorescence dans ce cas.

Le principe de l'hybridation est utilisé notamment dans le cas des "**puces à ADN**" aussi appelées **microarrays**.



Principaux gènes utilisés : les marqueurs ADN

Pour l'identification d'espèces, ce sont des gènes à polymorphisme important qui sont utilisés, c'est-à-dire des gènes dont il existe de nombreuses "versions", appelées allèles.

Les gènes sont, soit ceux de l'ADN nucléaire (contenu dans le noyau de la cellule), soit ceux de l'ADN **mitochondrial*** (qui sont les plus couramment employés).

Les principaux gènes de l'ADN **mitochondrial*** utilisés sont **ceux codant pour** :

- ↪ le **cytochrome b**
- ↪ l'**ARN 16S ribosomique***.
- ↪ la **sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase (COI)**
- ↪ la sous-unité 3 de la cytochrome c oxydase (COS III)
- ↪ l'ARN 12S
- ↪ l'ATPase

Les principaux gènes de l'ADN **nucléaire** utilisés sont **ceux codant pour** :

- ↪ l'**ARN 5S ribosomique***
- ↪ la **rhodopsine**
- ↪ l'ARN 18S **ribosomique***
- ↪ l'« internal transcribed spacer 2 » (ITS2)

et l'**ADN** satellite, minisatellite et **microsatellite** (ADN à courtes séquences répétées).

L'ADN microsatellite est notamment utilisé pour distinguer des populations ou des différences intra-espèces au sein d'une population.



Il est très important d'effectuer ces analyses d'ADN dans des **conditions standardisées** afin de pouvoir comparer les résultats aux bases de données.

La variabilité intra-espèce du gène étudié doit aussi être déterminée si nécessaire.



Par rapport aux protéines, l'ADN présente l'avantage d'être **plus stable à la chaleur**, **plus fidèle aux variations du génome*** et **présent dans toutes les cellules**.



Autres méthodes d'authentification

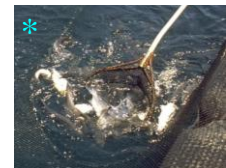
Les méthodes évoquées dans cette fiche reposent sur l'utilisation d'ADN et de protéines et concernent principalement l'identification d'espèces. Cependant, l'authenticité couvre un champ plus large que l'identification d'espèces comme: la détermination **de l'origine géographique** des produits ou la différenciation **produit frais / produit décongelé**, poissons **sauvages / poissons d'élevage**, ainsi que la détection de pratiques frauduleuses de **substitution de protéines animales** et d'**organismes génétiquement modifiés (OGM)**...

[Pour en savoir plus, consulter la fiche sur la différenciation poissons d'élevage / poissons sauvages ...](#)

[Pour en savoir plus, consulter la fiche sur la détermination de l'origine géographique des produits de la mer ...](#)

[Pour en savoir plus, consulter la fiche sur la différenciation produit frais / produit décongelé ...](#)

[Pour en savoir plus, consulter la fiche sur la détection de substitution de protéines de poissons par d'autres protéines animales...](#)



* Photos : © Ifremer



Réglementation

Plusieurs règlements et directives de l'Union Européenne concernent l'authenticité des produits de la mer, par exemple :

⇒ Le **règlement (CE) n° 2065/2001** de la Commission du 22 octobre 2001 établissant les modalités d'application du **règlement (CE) n° 104/2000** du Conseil en ce qui concerne l'**information du consommateur** dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture.

Trois mentions sont obligatoires sur l'étiquetage du produit : le nom commercial, le mode de production (pêche, pêche en eau douce ou élevage) et la zone de production ou de pêche.

Le nom scientifique de l'espèce doit accompagner le produit à tous les stades de la filière, mais il n'est pas obligatoire de l'indiquer sur l'étiquetage du produit destiné au consommateur final.

⇒ La **directive 2000/13/CE** du Parlement européen et du Conseil du 20 mars 2000 relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant l'**étiquetage** et la **présentation** des denrées alimentaires ainsi que la **publicité** faite à leur égard.

⇒ Le **règlement (CE) n° 510/2006** du Conseil du 20 mars 2006, relatif à la protection des **indications géographiques** et des **appellations d'origine** des produits agricoles et des denrées alimentaires.

