HAL
open science

Recherche et études de marqueurs précoces permettant de déterminer l'état de fraicheur de filets de poissons

Jérôme Cléach

▶ **To cite this version:**

Jérôme Cléach. Recherche et études de marqueurs précoces permettant de déterminer l'état de fraicheur de filets de poissons. Biologie animale. Université du Littoral Côte d'Opale, 2018. Français. NNT : 2018DUNK0497 . tel-02137516

HAL Id: tel-02137516

https://theses.hal.science/tel-02137516

Submitted on 23 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° ordre :

Université du Littoral Côte d'Opale

Thèse de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

Jérôme CLÉACH

Recherche et étude de marqueurs précoces permettant de déterminer l'état de fraîcheur de filets de poisson

Directeur de thèse : Thierry GRARD

Directeur de thèse (12 premiers mois) : Guillaume DUFLOS

Encadrant : Philippe LENCEL

Soutenue publiquement le 17 décembre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :

Véronique VERREZ-BAGNIS.....Cadre de Recherches, HDR, IFREMER, Nantes

Anne DEVIN.....Directrice de Recherches, CNRS, Bordeaux

Examinateurs :

Romdhane KAROUI.....Professeur des Universités, Université d'Artois, Arras

Philippe PASDOIS .....Ingénieur de Recherches, Université de Bordeaux

Thierry GRARD (directeur de thèse) .. Professeur des Universités, ULCO, Boulogne-sur-Mer

Philippe LENCEL (encadrant) ..... Maître de Conférences, ULCO, Boulogne-sur-Mer

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA) à Boulogne-sur-Mer, une composante de l'Institut Charles VIOLLETTE de Lille (EA 7394) également conventionnée à l'Anses *via* une unité sous contrat avec le laboratoire de sécurité des aliments (LSA) localisé à Maisons-Alfort et Boulogne-sur-Mer. L'unité BPA est dirigée par Thierry GRARD, professeur des universités à l'ULCO, Boulogne-sur-Mer.

Le directeur de cette thèse a été durant les 12 premiers mois Guillaume DUFLOS, chef de département, adjoint de la directrice à l'Anses de Boulogne-sur-Mer, avant d'être remplacé par Thierry GRARD, après sa soutenance d'HDR. Le co-encadrement de cette thèse a été assuré par Philippe LENCEL, maître de conférences à l'ULCO à Boulogne-sur-Mer. Les travaux de cette thèse ont été suivis par le comité de thèse composé de : Philippe MARCHETTI, professeur des universités – praticien hospitalier à l'Université de Lille 2, Isabelle COS, responsable de projet à PFI Nouvelles Vagues, Bruno LE FUR, directeur technique à PFI Nouvelles Vagues, Emmanuelle GOFFIER, responsable technologies et innovation à PFI Nouvelles Vagues, Christian SLOMIANNY, chargé de recherche INSERM à l'Université de Lille. Une collaboration étroite avec Philippe PASDOIS, ingénieur de recherche à l'institut hospitalo-universitaire LIRYC (Université de Bordeaux), nous a permis de développer les méthodologies exposées dans ce manuscrit.

Le support de cette thèse a été cofinancé par le Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale (PMCO) et la plate-forme d'innovation Nouvelles Vagues localisée à Wimereux.

Les moyens octroyés pour financer les travaux de cette thèse proviennent d'une part du gouvernement français et de la région des Hauts-de-France dans le cadre du projet « Recherche MARine et littorale en Côte d'Opale, des milieux aux ressources, aux usages et à la qualité des produits de la mer » (MARCO) émanant du contrat de plan état région (CPER) 2014-2020. D'autre part, cette recherche a également été financée par FranceAgrimer dans le cadre du projet Altfish (2014-2016).

Résumé

La fraîcheur est un paramètre clé de la qualité du poisson. Les méthodes actuelles appliquées en routine pour déterminer la fraîcheur du poisson ne sont pas applicables à toutes les espèces et reflètent davantage un début d'altération du produit. Ainsi, la recherche d'indicateurs précoces de fraîcheur du poisson représente encore un défi majeur et d'actualité dans l'industrie de la pêche.

Le but de ces travaux de thèse était de démontrer que les fonctions et l'intégrité mitochondriales étaient susceptibles de constituer des indicateurs précoces de la fraîcheur de filets de poisson. En effet, la mitochondrie est la « centrale » énergétique de la cellule eucaryote et joue un rôle clef dans les mécanismes de mort cellulaire tels que l'apoptose et la nécrose.

Les fonctions et l'intégrité mitochondriales de cellules musculaires de filets de poisson ont été étudiées à différents temps de conservation *post mortem* à 4°C. Le modèle d'étude était la daurade royale (*Sparus aurata*) (lignée cellulaire de fibroblastes (SAF-1) et muscles de poisson).

Dans un premier temps, la structure des mitochondries de poisson a été étudiée par microscopie électronique à transmission. De nombreuses dégradations de la structure des mitochondries ont été observées dans les filets à partir de 72 heures (J3) de conservation à 4°C. Ces altérations se sont accentuées à J4 et J6. La fonctionnalité des mitochondries a ensuite été évaluée selon deux approches : la respiration mitochondriale (oxygraphie) et le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) estimé avec la sonde fluorescente Rhodamine 123. À partir de 96 heures de conservation à 4°C (J4), ces deux paramètres ont été significativement impactés témoignant d'une altération des fonctions et de l'intégrité mitochondriales. Ces résultats sont ainsi en corrélation avec l'altération structurale observée par microscopie. En parallèle, une méthode d'évaluation du potentiel membranaire a été développée avec un fluorimètre à microvolume à partir d'un modèle bactérien puis de mitochondries isolées.

Ces travaux de thèse ont démontré que l'étude des fonctionnalités mitochondriales constitue un marqueur fiable et précoce de la fraîcheur des filets de poisson. Des connaissances supplémentaires sur les mécanismes cellulaires *post mortem* ont également été apportées.

Ces résultats constituent ainsi le point de départ pour le développement d'un kit d'évaluation de la fraîcheur et ouvrent la voie pour la recherche de marqueurs de fraîcheur et de congélation/décongélation basés sur les fonctionnalités et intégrité mitochondriales.

Mots clés : fraîcheur, daurade royale (*Sparus aurata*), mitochondrie, respiration mitochondriale, potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), oxygraphie, Rhodamine 123.

Abstract

Freshness is a key parameter of fish quality. Current routine techniques to determine fish freshness are not applicable to all species and reflect a late stage of alteration. Thus, research on early indicators of fish freshness still represents a major and topical challenge in fishing industry.

This PhD research project aimed to demonstrate that mitochondrial functions and integrity constitute early indicators of fish fillet freshness. Mitochondria are the powerhouse of the cell and play a central role in cell death mechanisms such as apoptosis and necrosis.

Mitochondrial function and integrity in fish filet muscle cells were studied at different times of storage *post mortem* at 4°C. The species studied as a model was the gilthead seabream (*Sparus aurata*) (gilthead seabream fibroblast cell line (SAF-1) and fish fillets).

Firstly, the structure of fish mitochondria was studied by transmission electron microscopy. Numerous mitochondrial structural alterations have been observed in fish fillet from 72 hours (D3) of storage at 4°C. These alterations were more pronounced at D4 and D6. Then, mitochondrial functionality was assessed with two approaches: mitochondrial respiration (oxygraphy) and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) estimated with the fluorescent probe Rh123. From 96 hours of storage at 4°C (D4), these two parameters were significantly disrupted demonstrating the alteration of mitochondrial function and integrity. The results are in correlation with the mitochondrial structural alterations described by microscopy. In parallel, a method of mitochondrial membrane potential evaluation has been developed with a micro-volume fluorimeter, first using bacteria and then isolated mitochondria.

This work demonstrated that the mitochondrial functionality study constitutes a reliable and early fish filet freshness indicator. Additional knowledge on cell mechanisms in *post mortem* condition has been brought. These results constitute the starting point for the development of a fish freshness assay kit and pave the way to research on others freshness and freeze-thawing indicators based on mitochondrial integrity and functionality.

Key words : Freshness, gilthead seabream (*Sparus aurata*), mitochondria, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$), oxygraphy, Rhodamine 123

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury de me faire l'honneur d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à Mesdames Véronique VERREZ-BAGNIS et Anne DEVIN pour leur travail de rapportrices et à Messieurs Rhomdane KAROUI et Philippe PASDOIS pour leur rôle d'examiteurs.
Je vous prie de croire en ma sincère reconnaissance.

Je remercie les membres de mon comité de thèse pour leur investissement et leurs précieux conseils : Isabelle COS, Emmanuelle GOFFIER, Philippe MARCHETTI, Christian SLOMIANNY et Guillaume DUFLOS.

Je tiens à remercier également :

Thierry GRARD, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce projet de thèse. Merci de m'avoir fait confiance durant ces trois années. Merci pour vos conseils et astuces pour la rédaction de ce manuscrit de thèse. Le logiciel Word n'a pas vraiment de secret pour vous. Maintenant, je sais maîtriser un lien hypertexte. En voici la démonstration : cliquez ici.
Je retiendrai de vous également le cinéphile et le mélomane que vous êtes. Et également le fan de Bruce Springsteen : « Boooorrrnnn in the USA ! ».

Philippe LENCEL, mon encadrant. Je retiendrai votre gentillesse naturelle, votre bonne humeur à toute épreuve, votre « souplesse » de caractère, votre grande curiosité, votre culture et votre persévérance aussi bien scientifique que dans la vie de tous les jours. Je n'oublierai jamais nos conversations philosophiques fortes instructives sur tous les sujets. Je retiendrai vos expressions telles que les fameux : « voili voilou » et le « ça roulotte ? ».

Guillaume DUFLOS, qui fut mon directeur de thèse durant les 12 premiers mois de ces travaux de thèse. Je me souviendrai de ton humour, ta générosité et ta sollicitude. Je me souviendrai également de ton pouvoir attractif vis-à-vis des vendeurs à la sauvette à Lisbonne lors du dernier WEFTA.

Les collègues de mon équipe : Irina, ma maman spirituelle du labo, Maryse, qui m'a accueilli chaleureusement à mon arrivée dans les Hauts de France, pour les soirées apéro

également, Cédric (qui n'a jamais admis que Koh Lanta est une série télévisée truquée : Ah !), Pierrette ETHUIN, Périne DOYEN, Denis WATIER, Méline SORET et Marie-France LOUCHET (merci pour l'oxygraphe !).

Les collègues du laboratoire PMOI

Philippe PASDOIS, pour avoir eu la gentillesse de m'apporter une aide précieuse à un moment crucial de ma thèse. Ta passion, ta curiosité, ton professionnalisme et ton optimisme ont été motivants pour moi et un véritable exemple.

Philippe DROIN, qui m'a accueilli au sein de PFI Nouvelles Vagues durant 5 mois. Grâce à vous, j'ai pu découvrir l'industrie de la pêche. Vous avez grandement participé à l'initiation de ces travaux de thèse grâce à votre optimisme et votre persévérance.

Daline BOJOLLY, qui fut comme une grande sœur durant ma thèse. Merci de m'avoir expliqué la vie de thésard. Merci pour ton aide et ta disponibilité à tout moment.

Nathalie (ou dois-je dire Dr AL RASSY maintenant), ma camarade de thèse, mon amie. Nous avons bien rigolé ensemble. Merci de m'avoir fait découvrir ta culture libanaise. Tu es une excellente ambassadrice de ton pays. La cuisine libanaise est devenue une de mes préférées grâce à toi (Merci Joseph du restaurant Tazka de Boulogne sur Mer). Merci de m'avoir appris quelques mots libanais. Shukran ! Je remercie également ta compatriote Maria « loubard »

Tareck AKA Le DUC ; Je retiendrai nos longues conversations et tes précieux conseils avisés. Je retiendrai également ta grande culture. Difficile de t'apprendre quelque chose. Merci de m'avoir fait découvrir Mitch Murder, Kung Fury et Spawn ! Je me souviendrai de nos soirées chez Los Polos Hermanos et de notre passion pour les films d'action des années 80.

Eudes Brian MVOULA (la pluie), le Largo Winch gabonais des temps modernes. Tu es un sacré personnage. Merci pour tes histoires délirantes et pour ta serviabilité à tout moment.

Mes fidèles petits camarades de l'Anses : Arnaud BRIET, Ludovic HERMABESSIERE (amateurs de Kasteel rouge), Julia MOUGIN, Alexandre DEHAUT (fidèle supporter du Football Club de Nantes) et Thomas BRAUGE.

Mes anciens collègues de PFI Nouvelles Vagues : Mathieu VOLTZ qui fut mon maître fileteur au début de ma thèse, FloFlo, Vince, Charles et bien sûr tous les membres de l'équipe chimie et de l'équipe microbiologie.

Jonathan (amateur de DC Comics, Funko et Lipton ice tea saveur menthe citron) pour les soirées Fifa 18 à rager sur le mode FUT.

Clément, pour ta gentillesse, les repas onctueux que tu m'as préparés. Tu as un vrai talent de boulanger. Je te souhaite beaucoup de plaisir et de réussite dans tes projets professionnels

Carmen, Jack (alias Jacky Boy) et Nounours. Vous n'êtes pas humains, vous ne parlez pas mais vous comptez beaucoup pour moi !

Toutes les daurades royales (et pas dorade attention !) qui ont été sacrifiées pour la Science. Reposez en paix.

A tous les habitants du boulevard de Clocheville, quartier de saveur et de lumière de Boulogne sur Mer. Merci pour avoir rendu ma vie nocturne calme et paisible. Mille mercis pour votre civisme exemplaire et votre grande « soif » de vivre, été comme hiver à tout moment de la journée.

François, mon ami de longue date et une dédicace spéciale à mes amis d'enfance : Thomas, Pierre, Elisabeth, Maxime, Kévin Hugo et Boris !

Rico, Momo, Faufau, à nos soirées frites, mayo du dimanche soir.

Enfin, j'attribue ma plus grande pensée pour le soutien infaillible de mes parents, mon frère, ma belle-sœur, ma filleule et ma petite greffière.

Table des matières

Avant-propos **3**

Résumé **5**

Abstract **6**

Remerciements **7**

Table des matières **11**

Liste des figures **15**

Liste des tableaux **19**

Liste des annexes **19**

Liste des abréviations **21**

Valorisation des travaux de thèse **23**

Introduction **25**

Etude bibliographique **31**

I. Ressources aquatiques aux échelles mondiale et française 33

A. Les situations mondiale et française des pêches et de l'aquaculture *33*

B. Consommations mondiale et française de poisson *33*

C. Importations et exportations du poisson en France *34*

D. Développement de l'aquaculture *37*

E. Réglementation européenne concernant l'étiquetage des produits de la mer et d'eau douce *38*

F. Bilan *38*

II. Aspects biologiques et évolution *post mortem* du poisson 39

A. Les aspects biologiques du poisson *39*

B. Les différentes phases d'altération biochimique du poisson post mortem *43*

C. Altération bactériologique du poisson post mortem *47*

D. Evolution structurale post mortem chez le poisson *49*

III. Les techniques actuelles d'analyses du poisson 50

A. Méthodes sensorielles *50*
B. Méthodes chimiques et microbiologiques *53*
C. Méthodes physiques *56*
IV. La mitochondrie, potentiel marqueur précoce de l'altération ? 62
A. Généralités sur les mitochondries *62*
B. Les mitochondries de poisson *64*
C. Les voies métaboliques de la mitochondrie *68*
D. Chaîne respiratoire et phosphorylation oxydative *70*
E. Régulation de la phosphorylation oxydative *71*
F. Le potentiel membranaire mitochondrial *74*
G. Les transporteurs mitochondriaux *79*
H. Mitochondries et mort cellulaire *83*
V. Synthèse de l'étude bibliographique 92

Matériels et méthodes 93

I. Modèles d'étude 95
A. La lignée cellulaire SAF-1 ..... *95*
B. Les filets de daurade royale (Sparus aurata) *95*
C. La souche bactérienne : Escherichia coli *96*
II. Etude structurale des mitochondries par microscopie électronique à transmission (MET) 96
III. Extraction des mitochondries 97
A. Extraction de mitochondries de cellules de la lignée SAF-1 ..... *97*
B. Extraction de mitochondries de filets de daurade royale *99*
C. Dosage des protéines mitochondriales *100*
IV. Evaluation de la respiration mitochondriale par oxygraphie 100
V. Evaluation du potentiel membranaire par fluorimétrie 103
A. Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) des cellules SAF-1 ..... *103*
B. Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) de mitochondries isolées *104*
C. Evaluation du potentiel membranaire bactérien ($\Delta\Psi$) à l'aide de sondes fluorescentes *106*
VI. Détermination de la viabilité bactérienne 108
VII. Analyses statistiques 109

Travaux de recherche 111

I. Analyse morphologique des cellules SAF-1 et des tissus de daurade royale par microscopie électronique à transmission 113
A. Lignée cellulaire SAF-1 ..... *113*
B. Cellules musculaires de filets de daurade royale *115*
II. Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) sur cellules entières 121
A. Microscopie à fluorescence *121*
B. Cytométrie en flux *124*

III. Evaluation de la respiration de mitochondries isolées 128
A. Lignée cellulaire SAF-1 128
B. Cellules musculaires de filets de daurade royale 130
IV. Evaluation du potentiel membranaire (ΔΨ) par fluorimétrie 135
A. Evaluation du $\Delta\Psi_m$ par fluorimétrie avec l'appareil Safas 135
B. Evaluation du ΔΨ par fluorimétrie avec l'appareil NanoDrop 3300 140

Conclusion générale et perspectives 155

I. Etude de la structure de mitochondries de poisson par microscopie électronique à transmission 157
II. Microscopie à fluorescence et cytométrie en flux 157
III. Etude des fonctions et de l'intégrité de mitochondries isolées 158
IV. Evolution *post mortem* du muscle de daurade royale 159
V. Perspectives 160
A. Optimisation de l'utilisation du NanoDrop 3300 160
B. Utilisation de nouvelles sondes avec le cytomètre en flux 160
C. Etude de la concentration en calcium 161
D. De la mitochondrie au tissu dans l'optique d'apporter des réponses rapides aux industriels 161
E. Etude de l'intégrité mitochondriale avec de nouveaux paramètres physiques et chimiques 162
F. Etudes à mener sur d'autres espèces d'intérêt commercial 162
G. Etude de marqueurs mitochondriaux pour différencier les filets frais de filets décongelés 162

Références bibliographiques 165

Liste des figures

Figure 1 : Evolution depuis 1950 de l'utilisation, de l'offre du poisson et de la population mondiale 33

Figure 2 : Evolution de la part de l'aquaculture dans la production mondiale de produits aquatiques 37

Figure 3 : Anatomie du muscle de poisson 40

Figure 4 : Organisation du muscle squelettique 41

Figure 5 : Réactions de synthèse de l'ATP. 44

Figure 6 : Schéma résumant les changements *post mortem* dans la chair de poisson 46

Figure 7 : Du changement biochimique aux changements structural et textural *post mortem* dans une cellule musculaire de filet de poisson 47

Figure 8 : Les différentes phases de l'altération du poisson. 48

Figure 9 : Evolution du score de la QIM pour la daurade royale en fonction de la durée de stockage. 52

Figure 10 : Schématisation du protocole d'extraction des ABVT et de leur titration 53

Figure 11 : Les trois modes de mesure de spectroscopie visible et proche infrarouge appliqués à la matrice poisson. 57

Figure 12 : Diagramme de Jablonski, (1933) illustrant les processus de fluorescence et de phosphorescence.... 58

Figure 13 : Schéma présentant le principe de la spectroscopie de fluorescence selon les deux types de méthodes : angle droit ou frontale 59

Figure 14 : Odeurs du poisson et des composés volatils contribuant à l'odeur caractéristique du poisson frais, altéré ou oxydé 60

Figure 15 : Morphologie et organisation structurale des mitochondries 63

Figure 16 : Images de microscopie électronique à transmission de mitochondries de poisson..... 64

Figure 17 : Réactions du cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs 69

Figure 18 : Le processus de la phosphorylation oxydative permettant la génération d'ATP 70

Figure 19 : Le transporteur ADP/ATP. 79

Figure 20 : Voies de transport des ions Ca^{2+} dans des mitochondries énergisées 80

Figure 21 : Organisation et structure hypothétique du pore de transition de perméabilité mitochondriale..... 82

Figure 22 : Voies de signalisation de l'apoptose et de la nécrose 84

Figure 23 : Les deux 2 hypothèses de la perméabilisation des membranes mitochondriales sous l'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 86

Figure 24 : Photographies de cellules SAF-1 en culture mettant en évidence la morphologie caractéristique des fibroblastes 95

Figure 25 : Illustrations de la daurade royale (*Sparus aurata*) 96

Figure 26 : Schéma résumant les grandes étapes et le temps nécessaire à l'extraction des mitochondries des cellules de la lignée SAF-1 98

Figure 27 : Schéma résumant les grandes étapes et le temps nécessaire à l'extraction des mitochondries de filets de daurade royale 99

Figure 28 : Schéma explicatif du fonctionnement d'un oxygraphe 101

Figure 29 : Observation structurale des cellules SAF-1 par microscopie électronique à transmission (MET) .. 114

Figure 30 : Sections longitudinales de muscles de daurade royale à 6 heures *post mortem* (J0). 116

Figure 31 : Sections longitudinales de muscles de daurade royale à 72 heures *post mortem* (J3). 117

Figure 32 : Sections longitudinales de muscles de daurade royale à 96 heures *post mortem* (J4). 118

Figure 33 : Sections longitudinales de muscles de daurade royale à 144 heures *post mortem* (J6). 119

Figure 34 : Microscopie à fluorescence de cellules SAF-1 marquées avec la sonde Rhodamine 123 après traitement au CCCP à différentes concentrations 122

Figure 35 : Microscopie à fluorescence de cellules SAF-1 marquées avec la sonde Rhodamine 123 après traitement au CCCP à différents temps d'exposition 123

Figure 36 : Estimation du potentiel membranaire mitochondrial des cellules SAF-1 traitées à différentes concentrations de CCCP après marquage à la Rh123 par cytométrie en flux 125

Figure 37 : Estimation du potentiel membranaire mitochondrial des cellules SAF-1 traitées à différentes concentrations de CCCP après marquage au Red CMXRos par cytométrie en flux 127

Figure 38 : Exemple de suivi de la consommation d'oxgène de mitochondries isolées de cellules SAF-1 par oxygraphie 128

Figure 39 : Evaluation de la respiration *post mortem* de mitochondries isolées de filets de daurade royale par oxygraphie à différents temps de conservation 131

Figure 40 : Taux de respiration (basal, état 3 et CAT) et index de contrôle respiratoire (RCI) de mitochondries isolées de daurade royale à différents temps de conservation 132

Figure 41 : Stimulation de la respiration de mitochondries isolées de daurade royale par le cytochrome c exogène à différents temps de conservation 133

Figure 42 : Evaluation du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) de mitochondries isolées de cellules SAF-1 par fluorimétrie avec l'appareil SAFAS Xenius XC 136

Figure 43 : Evaluation *post mortem* du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) de mitochondries isolées de daurade royale à différents temps de conservation par fluorimétrie (Safas) 138

Figure 44 : Histogrammes résumant les niveaux de fluorescence de la Rh123 à différents états respiratoires normalisés par rapport au CCCP à différents temps de conservation (mitochondries isolées de tissu de daurade royale) 139

Figure 45 : Microscopie à fluorescence d'*Escherichia coli* marqués avec les sondes Rhodamine 123 (Rh123) et DAPI sans ou avec traitement au CCCP 142

Figure 46 : Mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde DAPI à différentes concentrations d'*Escherichia coli* avec le NanoDrop 3300..... 143

Figure 47 : Evaluation du potentiel membranaire d'*Escherichia coli* par l'approche ratiométrique Rh123/DAPI 144

Figure 48 : Evaluation du potentiel membranaire d' *Escherichia coli* avec la sonde JC-10..... 146

Figure 49 : Impact de la congélation sur la viabilité des bactéries *Escherichia coli* et le potentiel membranaire bactérien ($\Delta\Psi$)..... 147

Figure 50 : Evaluation du potentiel membranaire de mitochondries isolées ($\Delta\Psi_m$) de cellules SAF-1 par fluorimétrie (Rh123) avec l'appareil NanoDrop 3300. 149

Figure 51 : Evaluation *post mortem* du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) de mitochondries isolées de daurade royale à différents temps de conservation par le fluorimètre NanoDrop 3300 151

Figure 52 : Histogrammes résumant les niveaux de fluorescence de la Rh123 à différents états respiratoires normalisés par rapport au CCCP à différents temps de conservation (NanoDrop 3300) 152

Figure 53 : Scénario hypothétique de l'évolution physiologique *post mortem* d'une cellule musculaire de filet de daurade royale de J0 à J4 160

Figure 54 : Sections transversales de muscles de daurade royale observées par microscopie électronique à transmission (MET) 163

Liste des tableaux

Tableau I : Consommation française des produits aquatiques depuis 1998 (en kg poids vif / habitant / an)..... 34

Tableau II : Liste des dix premiers pays importateurs de poissons et produits de la mer..... 35

Tableau III : Evolution française des importations, des exportations et du déficit du commerce extérieur des produits de la pêche et de l'aquaculture destinés à la consommation humaine (en équivalent poids vif (tonnes)) 36

Tableau IV : Répartition globale des importations et exportations des produits de la pêche et de l'aquaculture en France en 2016..... 36

Tableau V : Comparaison de la composition du muscle rouge et du muscle blanc dans les myotomes de poisson 41

Tableau VI : Paramètres analysés et attributs donnés chez la daurade royale dans le cadre d'un test QIM 52

Tableau VII : Liste de onze fluorophores présents dans l'alimentation 58

Tableau VIII : Les différents mécanismes de régulation du potentiel membranaire mitochondrial..... 75

Tableau IX : Données résumant la respiration de mitochondries isolées de SAF-1 à partir de trois expérimentations indépendantes 129

Liste des annexes

Annexe 1 : Article "Use of ratiometric probes with a spectrofluorometer for bacterial viability measurement" 185

Annexe 2 : Article "Mitochondrial activity as indicator of fish freshness" 207

Liste des abréviations

$\Delta\Psi_m$: potentiel membranaire mitochondrial

$\Delta\Psi_p$: potentiel membranaire plasmique

ABVT : Azote Basique Volatil Total

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

ATP : Adénosine TriPhosphate

BSA : Bovine Serum Albumin

CCCP : CarbonylCyanure m-ChloroPhénylhydrazone

CAT : CarboxyATractyloside

CTE : Chaîne de Transport des Electrons

DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole

DGCCRF : Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

DMA : DiMéthylAmine

ECACC : European Collection of Cell Culture

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

$FADH_2$: Flavine Adénine Dinucléotide

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

FSC : Forward Scatter

GC-MS : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

JC-1/JC-10 : 5 ,5', 6, 6' – tétrachloro-1, 1', 3, 3' – tétraéthyl-benzimidazolcarbocyanine

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MT : Microscopie à Fluorescence

MOMP : perméabilisation de la membrane mitochondriale externe

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

OCR : Oxygen Consumption Rate

OTMA : Oxyde de TriMéthylAmine

PI : Propidium Iodide

(m)PTP : Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale

QIM : Quality Index Method

RCI : Respiratory Control Index

Rh123 : Rhodamine 123

Red CMXRos : Chloro-méthyl-X- Rosamine

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SAF-1 : *Sparus Aurata* Fibroblast

SPME : micro extraction sur phase solide

TMA : TriMéthylAmine

TMRE : TétraMéthylRhodamine Ethyl ester

TMRM : TétraMéthylRhodamine Méthyl ester

Valorisation des travaux de thèse

Articles scientifiques

1. CLÉACH, J., WATIER, D., LE FUR, B. F., BRAUGE, T., DUFLOS, G., GRARD, T., & LENCEL, P. (2018). Use of ratiometric probes with a spectrofluorometer for bacterial viability measurement. *Journal of microbiology and biotechnology*. (**sous presse**) (voir Annexe 1 page 185)
2. CLÉACH J., PASDOIS P., MARCHETTI P., WATIER D., DUFLOS G., GOFFIER E., LACOSTE A.S., SLOMIANNY C., GRARD T. & LENCEL P. Mitochondrial activity as indicator of fish freshness. (**soumis** à *Food Chemistry* en novembre 2018) (voir Annexe 2 page 207)

Communications orales

1. CLÉACH, J., PASDOIS P., MARCHETTI P., WATIER D., DUFLOS G., GOFFIER E., LACOSTE A.S., SLOMIANNY C., GRARD T. & LENCEL P. Mitochondrial activity as a putative indicator of fish freshness alteration? 18 octobre 2018. Congrès WEFTA – 48ème édition (Lisbonne, Portugal).
2. CLÉACH, J., PASDOIS P., MARCHETTI P., WATIER D., DUFLOS G., GOFFIER E., LACOSTE A.S., SLOMIANNY C., GRARD T. & LENCEL P. Research and study of early indicators to determine the state of freshness of fish fillets. 30 mai 2018. Journée des doctorants de l'Institut Charles Viollette (ICV) – 2ème édition (Lille).
3. CLÉACH, J, LE FUR, B., DUFLOS, G., LENCEL, P., GRARD, T. Recherche et étude de marqueurs précoces permettant de déterminer l'état de fraîcheur des filets de poisson. 19 octobre 2017. Journée Doctorale du Campus de la Mer – 5ème édition (Boulogne-sur-Mer).
4. CLÉACH, J., LE FUR, B., DUFLOS, G., LENCEL, P., GRARD, T. Recherche et étude de marqueurs précoces permettant de déterminer l'état de fraîcheur des filets de poisson. 01 mars 2017. Journée des doctorants de l'unité Qualité Sécurité des Aliments (QSA) (Lille).

Communications écrites

1. CLÉACH, J, LE FUR, B., DUFLOS, G., LENCEL, P. & GRARD, T. Le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), comme marqueur de fraîcheur de filets de poissons ? 4 et 5 mai 2017. Congrès de la Recherche des IUT (Auxerre). 1er prix du poster obtenu.

2. CLÉACH, J, LE FUR, B., DUFLOS, G., LENCEL, P. & GRARD, T. Étude du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) chez la lignée cellulaire de fibroblastes de daurade royale SAF-1. Octobre 2016. Journée des doctorants de l'Anses (Maisons-Alfort).

Introduction

La consommation de poisson n'a cessé d'augmenter depuis les 50 dernières années aussi bien à l'échelle mondiale qu'à l'échelle nationale. En terme de chiffres, la consommation de poisson à l'échelle mondiale a atteint 20 kg/habitant/an en 2014 soit deux fois plus que dans les années soixante (FAO, (2016)). En France, en 2014, on estime que la consommation de poisson a augmenté de 25 % en 20 ans. De nos jours, elle est estimée à 24,3 kg/habitant/an (FranceAgrimer, (2017)). Cette augmentation rapide et constante de la consommation de poisson peut s'expliquer par différents facteurs tels que l'augmentation de la population, l'amélioration du niveau de vie, l'urbanisation, la hausse des revenus, la baisse du gaspillage et le commerce international qui offre un choix plus large.

Le poisson est une denrée rapidement périssable. La qualité du poisson est étroitement liée à son niveau de fraîcheur. La notion de fraîcheur est très subjective. Toutefois, il est communément admis qu'un poisson est considéré frais lorsque ses caractères chimiques, physiques et organoleptiques sont très proches de ceux du poisson vivant. Le consommateur est de plus en plus attentif et exigeant vis-à-vis de la qualité des aliments. Il s'interroge davantage sur l'origine du produit et sur son historique de conservation. De nos jours, l'affichage de la date de pêche du poisson sur les étals n'est toujours pas obligatoire. Malgré cela, le consommateur est très sensible à la notion de fraîcheur. L'autre acteur concerné par la notion de fraîcheur est l'industriel. Ainsi, les industriels de la filière pêche sont très demandeurs de méthodes permettant de déterminer la fraîcheur afin de valoriser leurs produits mais aussi de contrôler les produits d'importation. Aujourd'hui la France est le quatrième pays importateur de poisson au monde. Actuellement, des outils existent pour évaluer la fraîcheur des poissons. Les méthodes de routine utilisées en entreprise sont la mesure de l'Azote Basique Volatil Total (ABVT), de la triméthylamine (TMA) ainsi que des examens organoleptiques et microbiologiques. Ces méthodes présentent toutefois de nombreuses limites. Elles ne sont pas applicables à toutes les espèces, sont subjectives et permettent d'évaluer plus un début d'altération que la fraîcheur elle-même. Les examens organoleptiques requièrent un panel de juges experts et formés. Concernant l'ABVT/TMA, les différences significatives ne sont observables bien souvent qu'à partir de huit jours de conservation, reflétant plus un niveau d'altération que de fraîcheur.