Il existe également plusieurs règlements européens qui définissent les dénominations commerciales autorisées pour certaines espèces.

Par exemple, le **règlement (CEE) n° 2136/89** modifié par **les règlements (CE) n°1181/2003 et n°1345/2008** précise les dénominations applicables aux **conserves de sardine** : seule une espèce peut prétendre au nom de "sardine" (*Sardina pilchardus*), les autres espèces (une vingtaine) peuvent être appelées "produits de type sardine".

Le **règlement (CEE) n° 1536/92** fixe les normes de commercialisation des **conserves de thon et de bonite**. Il définit notamment que seules les espèces du genre *Thunnus* et l'espèce *Katsuwonus pelamis* peuvent bénéficier de l'appellation "thon". Les espèces des genres *Sarda*, *Euthynnus* (sauf *Katsuwonus pelamis*) et *Auxis* sont appelées "bonites".

Au niveau national, la liste des **noms français officiels** et des **dénominations de vente admises** par espèce, pour les poissons, les mollusques et autres invertébrés aquatiques (excepté pour les *pectinidés* couverts par l'**arrêté du 26 juin 1996**), les crustacés et les céphalopodes, est en ligne sur le site de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) :

<http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Listes-des-denominations-commerciales>

Bibliographie

Asensio Gil L. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. Trends in Food Science & Technology. **18**(11): 558-566.

Chen I.C., Chapman F.A., Wei C.I., O'Keefe S.F. (1996). Preliminary studies on SDS-PAGE and isoelectric focusing identification of sturgeon sources of caviar. Journal of Food Science **61** (3) : 533-539.

Durand P., Landrein A., Quéro J.C. (1985). Catalogue électrophorétique des poissons commerciaux. Ifremer – Centre de Nantes. 23p. + 83 fiches.

Etienne M. (1998). Diagnose d'espèce. Fiche technique Ifremer, Département Valorisation des Produits, mai, Bibliomer n°4, notice n°1998-0349, couleur 21x29,7 cm.

Féral J.-P. (2002). How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. **268**(2) : 121-145.

Martinez I., James D., Loréal H. (2005). Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity. FAO Fisheries Technical Paper – n° 455. Rome, ISSN n° 0429-9345. 73 p.
<http://www.fao.org/docrep/008/y5970e/y5970e00.htm>

Masseyeff R. (1997). Chap. 8 : Méthodes immunochimiques. *In* : Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Edited by P. Kamoun. Flammarion Médecine-Sciences : 231-284.

OFIMER (2001). Guide de classification des produits de la mer – Appellations, calibrages et tailles minimales des principales espèces commerciales. 133 p. + annexes.

Puyet A., Bautista J.M. (2009, à paraître). Chap. 35 : Detection of adulterations : identification of seafood species. *In* : Handbook of seafood and seafood products. CRC Press Ed.

Rasmussen R. S., Morrissey M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. Comprehensive reviews in food science and food safety. **7**: 280-295

Rasmussen R. S., Morrissey M. T. (2009). Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. Comprehensive reviews in food science and food safety. **8**: 118-154

Reid L.M., O'Donnell C.P., Downey G. (2006). Recent technological advances for the determination of food authenticity. Trends in Food Science & Technology **17** (7) : 344-353.

Skarpeid H.J. *et al.* (1999). Fish, shellfish and fish eggs. *In* : Food authenticity – Issues and methodologies. F.A.I.M. Concerted Action n° AIR3-CT94-2452. Eurofins scientific Ed, ISBN n° 2-9512051-0-4. p.105-117.

Teletchea F. (2009). Molecular identification methods of fish species : reassessment and possible applications. Reviews in Fish Biology and Fisheries. **19**: 265-293.

Verrez-Bagnis V. (2010). Part 5 : Safety – Chap. 34: Detection of adulterations : addition of foreign proteins. *In* : Handbook of seafood and seafood products. Nollet L.M.L. et Toldra F. Ed. CRC Press Taylor & Francis Group. p.615-686.

<http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm>

http://www.fishtrace.org/documents/FishTrace_Brochure.pdf