La recherche et le développement de méthodologies permettant de déterminer la fraîcheur d'un poisson de façon rapide, objective et peu onéreuse restent de nos jours encore un challenge majeur bénéfique à la fois pour l'industrie de la pêche et le consommateur. C'est dans ce contexte que les travaux de cette thèse s'inscrivent, avec pour but « la recherche et

l'étude de marqueurs précoces permettant de déterminer l'état de fraîcheur de filets de poisson ». Les fonctions et l'intégrité mitochondriales ont été étudiées comme potentiels marqueurs de fraîcheur au cours de nos travaux en utilisant comme modèle d'étude la daurade royale (*Sparus aurata*).

Ce manuscrit s'organise en quatre grandes sections. Une étude bibliographique est présentée en première section. Celle-ci expose dans une première partie un bilan des ressources halieutiques (consommation, importation, exportation, aquaculture, réglementation) à l'échelle mondiale et à l'échelle française. Dans une seconde partie, les aspects biologiques du poisson sont décrits (classification, anatomie, composition) ainsi que l'évolution *post mortem* de la chair de poisson. Dans la troisième partie, l'ensemble des méthodes d'analyse qualitatives du poisson sont détaillées. Enfin, la quatrième partie est centrée sur la mitochondrie en exposant des généralités sur les mitochondries (origine, structure), la chaîne respiratoire, le potentiel membranaire mitochondrial et leur rôle central dans les mécanismes de mort cellulaire. Les caractéristiques des cellules de poisson sont également exposées avec leurs particularités.

La section « Matériel et Méthodes », pour l'ensemble des expérimentations réalisées, constitue la deuxième partie de ce manuscrit.

La troisième section expose les résultats obtenus dans ces travaux de thèse avec une discussion répartie sur quatre parties correspondant aux objectifs majeurs. La lignée cellulaire de fibroblastes de daurade royale SAF-1 est, dans chaque approche, utilisée comme modèle de développement et de référence.

La première partie porte sur une étude microscopique. L'ultrastructure des mitochondries de poisson est étudiée à la fois dans les cellules (SAF-1) et dans les tissus de filets de daurade royale. L'évolution ultra-structurale *post mortem* des mitochondries de daurade royale à différents temps de conservation à 4°C est analysée.

La deuxième partie est consacrée à l'évaluation du potentiel membranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$ dans les cellules SAF-1 et les adipocytes extraits de filets de daurade royale. Etant donné les difficultés techniques et logistiques rencontrées, les travaux ont ensuite été redirigés vers l'étude des mitochondries isolées.

Ainsi, la troisième partie expose l'étude de la respiration de mitochondries isolées de cellules SAF-1 et de cellules musculaires de filets de daurade royale. Un protocole d'extraction de mitochondries de poisson a pu être ainsi validé. En parallèle, l'étude de la respiration mitochondriale par oxygraphie a permis d'évaluer l'intégrité et les fonctions de mitochondries

isolées de cellules SAF-1 et des filets de daurade royale à différents temps de conservation à 4°C.

Enfin, dans une quatrième partie, l'intérêt est centré sur l'évaluation du potentiel membranaire de mitochondries isolées par fluorimétrie comme indicateur des fonctions mitochondriales. Le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées de filets de daurade royale, à différents temps de conservation à 4°C, a été étudié à l'aide d'un fluorimètre classique. D'autre part, la capacité et la sensibilité d'un fluorimètre à microvolume (NanoDrop 3300) à déterminer un $\Delta\Psi$ ont été étudiées à partir d'un modèle bactérien (*Escherichia coli*). La méthodologie ayant été validée sur les bactéries, le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées de poisson (SAF-1 et filets) a été évalué avec le même fluorimètre à microvolume.

Enfin, la cinquième et dernière partie présente la conclusion générale ainsi que les perspectives de ces travaux de thèse.

Etude bibliographique

I. Ressources aquatiques aux échelles mondiale et française

A. Les situations mondiale et française des pêches et de l'aquaculture

Sur 33 200 espèces de poisson recensées, seulement 700 espèces sont destinées à des fins alimentaires et à la production alimentaire soit seulement 2%. Afin de mieux comprendre l'intérêt de développer de nouvelles méthodes de détermination de la fraîcheur du poisson, il est important d'avoir une vue d'ensemble sur la consommation, l'importation, l'exportation, l'aquaculture et la réglementation liée à l'étiquetage de produits aquatiques.

Tous les deux ans, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (en anglais : « Food and Agriculture Organization of the United Nations ») publie un rapport détaillé sur la situation mondiale des pêches et de l'aquaculture (FAO, (2016)). A l'échelle nationale, l'établissement FranceAgrimer dresse tous les ans, dans un rapport détaillé, un bilan sur la consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture en France (FranceAgrimer, (2017)). Les données récoltées par la FAO et FranceAgrimer sont donc précieuses pour dresser la situation de la consommation, de l'importation, de l'exportation et de l'aquaculture des produits aquatiques aux échelles mondiale et nationale.

B. Consommations mondiale et française de poisson

La population mondiale ne cesse d'augmenter. En l'espace de 50 ans (des années soixante à aujourd'hui), elle est passée de 3 milliards à 7,4 milliards d'habitants (Figure 1 ci-dessous).

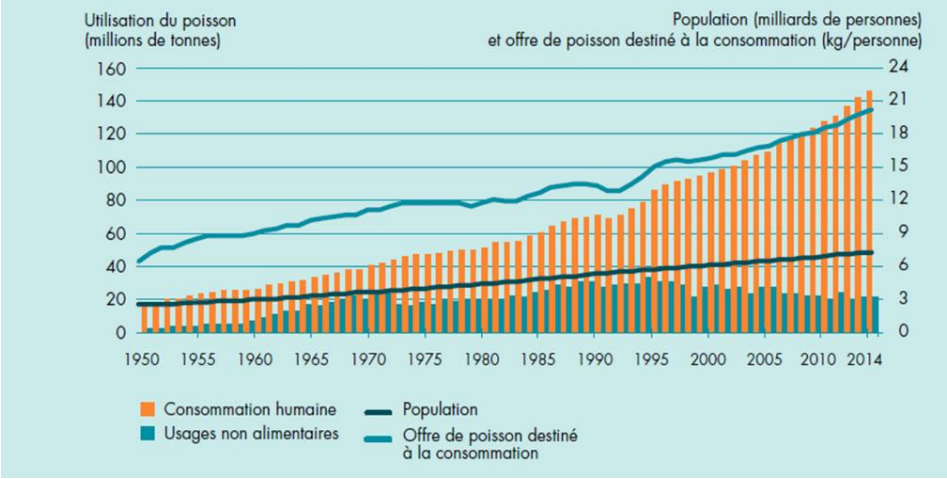


Figure 1 : Evolution depuis 1950 de l'utilisation, de l'offre du poisson et de la population mondiale
Source : FAO, (2016)

En 2050, selon les estimations, la population mondiale devrait atteindre environ 9 millards d'habitants. L'offre mondiale de poisson destinée à la consommation humaine a crû deux fois

plus rapidement que la population mondiale (augmentation de 3,2% en moyenne par an contre 1,6 %). Cette augmentation de la population peut expliquer la hausse de la consommation en produits aquatiques. Toutefois, il faut également prendre en considération la hausse de la production et le commerce international qui offrent un choix plus large, ainsi que l'urbanisation, la hausse des revenus et la baisse du gaspillage qui ont contribué à l'augmentation de la consommation mondiale de produits aquatiques. En terme de chiffres, cette dernière a atteint 20 kg/habitant/an en 2014 soit deux fois plus que dans les années soixante (Tableau I ci-dessous). La consommation française de poisson en 2014 était de 24,3 kg/habitant/an. Depuis 15 ans, cette consommation est stable et toujours supérieure à la moyenne mondiale. Sur une moyenne établie entre 2013 et 2015, il est estimé que 59 % des produits aquatiques consommés par les Français sont des poissons de pêche et 12 % des poissons d'élevage. En 2016, les trois espèces les plus consommées par les ménages français étaient : le cabillaud (*Gadus morhua*), le saumon (*Salmo salar*) et le lieu noir (*Pollachius virens*). La daurade royale figurait en neuvième position.

Tableau I : Consommation française des produits aquatiques depuis 1998 (en kg poids vif / habitant / an)

FranceAgrimer, (2017)

	Population (millions d'hab.)	TOUS PRODUITS AQUATIQUES	POISSONS	COQUILLAGES, CRUSTACÉS ET CÉPHALOPODES
1998	59,899	28,7	19,1	9,7
1999	60,123	30,0	20,1	9,9
2000	60,508	31,0	21,1	9,8
2001	60,941	33,8	23,6	10,1
2002	61,385	34,4	24,4	10,0
2003	61,824	34,1	23,6	10,6
2004	62,251	35,7	24,4	11,3
2005	62,731	35,4	24,0	11,3
2006	63,186	35,7	24,3	11,5
2007	63,601	34,0	23,2	10,8
2008	63,962	34,0	22,6	11,4
2009	64,305	34,8	23,2	11,6
2010	64,613	35,6	24,0	11,6
2011	64,933	36,5	24,8	11,7
2012	65,241	33,3	22,9	10,4
2013	65,525	34,2	24,1	10,1
2014	66,021	34,1	24,3	9,8
2015*	66,318	33,4	23,8	9,7

* Estimations

FranceAgriMer

C. *Importations et exportations du poisson en France*

Pour répondre aux besoins des consommateurs, la France a davantage eu recours à l'importation de poisson. En l'espace de 20 ans, l'importation de poisson destinée à la consommation humaine a augmenté de 65 % (1 426 160 tonnes en équivalent poids vif en 2016 contre 865 717 tonnes en 1997). La France figure ainsi en cinquième position parmi les plus gros pays importateurs de poissons et produits de la mer derrière l'Espagne, la Chine, le

Japon et les Etats-Unis (Tableau II ci-dessous). Le saumon, le thon (*Thunnus spp.*) et le cabillaud sont les trois espèces les plus importées sur le territoire français. Les exportations de poissons, quant à elles, suivent le chemin inverse. Elles ont baissé de 20 % en 20 ans (285 409 tonnes en équivalent poids vif en 2016 contre 355 867 tonnes en 1997) (FranceAgrimer, (2017)).

Tableau II : Liste des dix premiers pays importateurs de poissons et produits de la mer

Pays importateurs	2004	2014	TCA
	millions d'USD		pourcentage
Etats-Unis d'Amérique	11 964	20 317	5,4
Japon	14 560	14 844	0,2
Chine	3 126	8 501	10,5
Espagne	5 222	7 051	3
France	**4 176**	**6 670**	**4,8**
Allemagne	2 805	6 205	8,3
Italie	3 904	6 166	4,7
Suède	1 301	4 783	13,9
Royaume-Uni	2 812	4 638	5,1
République de Corée	2 250	4 271	6,6
Sous-total des dix	52 119	83 447	4,8
Reste du Monde - total	23 583	57 169	9,3
Total mondial	75 702	140 616	6,4

Note : la colonne TCA donne le taux de croissance annuel moyen pour la période 2004-2014

Source : FAO, (2016)

Le saumon et le thon sont les deux espèces de poisson les plus exportées par la France. Ces chiffres montrent clairement un déséquilibre entre importation et exportation. Cette tendance, qui ne cesse d'augmenter depuis 20 ans, a causé un important déficit aussi bien en termes de volumes qu'en termes de budgets. De 1997 à nos jours, le déficit en termes de volumes entre poissons importés et poissons exportés a doublé (Tableau III page 36). En parallèle, le déficit commercial a augmenté de 10,5 % de 2014 à 2016. Aujourd'hui, il est estimé à plus de 4 milliards d'euros. La France importe majoritairement de Norvège et exporte principalement en Espagne. A l'échelle mondiale, la Chine occupe la première place parmi les plus gros pays exportateurs de produits aquatiques devant la Norvège, le Vietnam, la Thaïlande et les Etats-Unis. Dans le cadre de ces travaux de thèse, la nature des poissons importés a été étudiée. D'après les chiffres de 2016, 28 % des poissons importés en France étaient congelés, filetés et

7,5% des poissons étaient frais et filetés (Tableau IV page 36). Dans le ce cas des exportations françaises, 8,5 % des poissons exportés étaient congelés, filetés et 4,2% étaient frais filetés.

Tableau III : Evolution française des importations, des exportations et du déficit du commerce extérieur des produits de la pêche et de l'aquaculture destinés à la consommation humaine (en équivalent poids vif (tonnes)) (FranceAgrimer, (2017))

Année	IMPORTATIONS			EXPORTATIONS			DEFICIT		
	Poissons	Coquillages, crustacés et céphalopodes	Total	Poissons	Coquillages, crustacés et céphalopodes	Total	Poissons	Coquillages, crustacés et céphalopodes	Total
1997	865 717	336 233	1 201 950	355 867	64 537	420 404	509 850	271 697	781 546
1998	920 619	361 928	1 282 547	322 790	64 723	387 513	597 828	297 205	895 033
1999	985 151	394 661	1 379 812	350 441	82 317	432 758	634 710	312 344	947 054
2000	1 142 921	404 655	1 547 576	456 339	98 633	554 972	686 582	306 022	992 604
2001	1 230 608	443 440	1 674 048	376 014	103 106	479 120	854 594	340 334	1 194 928
2002	1 241 594	439 818	1 681 412	341 815	103 626	445 441	899 779	336 192	1 235 971
2003	1 258 850	477 993	1 736 843	413 027	119 905	532 932	845 823	358 088	1 203 911
2004	1 354 475	516 383	1 870 858	400 171	116 773	516 944	954 304	399 610	1 353 913
2005	1 378 660	549 541	1 928 201	386 741	208 243	594 985	991 919	341 298	1 333 216
2006	1 386 453	566 644	1 953 097	373 375	122 539	495 914	1 013 078	444 105	1 457 183
2007	1 370 475	554 088	1 924 563	373 216	140 240	513 456	997 259	413 848	1 411 107
2008	1 384 416	583 315	1 967 731	381 069	116 489	497 558	1 003 347	466 826	1 470 173
2009	1 366 113	593 590	1 959 704	310 131	101 440	411 571	1 055 982	492 150	1 548 133
2010	1 407 175	629 894	2 037 069	271 060	116 112	387 172	1 136 115	513 782	1 649 897
2011	1 461 755	616 445	2 078 200	262 333	100 323	362 656	1 199 422	516 122	1 715 544
2012	1 407 981	523 660	1 931 641	306 810	90 840	397 650	1 101 171	432 820	1 533 991
2013	1 447 931	514 369	1 962 300	292 188	90 914	383 102	1 155 742	423 455	1 579 197
2014	1 406 952	507 013	1 913 965	257 192	94 878	352 070	1 149 760	412 134	1 561 895
2015	1 403 341	516 416	1 919 757	274 126	104 131	378 257	1 129 216	412 285	1 541 500
2016	1 426 160	478 993	1 905 153	285 409	96 275	381 683	1 140 751	382 718	1 523 469

Tableau IV : Répartition globale des importations et exportations des produits de la pêche et de l'aquaculture en France en 2016
FranceAgrimer, (2017)

Catégorie de produit	Etat ou type de fabrication	IMPORTATIONS		EXPORTATIONS		BALANCE (export moins import)	
		Volume (T)	Valeur (1 000€)	Volume (T)	Valeur (1 000€)	Volume (T)	Valeur (1 000€)
Poissons de mer *	Vivant, frais, réfr(entiers)	110 786	464 287	44 523	279 604	-66 264	-184 682
	Frais, réfr(filetés)	39 841	322 323	4 128	40 022	-35 713	-282 300
	Congelé(entiers)	48 178	118 611	97 225	197 511	49 048	78 899
	Congelé (filetés)**	191 268	744 472	13 508	69 419	-177 760	-675 053
	Séché, salé, fumé	18 395	87 455	689	5 297	-17 706	-82 158
	Conserves	166 625	673 330	23 272	126 981	-143 353	-546 348
	Total	**575 092**	**2 410 477**	**183 345**	**718 835**	**-391 747**	**-1 691 642**
Poissons amphibiotiques*** et d'eau douce	Vivant, frais,réfr.(entiers)	122 312	831 878	13 933	87 943	-108 379	-743 935
	Frais,réfr.(filetés)	17 859	162 018	5 078	57 796	-12 782	-104 222
	Congelé (entiers)	12 242	43 290	4 280	14 066	-7 962	-29 224
	Congelé (filetés)	28 894	178 343	4 979	26 025	-23 915	-152 318
	Séché, salé, fumé	8 444	104 471	3 959	71 800	-4 485	-32 670
	Conserves	1 877	15 552	2 483	26 472	606	10 920
	Total	**191 629**	**1 335 552**	**34 711**	**284 102**	**-156 918**	**-1 051 450**

*y compris foies, œufs et laitances

**y compris longes de thon

***y compris salmonidés

D. Développement de l'aquaculture

La consommation mondiale de poisson par habitant ne cesse d'augmenter depuis 60 ans. En parallèle, la production mondiale totale d'animaux aquatiques a logiquement augmenté. En 25 ans, la pratique de l'aquaculture s'est développée et participe aujourd'hui d'une façon considérable à la production de produits aquatiques. En 2014, 44,1 % de la production mondiale de produits aquatiques pêchés étaient issues de l'aquaculture contre 20% en 1985 (Figure 2 ci-dessous).

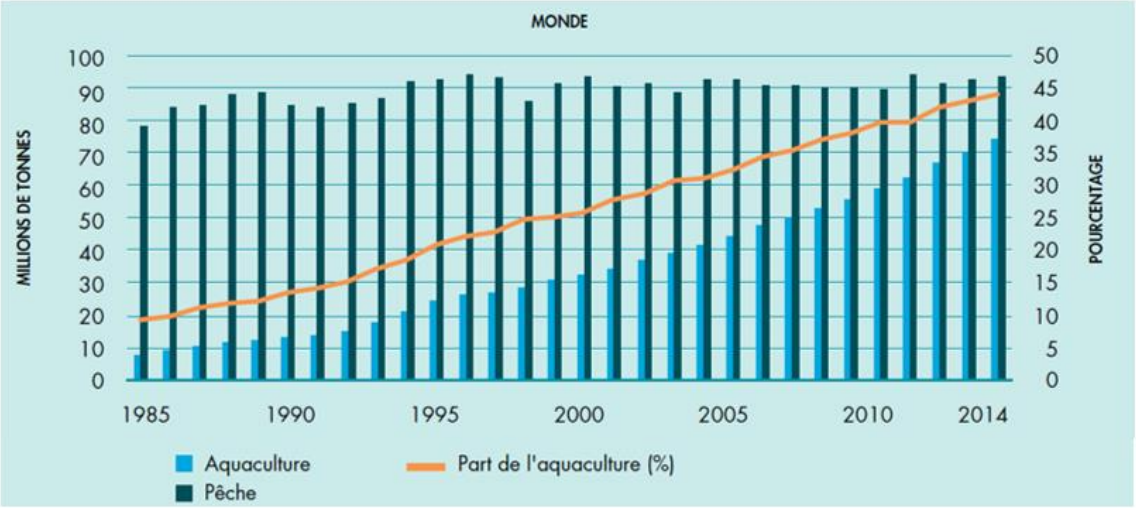


Figure 2 : Evolution de la part de l'aquaculture dans la production mondiale de produits aquatiques (Source : FAO, (2016))

La production aquacole est en quasi-totalité destinée à un usage alimentaire. D'après les chiffres de 2014, 68 % des espèces aquatiques d'élevage sont des poissons. L'Océanie est le seul continent ou la part de l'aquaculture a diminué dans la production depuis ces trois dernières années. La Chine, l'Inde, le Vietnam, le Bengladesh et l'Egypte se sont établis comme les cinq grands leaders de l'aquaculture. Dans ces pays, la production de poissons d'élevage est supérieure à la production de poissons sauvages. La Chine représente à elle seule, 62 % de la production aquacole mondiale. A l'échelle européenne, la France est le troisième producteur de produits aquatiques devant l'Espagne et le Royaume-Uni. Sa production est stable depuis 7 ans mais est plus faible de 30 % en comparaison du début des années 2000. Contrairement à la tendance mondiale, cette production est essentiellement originaire de la pêche. De ce fait, la part de la production aquacole en France reste encore faible.

E. Réglementation européenne concernant l'étiquetage des produits de la mer et d'eau douce

La Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) nous permet de prendre connaissance des règles applicables à l'étiquetage des produits de la mer et de l'aquaculture, dont les poissons. Ces règles sont répertoriées dans le règlement européen n°Règlement UE 1379, (2013) . On y apprend que le consommateur final doit être informé à propos du produit non transformé comme le filet de poisson de la dénomination commerciale, du nom scientifique de l'espèce, de la méthode de production (pêché, pêche en eau douce ou élevé) avec la catégorie de l'engin de pêche (senne, chalut, filet maillant), de la zone de pêche ou du pays d'élevage et enfin de son état décongelé si c'est le cas. Ces informations citées sont les seules obligatoires. A ce jour, la date de capture et la date de débarquement sont des informations facultatives, donc non obligatoires. Dans la grande majorité des cas, les dates de capture et de débarquement ne sont pas indiquées au consommateur. Ce dernier n'est donc pas informé du temps qui s'est écoulé depuis la mort du poisson. Ce manque d'information (facultative) perturbe ainsi l'appréciation de la fraîcheur d'un poisson pour un public essentiellement composé de consommateurs non formés à l'évaluation organoleptique d'un produit aquatique. La tâche est d'autant plus compliquée lorsqu'il s'agit d'un filet.

F. Bilan

L'ensemble des données proposées par la FAO et FranceAgrimer permet de dresser un constat global sur la consommation, l'importation, l'exportation et la production des produits aquatiques aussi bien à l'échelle mondiale qu'à l'échelle française. La France fait partie des grands pays consommateurs de poisson avec 24,3 kg/habitant/an. Toutefois, le pays est en retrait dans le secteur de la production de poissons sauvages et d'élevage. Les taux de production et d'exportation de produits aquatiques stagnent, voire diminuent. Pour répondre à ses besoins, la France importe de plus en plus en provenance des pays européens et asiatiques. Un tiers des poissons importés arrivent filetés sur le territoire français, dont la majorité est à l'état congelé. La détermination de la fraîcheur est plus délicate sur le filet que sur le poisson entier. De plus, l'exigence des consommateurs français vis-à-vis de la qualité du produit alimentaire est plus forte et les fraudes sur les produits importés sont de plus en plus nombreuses. Dans ce contexte, les professionnels de la filière pêche sont très demandeurs de méthodes innovantes de détermination de la fraîcheur du produit en particulier sur filet. Des méthodes simples, rapides et efficaces permettraient de contrôler l'ensemble des produits

importés et également de valoriser la pêche française. Pour mettre au point ces outils de détermination de la fraîcheur, il est important en amont de connaître et comprendre l'évolution *post mortem* du poisson.

II. Aspects biologiques et évolution *post mortem* du poisson

A. Les aspects biologiques du poisson

1. Classification

Classiquement, est considéré comme du poisson tout organisme vivant vertébré aquatique utilisant des branchies pour respirer et possédant des nageoires locomotrices. Cette définition est présente dans bon nombre d'ouvrages et dictionnaires. En 2017, d'après la base de données FishBase, 33 200 espèces de poissons sont recensées, soit l'un des plus gros groupes d'espèces du règne animal. Les différentes espèces de poisson peuvent être classées suivant de nombreux critères tels que leur habitat : eau marine ou eau douce ou poisson de fond (benthiques) ou poisson pélagique (nageant près de la surface de l'eau). Ils sont également classés suivant leur composition : poissons osseux (Ostéichtyens) ou cartilagineux (Chondrichtyens) comme les requins et raies (*Raja spp.*) principalement. Il y a également trois classes de poissons selon la teneur en lipides : poisson maigres (exemple : daurade royale) (moins de 5% de lipides), poissons mi-gras (exemple : bar (*Dicentrarchus labrax*)) (entre 5 et 10 % de lipides) et poissons gras (exemples : saumon, thon) (entre 10 et 15 % de lipides). Ces contenus en matières grasses sont très dépendants de l'espèce et du niveau de maturité du poisson. Enfin, leur catégorisation peut dépendre de leur forme générale : les poissons plats (raie) et les poissons ronds (daurade royale).

2. Anatomie

Le poisson est un animal vertébré. Par conséquent, il possède une colonne vertébrale qui s'étend de la tête jusqu'à la nageoire caudale. Les vertèbres constituant la colonne vertébrale portent des côtes appelées communément arrêtes composées de structure osseuse ou cartilagineuse. La masse musculaire représente environ 35 à 60 % du poids total chez le poisson. Elle est composée à 90% de fibres musculaires et de 10 % de tissus adipeux et conjonctifs (Listrat *et al.*, (2016)) La masse musculaire du poisson est présente des deux côtés du poisson et constitue le filet. Chez le poisson, il n'y pas de système tendineux pour assurer l'attache du muscle au squelette. Le muscle est composé de longs faisceaux de cellules musculaires appelés myotomes ou myomères disposés parallèlement dans le sens longitudinal

du poisson, autrement dit de façon perpendiculaire à la colonne vertébrale. Chaque faisceau est relié et délimité par des gaines de tissu conjonctif appelées myocommes ou myoseptes qui sont accrochées au squelette et à la peau (Bremner et Hallett, (1985)). Ainsi, le myocomme permet d'établir un lien entre le muscle, le squelette et la peau. Son rôle consiste également à assurer la transmission des forces de contraction fibrillaire d'un myomère à l'autre ainsi qu'au squelette et à la peau. Cette disposition parallèle des myomères est en adéquation avec le mouvement d'ondulation nécessaire au déplacement du poisson (Figure 3 ci-dessous).

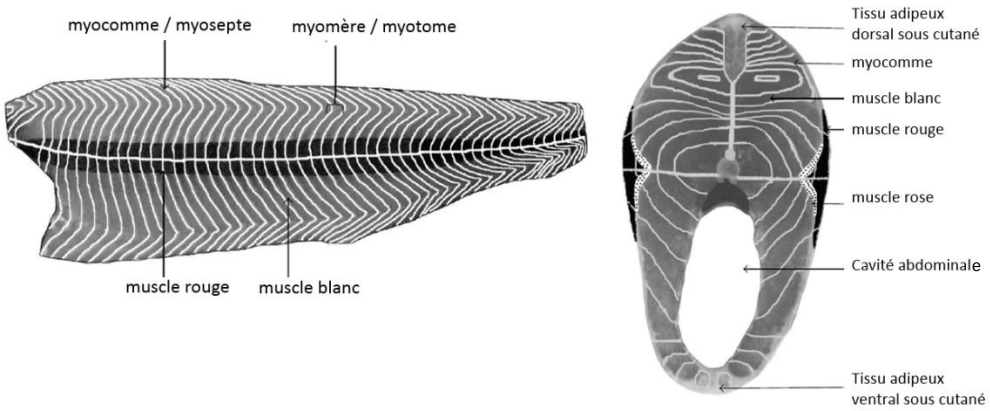


Figure 3 : Anatomie du muscle de poisson
(d'après Dunajski, (1980); Listrat *et al.*, (2016))

La musculature du poisson est la partie se trouvant sur les flancs du poisson, de la tête à la queue. Elle est communément appelée filet. Cette zone est la partie majeure comestible du poisson. Selon l'espèce, la forme ou l'âge du poisson, le muscle représente 25 à 60 % du poids total de l'animal. Le muscle peut être divisé en deux types : le muscle blanc et le muscle rouge (appelé aussi muscle sombre, muscle brun). Listrat *et al.*, (2016) évoquent également le muscle rose. Leur proportion varie selon les espèces et leur mode de vie.

Le muscle blanc est impliqué dans les efforts soudains et rapides. Il est composé de fibres de type II. Il puise son énergie de la glycolyse anaérobie (voie glycolytique). Il est en général plus présent que le muscle rouge et davantage dans les espèces vivant au fond des mers et se déplaçant peu.

Le muscle rouge doit sa couleur à une forte teneur en myoglobine. Il est impliqué dans les efforts lents mais prolongés et possède un métabolisme aérobie (voie oxydative). Par conséquent, le muscle rouge est très présent chez les espèces pélagiques. Le muscle rouge, présent le long de l'arrête centrale de la tête jusqu'à la queue, est riche en fibres de type I. Ceci explique pourquoi il est beaucoup plus riche en mitochondries, en myoglobine et en lipides que le muscle blanc. Le muscle blanc se caractérise par une prédominance en enzymes glycolytiques et d'isoformes de protéines associées à une contraction rapide. Le muscle rouge

quant à lui dispose d'un contenu plus important en enzymes oxydatives et d'isoformes de protéines à contraction lente (Kuypers et Roomans, (1980)). La teneur en protéines et les fonctions protéiques sont similaires entre les mitochondries du muscle rouge et du muscle blanc. La différence majeure observée entre mitochondries du muscle rouge et du muscle blanc se situe dans le métabolisme des lipides. Le taux de certaines enzymes impliquées dans la β-oxydation est 25 % fois plus élevé dans le muscle rouge que dans le muscle blanc. Ceci implique, dans le muscle rouge, un taux respiratoire maximal utilisant majoritairement les lipides comme source d'énergie comparé au muscle blanc (Glancy et Balaban, (2011)) (Tableau V ci-dessous).

Tableau V : Comparaison de la composition du muscle rouge et du muscle blanc dans les myotomes de poisson (adapté du livre d'Hart et Reynolds, (2008))

Fibres rouges	Fibres blanches
Diamètre d'environ 60-150 µm	Fibres de plus de 300 µm
Richement vascularisées	Pauvrement vascularisées
Myoglobine abondante, coloration rouge	Absence de myoglobine, couleur blanche
Nombreuses mitochondries (grande taille)	Peu de mitochondries (petite taille)
Enzymes oxydatives présentes	Enzymes de la glycolyse anaérobie
Faible activité de l'enzyme "myosine ATPase"	Haute activité de l'enzyme "myosine ATPase"
Stock de glycogène et de lipides	Stock de glycogène et peu de lipides
Système sarcotubulaire avec un plus faible volume que dans les fibres à contraction rapide	Système sarcotubulaire relativement plus large

Lorsqu'on analyse la cellule musculaire de poisson par microscopie électronique à transmission, on constate que l'organisation et la composition sont identiques à une cellule musculaire de mammifères (Ayala *et al.*, (2010)).

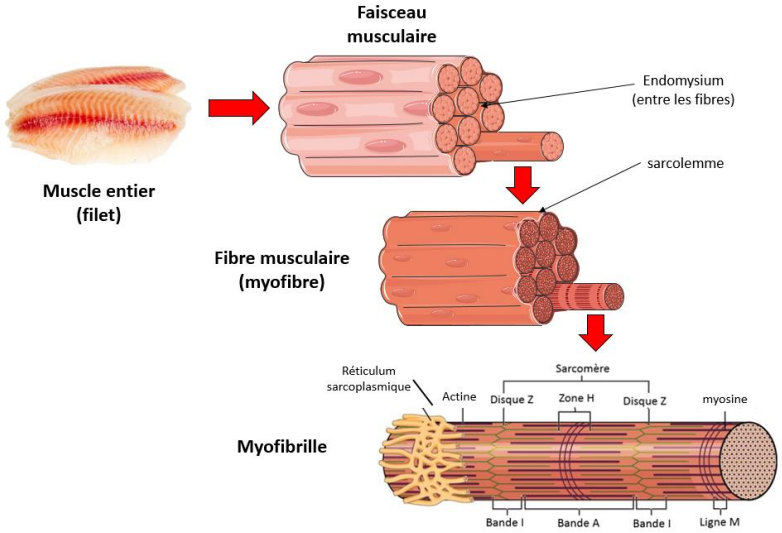


Figure 4 : Organisation du muscle squelettique
(d'après des images libres de droit : https://smart.servier.com/)

On y retrouve les structures typiques de la fibre musculaire (Figure 4 ci-dessus), à savoir le

sarcolemme (la membrane qui l'entoure), de nombreux noyaux, mitochondries et myofibrilles. Ces dernières sont composées d'unités juxtaposées appelées sarcomères. Chaque sarcomère est constitué de deux types de filaments : le filament épais, la myosine et le filament mince, l'actine. Les filaments minces d'actine sont liés à l'alpha-actinine, en particulier au niveau des disques Z. Ainsi, les extrémités (+) d'actine sont fixées aux sarcomères tandis que les extrémités (-) vont vers le centre du sarcomère.

. A la frontière entre deux sarcomères, la partie constituée uniquement d'actine est appelée bande I. Dans chaque sarcomère, les filaments d'actine et de myosine vont se chevaucher dans une zone dénommée bande A. Au centre de cette bande A, les filaments d'actine et de myosine ne se croisent plus ; c'est la zone H composée uniquement de myosine. Au centre du sarcomère, se situe la ligne M où sont localisés les filaments de myosine (Figure 4). Le poisson constitue un aliment riche en protéines avec une haute teneur en acides aminés essentiels et en acides gras polyinsaturés. Il possède ainsi une très bonne qualité nutritionnelle (Listrat *et al.*, (2016)).

3. Composition du poisson

La chair de poisson est une matrice constituée à la fois de composants solides et liquides. Les valeurs nutritionnelles constituent un paramètre de la qualité du poisson (Martinez *et al.*, (1997)). Ces dernières dépendent de la composition du poisson. Par conséquent, la connaissance de la structure est primordiale pour comprendre les changements de qualité du poisson. La composition du poisson varie grandement selon l'espèce, le sexe, l'âge et les conditions physiologiques. En général, les principaux composants d'un poisson sont : l'eau, les protéines, les lipides, les glucides, les minéraux et les vitamines (Liu *et al.*, (2013)). Le muscle contient également de la myoglobine et il est donc riche en fer (hème) qui est facilement assimilé par l'organisme (Listrat *et al.*, (2016)). La chair de poisson est également connue comme étant une source importante d'acides gras, d'acides aminés essentiels, de minéraux et des vitamines A, E et B.

Apres la mort de l'organisme, des changements biochimiques vont s'opérer et ceci même en cas de conservation à basse température. Ces changements vont avoir un impact sur la qualité sensorielle mais également sur la texture, le goût et l'odeur et *in fine* sur la fraîcheur.

B. *Les différentes phases d'altération biochimique du poisson* post mortem

1. Les trois phases de la *rigor mortis*

Classiquement, 3 phases sont discriminables *post mortem*. La première phase, *pre rigor*, a lieu dans les premiers instants après la mort. Le muscle est souple, détendu et élastique durant en moyenne 1 à 6 heures. Suivant l'espèce, les conditions de l'abattage et la température de conservation, intervient ensuite la deuxième phase : la *rigor mortis*. Durant ce stade, le muscle est tendu, dur et en contraction. Cet état de rigidité cadavérique dure en moyenne 24 heures ou plus selon l'espèce de poisson. La dernière phase, *post rigor*, apparaît ensuite. Le muscle redevient souple mais perd en élasticité par rapport à l'état de *pre rigor*. Il est conseillé habituellement de fileter le poisson soit en phase de *pre rigor* ou *post rigor*, la chair étant plus souple. En *rigor mortis*, le filetage est plus dur et peut engendrer des cassures ou déchirures du filet. De même, il est conseillé de cuire et consommer la chair de poisson une fois l'étape de *rigor mortis* finie. En effet, lorsqu'on cuit le filet à l'étape de *pre rigor*, la texture de la chair est molle et pâteuse. A l'étape de *rigor mortis*, elle devient dure mais pas sèche. Immédiatement après la mort, le muscle du poisson est souple et élastique. (Huss, (1999)). Ces étapes s'expliquent d'un point de vue biochimique. En effet, deux types d'altération vont se dérouler *post mortem* : l'altération autolytique endogène et l'altération bactérienne (Abbas *et al.*, (2009)).

Ces travaux de thèse ont pour but d'étudier des marqueurs moléculaires précoces de fraîcheur, autrement dit les changements de la physiologie cellulaire durant les premiers jours de conservation du filet de poisson. Par conséquent, ce chapitre décrira plus particulièrement les mécanismes connus de l'altération autolytique qui se déroulent durant les premiers jours de conservation *post mortem* du poisson.

2. Altération autolytique

Lorsque le poisson est vivant, celui-ci produit l'énergie nécessaire au fonctionnement de son organisme grâce à deux éléments essentiels : l'oxygène et le glucose. Le glucose est apporté par l'alimentation et l'oxygène par les branchies. Il existe deux voies possibles pour synthétiser la molécule riche en énergie qu'est l'adénosine triphosphate (ATP) par conversion de l'ADP : une voie aérobie et une voie anaérobie. L'étape anaérobie se déroule uniquement dans le cytosol des cellules. Le catabolisme du pyruvate et le cycle de Krebs sont impossibles. Toutefois, le glucose est transformé en pyruvate par une série de réactions en chaîne. Cette transformation appelée glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhoff permet la synthèse de pyruvate, de deux molécules d'ATP et de deux molécules de NADH, H^+. Le pyruvate est

ensuite transformé en lactate nécessitant un NADH, H^+. Le rendement de la glycolyse anaérobie et donc du métabolisme anaérobie est faible car la dégradation d'une molécule de glucose en anaérobie génère seulement deux molécules d'ATP. Par contre, en condition aérobie, le pyruvate produit alimente le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs, (1970)) s'effectuant dans la matrice mitochondriale. L'ensemble des molécules produites dans le cycle de Krebs va ensuite participer à la chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative. Cette dernière va permettre la synthèse de trente-six molécules d'ATP, mais aussi d'eau et de dioxyde de carbone (Figure 5 ci-dessous). Le rendement du métabolisme aérobie est donc beaucoup plus important que le métabolisme anaérobie (36 ATP contre 2 ATP).

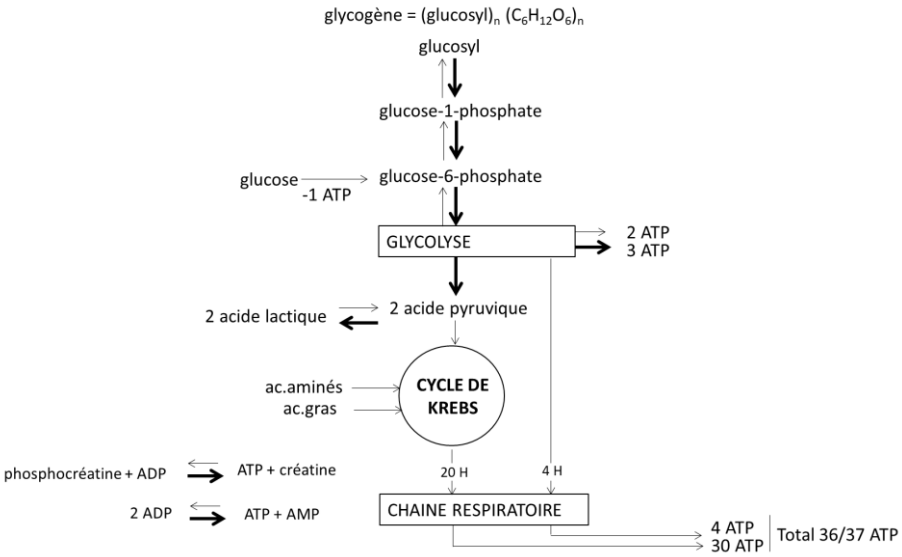


Figure 5 : Réactions de synthèse de l'ATP.
Les flèches en noir gras indiquent les réactions qui subsistent après la mort de l'organisme
(d'après Monin, (1988))

A la mort de l'organisme, il n'y a plus d'apport en oxygène et nutriments. Les seules voies possibles pour produire de l'énergie en condition anaérobie sont la dégradation du glycogène (glycolyse anaérobie), la réduction de la créatine-phosphate et la phosphorylation de l'ADP (Pawar et Magar, (1965)). Etant donné le rendement faible de ces trois voies et le non renouvellement du stock de glycogène, les ressources en ATP vont diminuer rapidement (10 mmoles/g à 1 mmole/g de tissu (Huss, (1999)) voire 1 à 2 µmol/g de tissu (Iwamato *et al.*, (1988)). L'organisme entre ensuite en *rigor mortis*. Un poisson fatigué et mal nourri rentrera plus rapidement en phase de *rigor mortis*. Les filaments d'actine et de myosine vont s'interconnecter irréversiblement et former l'actomyosine inextensible (Adelstein et Eisenberg, (1980)). Le mécanisme qui aboutit à la fin de la *rigor mortis* est encore mal connu et reste à explorer. Toutefois, les cathepsines et les calpaïnes semblent jouer un rôle dans la fin de la *rigor mortis* en dégradant des protéines de fibres musculaires telles que l'actine et la

myosine (Ladrat *et al.*, (2003), Ayala *et al.*, (2010), Ahmed *et al.*, (2015)). L'accumulation de lactate *post mortem* due à la glycolyse anaérobie va provoquer une acidification du muscle et engendrer par la même occasion une diminution de la valeur du pH. Toutefois, cette diminution de pH reste faible chez le poisson étant donné les plus faibles quantités de glycogène présentes par rapport aux mammifères (Huss, (1995)).

En phase de *pre rigor*, l'ATP va subir une série de dégradation par les ATPases. L'activité de ces dernières est augmentée par un milieu acide (baisse du pH) et une forte concentration de calcium dans le milieu intracellulaire. L'ATP va être successivement dégradée en adénosine diphosphate (ADP), adénosine monophosphate (AMP), inosine monophosphate (IMP), inosine (Ino) et hypoxanthine (Hx). L'Hypoxanthine est ensuite dégradée en xanthine et acide urique. La dégradation de l'ATP en IMP est très rapide et elle est classiquement attribuée aux enzymes endogènes du muscle. La synthèse de l'hypoxanthine à partir de l'IMP est, quant à elle, plus longue et elle est attribuée aux bactéries (Surette *et al.*, (1988)). Toutefois, en condition stérile, il a été montré que la dégradation de l'IMP était identique (Uchiyama et Ehira, (1974), Tejada, (2009)). La vitesse de dégradation des divers catabolites de l'ATP dépend fortement de l'espèce de poisson. Le déclin de l'ATP va participer à l'inhibition des pompes calciques. Ceci va engendrer une perturbation de l'homéostasie du calcium provoquant une forte accumulation du calcium dans le sarcoplasme. Dans les conditions d'ischémie-reperfusion, il a été démontré que la perte de l'homéostasie du calcium joue un rôle important dans les lésions cellulaires (Dong *et al.*, (2006)). Or, après la mort, la cellule se retrouve dans des conditions semblables à l'ischémie. Par conséquent, les mécanismes observés en ischémie peuvent être semblables à ceux retrouvées *post mortem* dans une cellule musculaire de filet de poisson. L'altération autolytique implique également des enzymes protéolytiques telles que les cathepsines, les calpaïnes, les oxydes de triméthylamine (OTMA) déméthylases et les collagénases. L'activité des calpaïnes et des cathepsines sont dépendantes des concentrations de calcium sarcoplasmique. Les fortes concentrations de calcium sarcoplasmique *post mortem* vont participer à l'activation des protéases calpaïnes et cathespines. La cathepsine L, en particulier, est connue pour digérer les protéines myofibrillaires (actomysine) et le tissu conjonctif (Huss, (1999)). Ceci engendre une dégradation du tissu et son relâchement. Les calpaïnes sont responsables de la digestion des protéines z des myofibrilles. Les calpaïnes de poisson sont également connues pour dégrader la myosine (particulièrement les hélices alpha des chaînes longues de myosine) à basse température. Les collagénases, quant à elles, sont impliquées dans la destruction du myotome

durant un stockage de longue durée sous glace contribuant ainsi à une déchirure du filet (Hernández-Herrero *et al.*, (2003)). L'OTMA déméthylase dégrade l'oxyde de triméthylamine (OTMA) en diméthylamine (DMA) et formaldéhyde. Ce dernier est responsable d'un durcissement de la chair et d'une perte de rétention d'eau (Gill *et al.*, (1979)). La perturbation de l'homéostasie ionique (augmentation du calcium sarcoplasmique) et l'acidification du muscle vont également participer à l'altération des organites tels que les mitochondries, les lysosomes et le réticulum sarcoplasmique. L'altération de ces organites va mener à leur lyse et par conséquent à la libération d'ions (calcium par exemple) et de molécules qui vont participer à la lyse cellulaire (Ahmed *et al.*, (2015)). Par exemple, dans le cas des mitochondries, tout comme dans les mécanismes d'ischémie, le calcium sarcoplasmique, en excès, va intégrer la matrice mitochondriale.

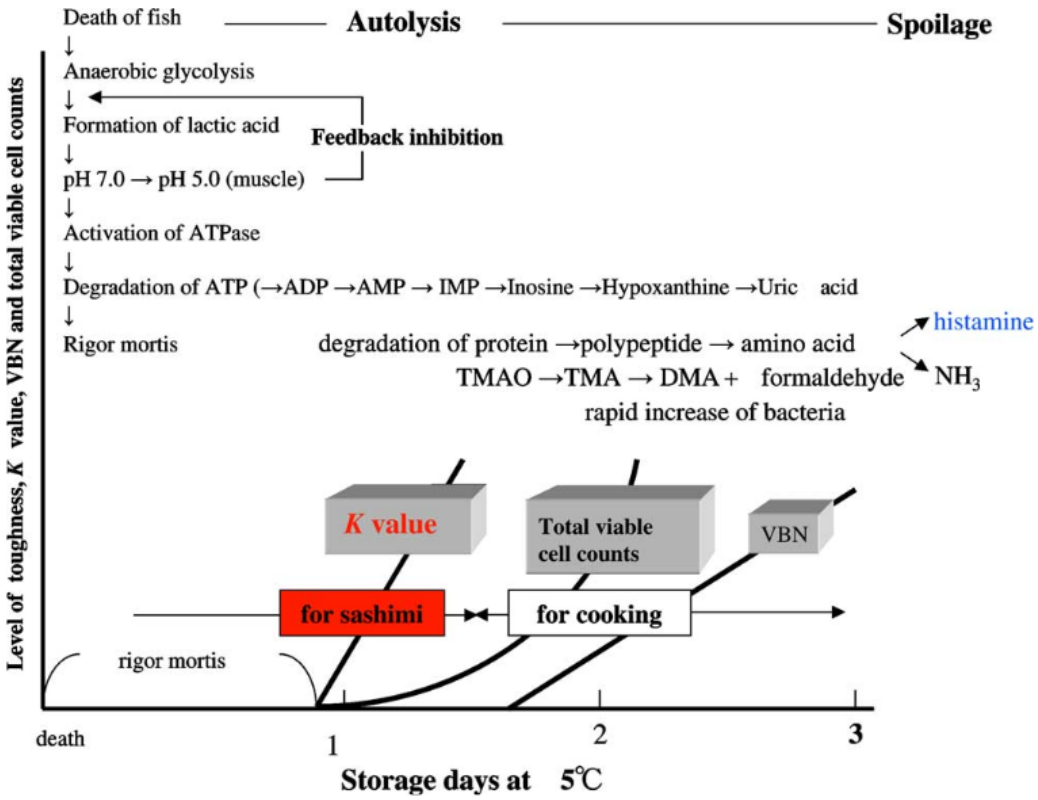


Figure 6 : Schéma résumant les changements *post mortem* dans la chair de poisson (d'après Hamada-Sato *et al.*, (2005))

Il perturbe ainsi les fonctions et l'intégrité mitochondriales en engendrant une perméabilisation des membranes aboutissant au gonflement des mitochondries. Ceci provoque la libération, dans le sarcoplasme, de facteurs induisant la mort cellulaire et d'ions calcium en excès (Dong *et al.*, (2006)). Autre exemple, l'altération des membranes lysosomiques, due à l'acidification du milieu, va induire une augmentation de la libération de cathepsines dans le cytosol (Dutson, (1983)). Chez la daurade royale, la mitochondrie et le réticulum

sarcoplasmique présentent un aspect gonflé au bout de 3 heures *post mortem*. A 24 heures, les crêtes mitochondriales sont altérées. Après 5 jours, les mitochondries ont des crêtes plus allongées et une matrice à l'aspect blanchâtre et clairsemé. Le réticulum présente de petits cristaux à la périphérie et des vacuoles autophagiques sont visibles (Ayala *et al.*, (2010)). Ces changements sont également observables chez le bar commun 3 heures *post mortem* (Ayala *et al.*, (2005)). Pour le thon rouge (*Thunnus thunnus*), après 5 jours de conservation à 4°C, les mitochondries sont gonflées, les crêtes ont disparu et la structure générale est altérée (Roy *et al.*, (2012)).

L'ensemble des réactions d'autolyse *post mortem* dans la cellule musculaire de poisson est schématisé par la Figure 6 page 46 et la Figure 7 ci-dessous. La phase d'altération du muscle de poisson imputée à l'activité bactérienne va ensuite succéder aux altérations autolytiques.

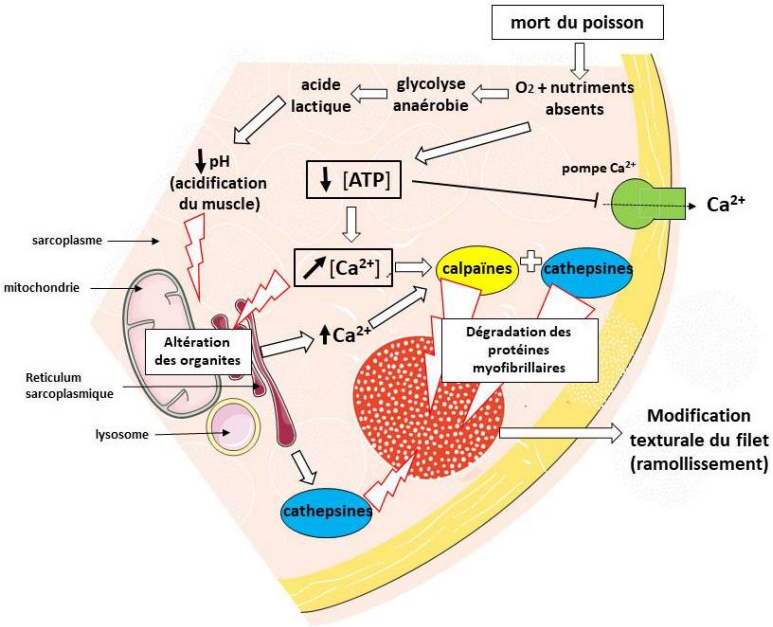


Figure 7 : Du changement biochimique aux changements structural et textural *post mortem* dans une cellule musculaire de filet de poisson
(d'après des images libres de droit)

C. *Altération bactériologique du poisson* post mortem

1. Origine et évolution de la flore bactérienne

Une flore bactérienne est naturellement présente dans toute espèce de poisson. La nature de la microflore va dépendre grandement de l'environnement du poisson : type, qualité, température de l'eau et sa teneur en sel (Shewan, (1977), Feldhusen, (2000)). La chair de poisson est naturellement dépourvue de microflore car elle est protégée par son système immunitaire. A la mort de celui-ci, le système immunitaire n'étant plus actif, une microflore s'installe dans la chair. Lors d'une conservation sur glace, la flore bactérienne double chaque

jour (Huss, (1999)). Chaque espèce de poisson possède sa propre microflore dominante. Après la mort, des bactéries spécifiques vont participer à l'altération (Figure 8 ci-dessous). Cette population de bactéries va dépendre des conditions d'entreposage : température (entre 0°C et 2°C), atmosphère (aérobie, anaérobie) (Huss, (1994)). Pour une conservation sous glace en anaérobiose, *Pseudomonas spp.* et *Shewanella putrefaciens* sont presque exclusivement présents après 1 à 2 semaines (Huss, (1999)). Les microorganismes responsables de l'altération *post mortem* du poisson les plus courants sont : *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas spp.*, *Enterococci*, Enterobacteriaceae et *Brochothrix thermospacta*.

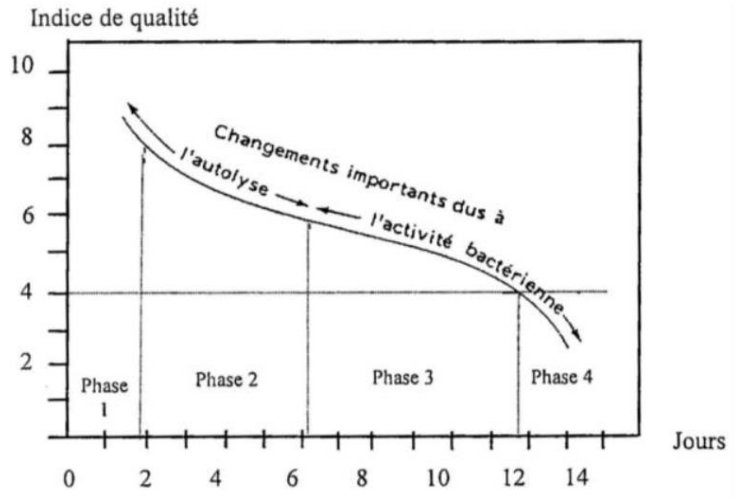


Figure 8 : Les différentes phases de l'altération du poisson.
Les données exposées ici en exemple sont attribuables à du cabillaud conservé sur glace à 0°C (Huss et Asenjo, (1976))

2. Activité biochimique liée à la flore bactérienne

L'activité de la flore bactérienne va être à l'origine de la formation de divers composés : des composés azotés ou soufrés volatiles, des aldéhydes, des esters, de l'hypoxanthine et d'autres composés de faible poids moléculaire. Les bactéries vont utiliser, comme substrats de leur métabolisme, des nucléotides, des acides aminés et des glucides. L'OTMA est naturellement dégradé par des enzymes endogènes mais il est aussi utilisé par plusieurs bactéries d'altération comme accepteur final d'électrons dans leur chaîne respiratoire. La réduction de l'OTMA génère la formation de triméthylamine (TMA) qui est responsable de l'odeur caractéristique du poisson altéré. La TMA constitue une part importante des azotes basiques volatils totaux (ABVT). D'un point de vue général, la prolifération des bactéries d'altération va avoir un impact non négligeable sur le goût et l'odeur du poisson.

Les conditions *post mortem* dans la cellule musculaire impliquent des réactions biochimiques qui vont induire des changements structuraux et ultra-structuraux tels que l'altération des organites et des myofibrilles. Ces changements structuraux vont être à l'origine de changements texturaux. Or certains aspects de la texture comme la dureté, la « fracturabilité », la « cohésivité », la « mâche » sont directement en lien avec la qualité d'un produit pour l'industriel et le consommateur.

D. Evolution structurale post mortem *chez le poisson*

L'évolution de la microscopie a permis d'étudier les changements structuraux et ultra-structuraux *post mortem* du poisson. Ces derniers sont directement en relation avec la fraîcheur du produit. Idéalement, un poisson ultra-frais, voire frais conserve sa structure initiale alors qu'un poisson altéré présente de nombreuses lésions et dommages de celle-ci. Le filet étant en général la partie consommée chez le poisson, bon nombre d'études se sont intéressées à son évolution structurale *post mortem* (Ayala *et al.*, (2005), Ayala *et al.*, (2010), Ayala *et al.*, (2011)). Pour comprendre ces changements il faut d'abord connaître l'organisation des cellules du muscle (Figure 4 page 41).

Chez la daurade royale, notre modèle d'étude, plusieurs changements de la structure du muscle ont pu être observés *post mortem* dans le cadre d'une conservation à 4°C (Caballero *et al.*, (2009), Ayala *et al.*, (2010), Ayala *et al.*, (2011)). Ces changements structuraux interviennent très tôt après la mort du poisson. A partir de 4 jours de conservation (4°C), l'espace entre les fibres musculaires augmente. Le myocomme et le myotome se désolidarisent, dû à une perte de collagène (Caballero *et al.*, (2009)). Les fibres musculaires se détachent progressivement du sarcolemme et de l'endomysium. Les myofibrilles se dégradent avec une perte des bandes I, des lignes Z et des filaments d'actine (Ayala *et al.*, (2010)). Chez le thon rouge, Roy *et al.*, (2012) ont observé après 5 jours de conservation à 4°C des modifications structurales identiques à la daurade royale, notamment le détachement du sarcolemme, l'augmentation de l'espace inter-myofibrillaire, le détachement fibre musculaire-myofibrille, la cémentation des myofibrilles, la discontinuité et la baisse de la densité des lignes Z. Le début de ces changements est également visible dans la musculature épiaxiale chez le bar commun 3 heures *post mortem* (Ayala *et al.*, (2005)), ce qui témoigne de la précocité des changements structuraux.

Toutes ces observations structurales sont en corrélation avec des modifications texturales du poisson : diminution de la fermeté du filet (Caballero *et al.*, (2009)) mais également une

baisse de la tenue en bouche et de l'adhérence. Cependant il n'y a pas de changements de l'élasticité et de la cohésivité (Ayala *et al.*, (2011)).

Une diminution rapide de la dystrophine (protéine assurant un lien entre les myofilaments d'actine du cytosquelette et la matrice extracellulaire), à partir de 1 à 2 jours de conservation, expliquerait les changements structuraux (Taylor *et al.*, (1995), Caballero *et al.*, (2009)) et les changements texturaux qui en découlent. L'actine et la desmine (protéine assurant un lien entre les myofilaments au niveau des disques Z) restent présentes malgré l'état avancé d'altération du muscle de bar commun à 14 jours (Caballero *et al.*, (2009)). Pourtant, Verrez-Bagnis *et al.*, (1999) ont observé une dégradation de la desmine chez la même espèce dans les premiers jours *post mortem*. Les protéines myofibrillaires telles que la titine, la nébuline et la troponine T impliquées dans l'organisation, la géométrie du cytosquelette et la contraction musculaire sont dégradées *post mortem* dans le muscle de poisson (Busconi *et al.*, (1989)). Leur dégradation combinée contribue significativement à la fragmentation des myofibrilles et *in fine* aux modifications texturales de la chair de poisson (Verrez-Bagnis, (1997)).

La protéolyse de ces molécules myofibrillaires est imputée aux enzymes endogènes que sont les calpaïnes et les cathepsines (Delbarre-Ladrat *et al.*, (2006); Chéret *et al.*, (2007)). L'activité des µ-calpaïnes et m-calpaïnes et de leurs inhibiteurs, les calpastatines, est encore présente 14 jours *post mortem* chez la daurade royale (Caballero *et al.*, (2009)). Les calpaïnes causent une hydrolyse limitée des myofibrilles durant les premiers jours alors que les cathepsines, en plus de leur capacité à dégrader ces myofibrilles et protéines associées, altèrent l'actine et la myosine à des stades plus avancés *post mortem*. De plus, la protéolyse des myofibrilles *post mortem* participe au relargage de polypeptides et d'oligopeptides dont certains ont des propriétés bioactives (Ahmed *et al.*, (2015)).Le poisson subit *post mortem* des changements au niveau de sa structure, de sa texture et de sa composition chimique et microbiologique. Par conséquent, l'ensemble des méthodes développées pour évaluer la qualité du poisson s'est basé sur ces changements *post mortem*.

III. Les techniques actuelles d'analyses du poisson

A. Méthodes sensorielles

Le test QIM, le système de notation issu de l'Union européenne et le « Torry scheme » ont été spécialement développés pour le poisson.

1. Le système de notation issue de l'Union Européenne

Le système de notation de qualité mis en place par l'Union européenne en 1996 (Règlement CE 2406, (1996)) définit des normes de commercialisation communes pour certains produits aquatiques : les poissons blancs, les poissons bleus, les sélaciens (élasmobranches), les céphalopodes et les crustacés. Le produit analysé est classé dans une catégorie selon sa fraîcheur : E (extra), A et B. Le produit est non admis si ses caractéristiques ne lui permettent pas d'intégrer une de ces trois catégories. Ce classement est effectué après évaluation de la peau, des branchies, du mucus cutané, de la texture et de l'odeur de la chair. Cette méthode requiert des personnels avec une formation spécifique. Elle ne prend pas en compte les spécificités intra-espèces et les trois catégories sont trop larges et définies grossièrement. De plus, les trois catégories ne font pas le lien avec le temps de conservation sur glace comme le système QIM. Malgré cela, cette échelle est toujours utilisée.

2. Quality Index Method (QIM)

La « Quality Index Method » souvent abrégé QIM a été développée par la Tasmanian Food Research Unit (Bremner, (1985)). Cette méthode a été élaborée pour évaluer la fraîcheur de produits aquatiques stockés à 4°C sur glace. Elle se base sur les changements de caractéristiques tels que l'apparence (yeux, peau, branchies), l'odeur et la texture. Pour chaque paramètre évalué, un score est établi. L'addition de chaque score de chaque paramètre aboutit à un score total appelé le QIM. Plus le score est élevé, plus le produit analysé est considéré dégradé (Tableau VI page 52).

La méthode a initialement été conçue pour des poissons entiers non traités. Toutefois, une adaptation de cette méthode pour des produits bruts, congelés et décongelés a été élaborée. Du fait de la variabilité des espèces et de leur spécificité, il est possible de retrouver dans la littérature des QIM développés spécifiquement pour une espèce. Par exemple, un QIM spécifique a été établi pour notre modèle d'étude, la daurade royale (Huidobro *et al.*, (2000)) (Figure 9 page 52). La valeur de l'index de qualité augmente de façon linéaire avec le temps de conservation (jours sur la glace). Il est donc possible d'estimer à partir du score le temps d'entreposage. Les avantages de la QIM sont : la rapidité, la facilité, l'aspect non destructif et l'objectivité en comparaison avec d'autres méthodes. En contrepartie, les inconvénients sont le caractère chronophage et la nécessité d'avoir le poisson entier pour établir le score total.

Tableau VI : Paramètres analysés et attributs donnés chez la daurade royale dans le cadre d'un test QIM (d'après Huidobro *et al.*, (2000))

Paramètres		Attributs	Points d'inaptitude
Apparence			
	Peau	Très brillant	0
		Brillant	1
		Terne	2
	Viscosité	Clair, transparent	0
		Légèrement trouble/trouble	1
Chair			
	Elasticité	Elastique	0
		Marquage à la pression	1
Odeur			
		Frais	0
		Neutre	1
		Odeur de poisson	2
		Emanation d'odeurs	3
Yeux	Clarté	Clair, translucide	0
		Légèrement opaque	1
		Opaque, sanglant	2
	Forme	Convexe	0
		Plat	1
		Concave	2
Branchies	Couleur	Brillant/rouge foncé	0
		Rouge brunâtre/décoloré	1
	Odeur	Frais/odeur d'algues	0
		Neutre	1
		Odeur de poisson	2
		Emanation d'odeurs	3
Total maximum de points d'inaptitude			***15***

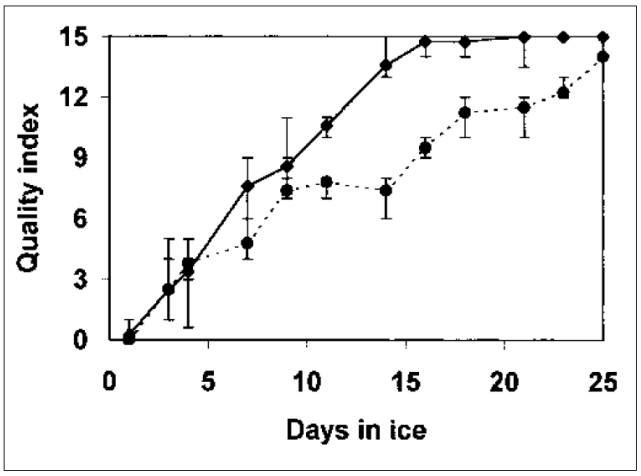


Fig. 2—Quality index for raw chilled gilthead seabream. ◆ = unwashed; ● = daily washed with tap water

Figure 9 : Evolution du score de la QIM pour la daurade royale en fonction de la durée de stockage. Dans cette étude, deux conditions sont suivies : (♦) daurades royales non lavées et (●) daurades royales lavées avec l'eau courante (Huidobro *et al.*, (2000))

3. L'échelle de Torry

L'échelle de Torry a été développée pour évaluer la fraîcheur du poisson après cuisson sans ajout de sel ou d'épices. Cette méthode évalue l'odeur, le goût et la texture du produit. Une note allant jusqu'à 10 est attribuée. Plus la note est élevée, plus le produit est considéré frais. Pour une note inférieure à 3, le poisson est considéré non acceptable à la consommation humaine. Pour une note supérieure ou égale à 5,5, le produit est classé consommable. L'échelle a été développée pour les trois types de poisson évoqués précédemment : maigres, mi- gras et gras.

B. Méthodes chimiques et microbiologiques

1. L'azote basique volatil total (ABVT)

Les amines volatiles sont responsables de l'odeur caractéristique ressentie chez les produits de la mer dégradés. Le consommateur y est très sensible et considère cette odeur comme un indice important de fraîcheur ou plutôt d'altération. Les principales amines sont l'ammoniac, la TriMéthylAmine (TMA), la DiMéthylAmine (DMA), l'Oxyde de TriMéthylAmine (OTMA) qui est la source principale de DMA et de TMA. Tous ces composés vont faire partie de l'azote basique volatil total (ABVT). Ces composés apparaissent suite à l'hydrolyse des protéines par les bactéries ou les enzymes présentes dans le poisson *post mortem*.

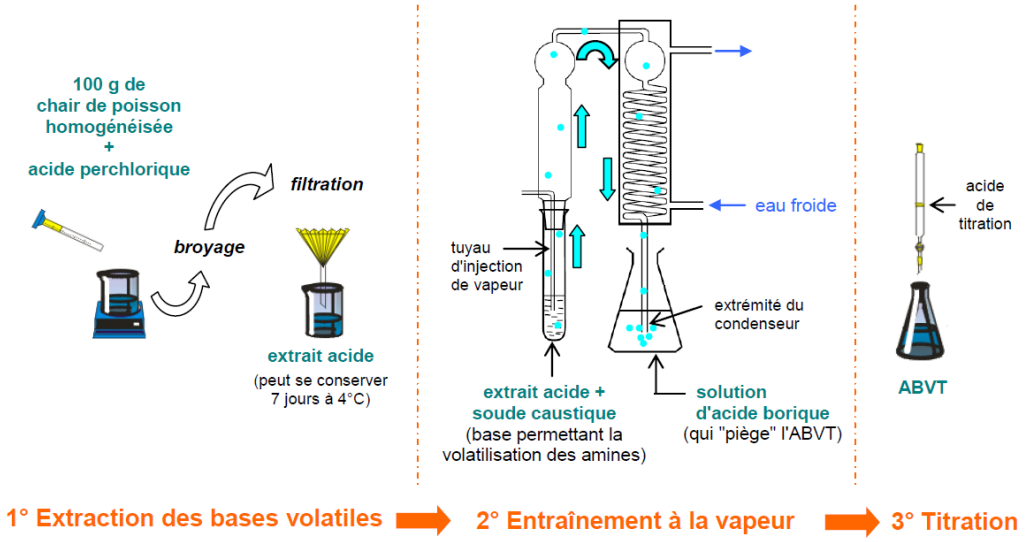


Figure 10 : Schématisation du protocole d'extraction des ABVT et de leur titration (fiche Bibliomer : Ifremer et Pôle Aquimer, (2008))

Ainsi, ces composés se retrouvent en faibles quantités durant les premiers jours de conservation puis augmentent de façon exponentielle. La mesure des teneurs en ABVT et TMA est l'une des principales méthodes utilisées par les laboratoires de contrôle pour

l'évaluation de la qualité des produits aquatiques. Les concentrations en ABVT/TMA sont exprimées en mg pour 100 grammes de chair. Il est à noter que la mesure de l'ABVT/TMA n'est pas un indicateur de fraîcheur mais d'altération du poisson étant donné les augmentations significatives tardives de ces teneurs (à partir de 8 jours de conservation).

Pour l'espèce bar commun, la mesure de l'ABVT est un très mauvais indicateur de fraîcheur. Après 20 jours de stockage à 4°C, aucune différence significative en ABVT n'a été observée (Castro et al., (2006), Parlapani *et al.*, (2014)). Seule la DMA peut servir d'indice de fraîcheur car elle évolue rapidement durant les premiers jours de stockage. Il faut toutefois que le poisson possède l'enzyme TMAOase qui dégrade l'OTMA en DMA. L'Union européenne a établi trois catégories pour classer les différentes méthodes de poissons analysés. Dans chaque catégorie, il est défini une valeur à ne pas dépasser en azote total. Ces trois méthodes sont applicables pour évaluer l'ABVT : une distillation directe (Antonacopoulos et Vyncke, (1989)), la méthode de microdiffusion (Conway et Byrne, (1933)) et la distillation d'un échantillon préalablement déprotéinisé par l'acide trichloracétique (voir Figure 10 page 53).

2. Les amines biogènes

Les amines biogènes apparaissent *post mortem* suite à la décarboxylation (perte de dioxyde de carbone) d'acides aminés spécifiques dans les tissus (Santos, (1996)). Cette réaction est provoquée principalement par des enzymes exogènes provenant de microorganismes contaminants et également par des décarboxylases endogènes. Ces amines biogènes sont : la putrescine, la cadavérine, l'histamine, la tyramine ou encore la spermine et la spermidine. Lors d'une conservation à 4°C, les concentrations en amines biogènes évoluent lentement, ce qui en fait un marqueur de fraîcheur peu fiable.

3. La valeur K

L'évaluation de la fraîcheur par la valeur K fut proposée par Saito, (1959). La valeur K est exprimée en pourcentage par la formule suivante :

$$K\ value\ (\%) = \frac{Ino + Hx}{(ATP + ADP + AMP + Ino + Hx)} X\ 100$$

À la mort du poisson, les enzymes endogènes vont dégrader la molécule Adénosine TriPhosphate (ATP) en ADP qui va être à son tour dégradée successivement en AMP puis IMP. On considère ensuite que la dégradation de l'IMP en Inosine (Ino) et Hypoxhanthine (Hx) est due aux enzymes endogènes et exogènes provenant des bactéries d'altération. L'augmentation du facteur K est détectée de façon précoce, la valeur maximale et le taux d'augmentation restent stables pour bon nombres d'espèces. De plus, il y a une bonne

corrélation avec les évaluations sensorielles pour de nombreuses espèces (Tejada, (2009)). Toutefois, la valeur K présente quelques inconvénients car c'est une méthode destructive qui nécessite l'analyse complète des catabolites et ne reflète pas à 100 % les quantités présentes dans la matière première. De plus, cette méthode est influencée grandement par l'espèce, la température de stockage et les ruptures physiques des tissus (Henehan *et al.*, (1997), Howgate, (2006)).

4. Le potentiel Hydrogène (pH)

Une mesure du potentiel hydrogène (pH) à partir d'un broyat homogène de chair de poisson ou directement avec une électrode de pH dans le muscle est réalisable pour l'évaluation de la qualité d'un produit aquatique (Abbas *et al.*, (2008)). Toutefois, la grande majorité des études fait état d'un changement beaucoup trop faible durant le stockage au frais pour en faire un marqueur fiable de fraîcheur du poisson.

5. Méthodes microbiologiques

Le dénombrement de la flore totale et de certains types de bactéries caractéristiques de l'altération permettent d'évaluer la fraîcheur du poisson. La croissance des organismes responsables de l'altération du poisson *post mortem* dépend des conditions d'entreposage (température) et du packaging (atmosphère modifié ou non) (Kuuliala *et al.*, (2018)). Dans le cas d'un stockage de poissons sous atmosphère ambiant (air non modifié) dans un espace réfrigéré ou sur lit de glace, les microorganismes du genre *Pseudomonas* et *Shewanella* spp sont communément recherchés comme organismes source d'altération (Gram et Huss, (1996), Gram et Dalgaard, (2002)).

Dans le cadre d'une conservation sous atmosphère modifié et réfrigéré, le genre *Photobacterium phosphoreum* est reconnu comme organisme à rechercher et à étudier (Dalgaard *et al.*, (1997a), Dalgaard *et al.*, (1997b), Gram et Dalgaard, (2002)). Un logiciel dénommé « Seafood Spoilage and Safety Predictor », élaboré par Dalgaard *et al.*, (2002), permet de prédire le niveau d'altération sensorielle de certains produits aquatiques, tels que le poisson, suivant différentes conditions de stockage en fonction de la flore microbienne retrouvée. Les microorganismes présents dans le poisson vont être à l'origine de production d'alcools. Ces molécules chimiques à groupement hydroxyle (OH) constituent des marqueurs d'altération malgré leur augmentation non linéaire au cours du stockage du produit (Duflos *et al.*, (2006), Kuuliala *et al.*, (2018)). Le dénombrement total de la flore a également été utilisé en laboratoire de contrôle pour évaluer l'altération. Toutefois, de nombreux inconvénients

(reproductibilité, manque de spécificité, difficulté à interpréter les résultats) ont démontré son manque de fiabilité (Gibson et Ogden, (1997)).

C. Méthodes physiques

Le poisson va subir des modifications texturales *post mortem* durant les phases de *pre rigor*, *rigor* et post *rigor* mais également au cours des processus de congélation et de cuisson. De nombreuses méthodes instrumentales ont été développées afin d'évaluer les propriétés texturales du poisson dans le but de suivre le niveau de fraîcheur du poisson ou de discriminer un poisson frais d'un poisson décongelé. Ces approches ont l'avantage d'être non destructives et peu coûteuses. Toutefois, la complexité de l'organisation du muscle de poisson et les variabilités inter-espèces rendent difficiles l'application de ces méthodes (Careche et Barroso, (2009)). Les tests et les méthodes utilisés chez le poisson sont : le test de Kramer, le test Warner-Braztler, les tests de compression d'élasticité (Bourne, (2002)), les analyses du profil de texture et les méthodes viscoélastiques (Friedman *et al.*, (1963), Szczesniak, (1963)).

Le test de Kramer est basé sur une cellule de compression de Kramer Shear équipée de lames qui vont pénétrer et cisailler l'échantillon afin de déterminer les paramètres de force maximale.

« Fischtester » et « torrymeter »

Des appareils tels que le fischtetser et le torrymeter permettent de mesurer les propriétés électriques d'un poisson telles que la résistante et la conductivité. Au cours de l'altération, la résistance a tendance à diminuer alors que la conductivité a tendance à augmenter. Ces changements sont dus aux dommages des membranes cellulaires suite à l'action des enzymes autolytiques et des microorganismes. Un relargage du contenu cellulaire dans l'espace intercellulaire conduit à une diminution de la résistance. Après calibration de l'appareil, en fonction de l'espèce, les propriétés électriques mesurées peuvent évaluer avec efficacité les différents critères suivants. Il s'agit de la fraîcheur/altération du produit ou du temps de conservation sur glace ou de la différenciation entre poisson frais et poisson congelé/décongelé. De plus, une excellente corrélation a été établie entre les résultats de la QIM et les mesures électriques (Jason et Richards, (1975)).

1. Méthodes spectroscopiques

a. *Spectroscopie visible et proche infrarouge (VIS/NIR)*

Le principe de la spectroscopie est basé sur l'envoi de lumière dans l'échantillon puis l'analyse de la lumière venant de l'échantillon à différentes longueurs d'onde. Ces dernières

vont de 400 à 700 nm pour le visible (VIS) et de 700 à 2500 nm pour le proche infrarouge (NIR). Le spectre de lumière émis par l'échantillon après exposition à ces différentes longueurs d'onde est analysé. Il existe trois modes de mesures de l'échantillon. La lumière peut traverser l'échantillon, on parle alors de transmission ou transmittance. Quand l'envoi de lumière et l'unité de détection se situent au même endroit et du même côté de l'échantillon, il s'agit de réflexion. Par contre, si l'envoi de lumière et l'unité de détection se situent sur le même côté de l'échantillon mais pas au même endroit, il s'agit d'une « transflection » (Figure 11 ci-dessous). L'ensemble des données récoltées par spectroscopie nécessite l'utilisation d'analyses statistiques multidimensionnelles tels que : l'analyse en composantes principales, la régression des moindres carrés partiels, la méthode douce indépendante d'analogie de classe (SIMCA en anglais). La spectroscopie permet d'évaluer les composés chimiques du poisson avec fiabilité : lipides, protéines, matières grasses (Solberg et Fredriksen, (2001), Adamopoulos et Goula, (2004)). Elle a également été développée pour l'analyse de la fraîcheur du poisson en démontrant des résultats intéressants. Sigernes *et al.*, (1998) furent les premiers à l'utiliser pour des mesures de fraîcheur. Cette méthode présente les avantages d'être rapide, fiable, facile d'utilisation et non destructive. La spectroscopie a démontré également des aptitudes dans l'authentification notamment dans la discrimination du poisson frais / poisson décongelé par des mesures NIR non destructives (Uddin et Okazaki, (2004)).

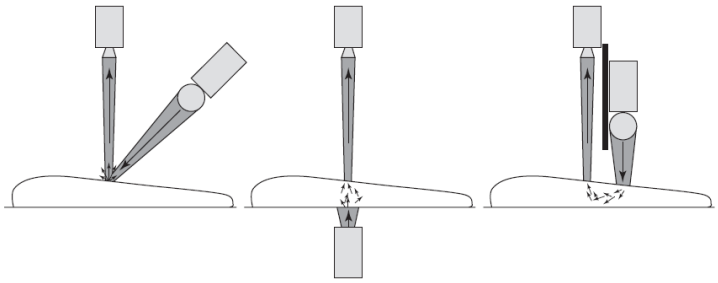


Figure 11 : Les trois modes de mesure de spectroscopie visible et proche infrarouge appliqués à la matrice poisson.
De gauche à droite : la réflexion, la transmission et la transflection.

b. Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence (également appelée fluorimétrie ou sprectrofluorimétrie) est une technique applicable pour l'étude de molécules fluorescentes intrinsèques ou extrinsèques présentes dans un produit tel que le poisson. La fluorescence se définit par l'émission de lumière par une molécule appelée fluorophore qui a absorbé de la lumière ou une autre radiation électromagnétique de haute énergie. Ce principe a été décrit par Jablonski, (1933) (Figure 12 page 58). Trois étapes de la fluorescence d'une molécule sont décrites par Mousdis et Mellou, (2017) : le premier évènement est la rencontre d'un photon avec un électron d'une

molécule fluorophore. Ceci provoque l'excitation de l'électron et permet le passage du niveau d'un état fondamental vers le niveau d'un état électronique excité plus énergétique et plus instable (S1 ou S2).

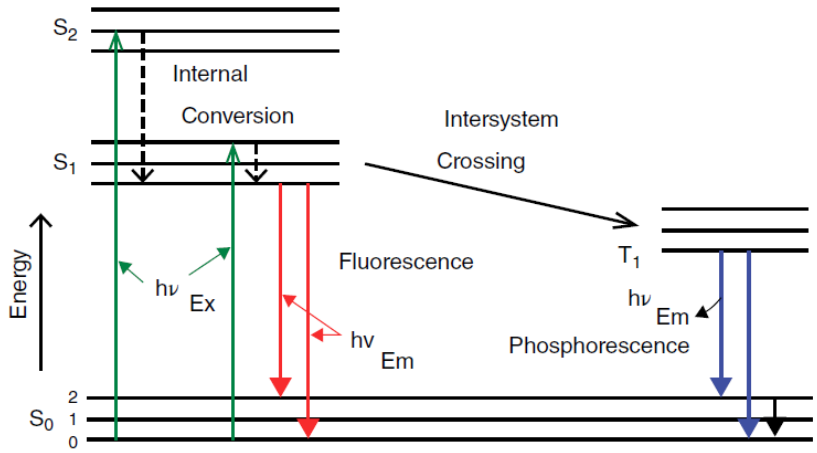


Figure 12 : Diagramme de Jablonski, (1933) illustrant les processus de fluorescence et de phosphorescence (Mousdis et Mellou, (2017))

La molécule ainsi excitée va retourner à un état vibrationnel plus faible et plus stable autrement dit se désexciter et perdre de l'énergie suite à des phénomènes de relaxation vibrationnelle, de « quenching » et de transfert d'énergie. En retournant à un niveau plus faible S0, l'électron va émettre un photon. Etant donné qu'une molécule peut revenir à différents niveaux d'énergie vibrationnelle fondamentale, les photons émis auront différentes fréquences et différentes énergies. De ce fait, l'émission et l'excitation d'une molécule ne produisent pas une seule longueur d'onde. Le rendement quantique Q de fluorescence d'un fluorochrome donné dépend du nombre émis par rapport au nombre de photons absorbés :

$$Q = \frac{nombre\ de\ photons\ émis}{nombre\ de\ photons\ absorbés}$$

Bon nombre de molécules alimentaires présentent des propriétés fluorescentes (Tableau VII ci-dessous).

Tableau VII : Liste de onze fluorophores présents dans l'alimentation
Source : Christensen *et al.*, (2006).

Fluorophore	Excitation λ_{max} (nm)	Emission λ_{max} (nm)
Phénylalanine	258	284
Tyrosine	276	302
Tryptophane	280	357
Vitamine A (rétinol)	346	480
Vitamine B_2 (riboflavine)	270 (382, 448)	518
Vitamine B_6 (pyridoxine)	328	393
Vitamine E (α-tocophérol)	298	326
NADH	344	465
ATP	292	388
Chlorophylle *a*	428	663
Hématoporphyrine	396	614

Le spectrofluoromètre est composé d'une lampe à xénon ou d'un laser comme source lumineuse excitante de l'échantillon à analyser. Cette lumière d'excitation passe à travers un filtre d'excitation puis est focalisée sur l'échantillon. Les photons émis, responsables de la fluorescence, sont collectés de façon perpendiculaire par rapport à la source d'excitation. Il s'agit alors de fluorescence à angle droit. Si les photons émis collectés forment un angle variant entre 30 et 60° par rapport à l'échantillon, il s'agit alors de spectroscopie de fluorescence frontale (Figure 13 ci-dessous). Cette technique a été utilisée pour analyser des aliments tels que le poisson afin de déterminer son niveau de fraîcheur (Dufour *et al.*, (2003), Hassoun et Karoui, (2015)). L'étude de la fluorescence du Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH) et du tryptophane sur des filets de poisson a montré de bons résultats. Des différences de spectres suivant le temps de conservation ont permis d'évaluer la fraîcheur du poisson (Dufour *et al.*, (2003)). Concernant l'authenticité, la spectroscopie de fluorescence permet de discriminer des filets de poisson frais de ceux décongelés. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les spectres d'émission du NADH (Karoui *et al.*, (2006)).

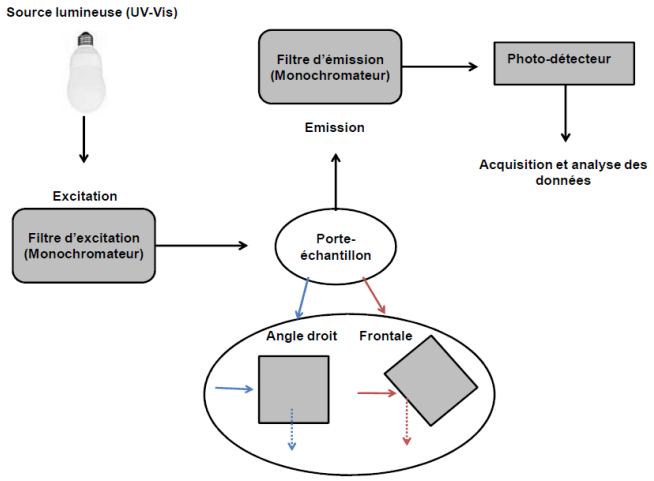


Figure 13 : Schéma présentant le principe de la spectroscopie de fluorescence selon les deux types de méthodes : angle droit ou frontale
(Karoui, (2004))

2. Capteurs électroniques

Les appareils électroniques sont capables de mimer deux sens caractéristiques de l'Homme qui permettent à première vue d'évaluer la fraîcheur d'un produit aquatique tel que le poisson : le goût et l'odorat. Le terme de senseur électronique est aussi employé. Persaud et Dodd, (1982) furent les premiers à démontrer qu'un réseau de capteurs chimiques non sélectifs possédait des propriétés équivalentes à l'olfaction naturelle. Un nez électronique est un appareil possédant des capteurs chimiques non sélectifs couplés à un classificateur multi-composants. Les composés volatils les plus présents dans l'espace de tête dans le cas d'un

poisson stocké sur glace sont : les alcools à chaîne courte, les carbonyles, les esters, la TMA et le sulfure d'hydrogène (Olafsdottir *et al.*, (1997)) (Figure 14 ci-dessous).

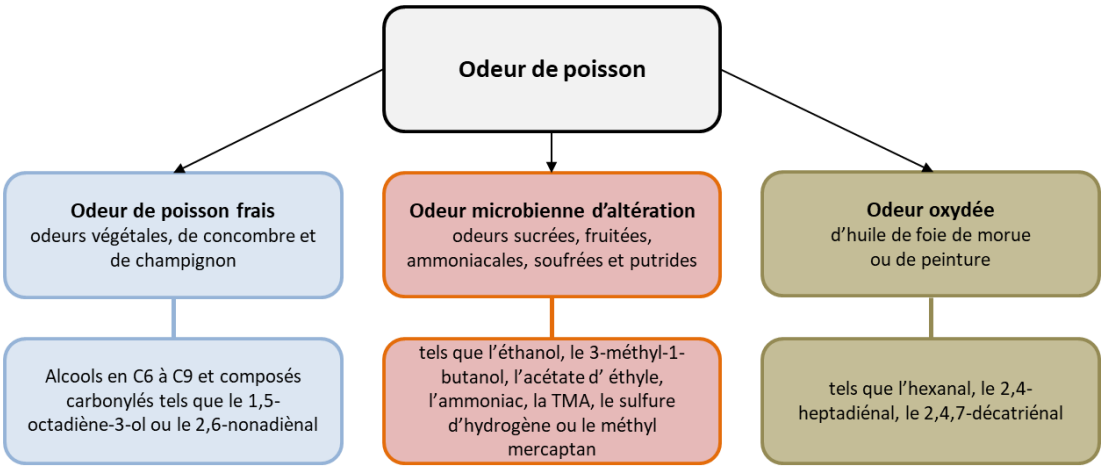


Figure 14 : Odeurs du poisson et des composés volatils contribuant à l'odeur caractéristique du poisson frais, altéré ou oxydé
(d'après Olafsdottir *et al.*, (1997))

Ces composés ont pour origine la croissance microbienne, l'odeur naturelle du poisson et les processus d'oxydation résultant de la dégradation des protéines et des lipides présents dans le poisson (Figure 14 ci-dessus). Le type de composés volatils retrouvés va permettre d'évaluer la qualité du produit. Il est ainsi possible grâce au nez électronique de classifier l'échantillon suivant sa durée de stockage (Di Natale *et al.*, (2001)). Cette technologie a l'avantage d'être basée sur des analyses de courte durée avec un appareil simple d'utilisation et peu encombrant. De plus, les données obtenues montrent une bonne corrélation avec les analyses ABVT mais également avec le score de la QIM. L'appareil semble évaluer un produit de façon équivalente à un nez humain « formé » à la QIM (Olafsdottir *et al.*, (1997)). Toutefois, la sélectivité des capteurs chimiques reste encore faible. Leur sensibilité à l'humidité et autres conditions environnementales peuvent mener à une interprétation erronée. Ceci constitue un problème conséquent pour une application pratique dans l'industrie de la pêche. Les nez électroniques les plus communément rencontrés sont constitués des appareils « FreshSense » et « LibraNose ». Le couplage des données de ces deux appareils permet d'augmenter la fiabilité des données récoltées (Di Natale *et al.*, (2001)).

Tout comme pour le nez électronique, la langue électronique est composée de trois éléments : les capteurs, un système de mesure et un système d'acquisition de données (Ruiz-Rico *et al.*, (2013)). Toutefois, contrairement au nez électronique qui se caractérise par la présence de capteurs en contact avec des vapeurs, la langue électronique possède des capteurs qui sont en contact direct avec le produit analysé.

Notons que l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse (GC en anglais) couplée ou non à la spectrométrie de masse (GC-MS) et ou non à la micro-extraction sur phase solide (SPME) a permis d'étudier l'évolution dynamique des composés volatils chez le poisson stocké au froid (Dehaut, (2014)).

3. Mesure de la coloration

La couleur est la perception visuelle qui résulte de la détection de lumière après son interaction avec un objet. La couleur perçue d'un objet est affecté par trois critères : la composition chimique et physique de l'objet, la composition spectrale de la source lumineuse illuminant l'objet, la sensibilité spectrale de l'œil. Le consommateur est très attentif à la couleur et l'apparence du produit et l'assimile directement à la qualité. Deux catégories d'instruments mesurent photo-électriquement la couleur : le colorimètre trichromatique et les spectrophotomètres. Cette approche a l'avantage d'être peu onéreuse et applicable à bon nombre d'espèces.

4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Trois principaux types de RMN, selon la composition chimique et la structure de la matrice étudiée, sont utilisés : l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la RMN haute résolution et la RMN « low field ». Il est ainsi possible d'obtenir des images d'un poisson entier. La RMN a été utilisée pour évaluer les changements de qualité du poisson après congélation et décongélation (Aursand *et al.*, (2009), Erikson *et al.*, (2012)). La RMN présente les avantages d'être non invasive, non destructive, rapide et inoffensive pour l'opérateur et non polluante. Il est possible de suivre avec la RMN « low field » la mobilité de l'eau et des lipides dans les différents tissus ou compartiments d'un aliment à base de muscle. La RMN « low field » est un investissement peu élevé ne nécessitant pas de maintenance et présentant une certaine facilité d'utilisation, sans pour autant être un appareil de routine. La RMN haute résolution permet de donner une empreinte digitale du produit analysé en informant sur sa composition et permet l'identification et la quantification des métabolites avec pertinence pour la valeur qualitative et nutritionnelle.

IV. La mitochondrie, potentiel marqueur précoce de l'altération ?

A. Généralités sur les mitochondries

1. Histoire

Le mot « mitochondrie » provient de la contraction de « mitos » qui signifie en grec « fil » et de « chondros » qui veut dire « grain ». Les mitochondries sont observées pour la première fois dans des cellules par Altman en 1890, mais il faut attendre la fin du 19ème siècle pour qu'elles soient reconnues comme des organites cellulaires. Leur fonction commencera à être précisée au milieu du 20ème siècle, en montrant leur rôle dans de nombreuses activités cataboliques comme le cycle du citrate (travaux de Krebs, (1970)), la bêta oxydation des acides gras ou la phosphorylation oxydative (travaux de Lehninger). De nouvelles données structurales seront apportées grâce aux premières photomicrographies à haute résolution de Palade, (1952) et Sjöstrand, (1956). Ces travaux ont décrit la mitochondrie comme un organite avec une double membrane: une membrane externe et un réseau de membranes internes encore appelées crêtes mitochondriales. Ils ont démontré que ces membranes délimitent respectivement l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Les travaux de Mitchell, (1961) intègrent à la fois les données métaboliques et structurales en proposant la théorie sur la présence d'un gradient chimio-osmotique dans les mitochondries. Ces travaux ont démontré le rôle central des mitochondries dans la synthèse et le stockage de l'énergie cellulaire (Nobel 1978). Les travaux de Boyer et Walker sur l'ATP synthase viendront compléter le rôle primordial des mitochondries dans l'énergétique cellulaire (Nobel 1998). Depuis ces dix dernières années, la mitochondrie est devenue l'organite cellulaire le plus étudié dépassant ainsi en terme d'articles scientifiques la recherche sur le noyau cellulaire (Picard *et al.*, (2016)). Le rôle de la mitochondrie dans les mécanismes de mort cellulaire (Liu *et al.*, (1996), Petit *et al.*, (1996)) a participé à ce regain d'intérêt pour cet organite.

2. Origine

Wallin, (1926) expose pour la première fois l'origine endosymbiotique des mitochondries. Cette théorie est communément admise de nos jours et a été renforcée par des études génomiques. La recherche actuelle supporte fortement l'idée que l'« ancêtre » de la mitochondrie serait une alphaprotéobactérie, apparentant à l'ordre des rickettsiales, qui aurait intégré un archéon il y a environ 2 milliards d'années (Gray, (2012), Yang, (1985)). Ainsi, outre l'aspect morphologique, des similarités entre mitochondries et bactéries ont été

rapportées. À titre d'exemple, certaines protéines mitochondriales présentent des similitudes avec des toxines bactériennes et peuvent interagir avec leur hôte (Muchmore *et al.*, (1996), Suzuki *et al.*, (2000)).

3. Morphologie, distribution et structure des mitochondries

La morphologie et le nombre de mitochondries varient suivant le type cellulaire et les besoins énergétiques (Mannella, (2008)). Classiquement, les mitochondries ont une forme sphérique ou de type haricot/bâtonnet. Concernant leur taille moyenne, la longueur est de l'ordre de 1 à 2 µm tandis que la largeur est comprise entre 0,1 et 0,5 µm (Frey et Mannella, (2000); Palade, (1952)). Tout comme pour la morphologie, la taille des mitochondries varie selon le type cellulaire. Chez les hépatocytes et les fibroblastes, une mitochondrie peut mesurer de 3 à 4 µm de long et 1 µm de diamètre (Scheffler, (2007)). La Figure 15 ci-dessous illustre la morphologie et l'organisation mitochondriales.

La distribution des mitochondries dans la cellule est liée aux zones de consommation d'énergie. Dans certains types cellulaires comme par exemple l'hépatocyte, les mitochondries sont réparties de façon uniforme et peuvent occuper jusqu'à 25% du volume cytoplasmique. Dans les cellules musculaires, les mitochondries sont disposées principalement entre les myofibrilles. La majorité des mitochondries présente une membrane externe et une membrane interne. Entre ces membranes, est défini un espace inter-membranaire d'une épaisseur de 4 à 7 nm. Les membranes mitochondriales sont composées majoritairement de lipides et de protéines.

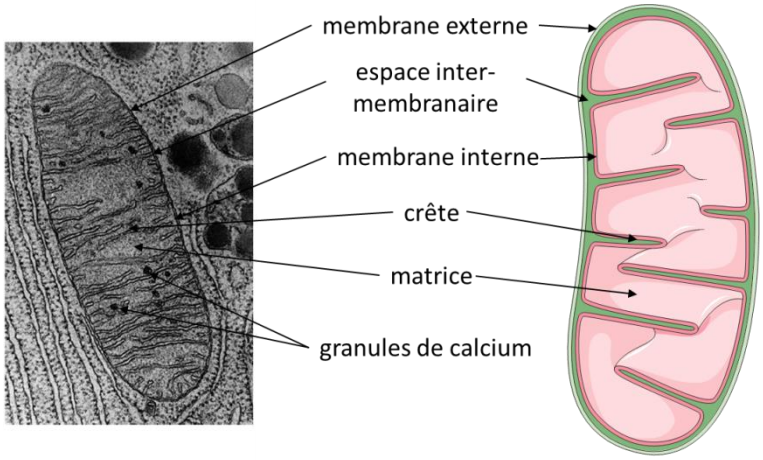


Figure 15 : Morphologie et organisation structurale des mitochondries Scheffler, (2007)

La membrane interne invaginée dans la matrice définit des crêtes dont la forme et le nombre dépendent de l'activité cellulaire et donc du type cellulaire. Leur forme est souvent de type

lamellaire comme dans les cellules musculaires qui ont une haute activité, mais la forme tubulaire se retrouve aussi comme dans les cellules sécrétrices de stéroïdes (Scheffler, (2007)). La matrice mitochondriale renferme des mito-ribosomes, des systèmes enzymatiques et des acides nucléiques tels que de l'ADN circulaire contenant 37 gènes mis en évidence pour la première fois par Nass *et al.*, (1965).

L'ensemble des caractéristiques mitochondriales décrites ci-dessus est retrouvé chez la totalité des organismes eucaryotes. Nos travaux étant axés sur les mitochondries de poisson, nous allons décrire quelques caractères et propriétés propres à cette espèce.

B. Les mitochondries de poisson

1. Morphologie, structure et distribution

Les études menées sur les mitochondries de poisson abordent en grande partie une thématique de type éco-physiologique, éco-toxicologique ou encore génétique. Elles permettent de mettre en évidence des points communs avec d'autres organismes eucaryotes (humains, animaux tétrapodes, etc…).

En effet, les analyses microscopiques de mitochondries de poisson exposées dans la littérature mettent en évidence une structure et une morphologie classique des organismes eucaryotes (Figure 16 ci-dessous). Ces images microscopiques exposent des altérations structurales dans les mitochondries. Toutefois, l'ensemble des caractéristiques types sont discernables : double membrane, matrice, crêtes et forme de type sphérique ou bâtonnet.

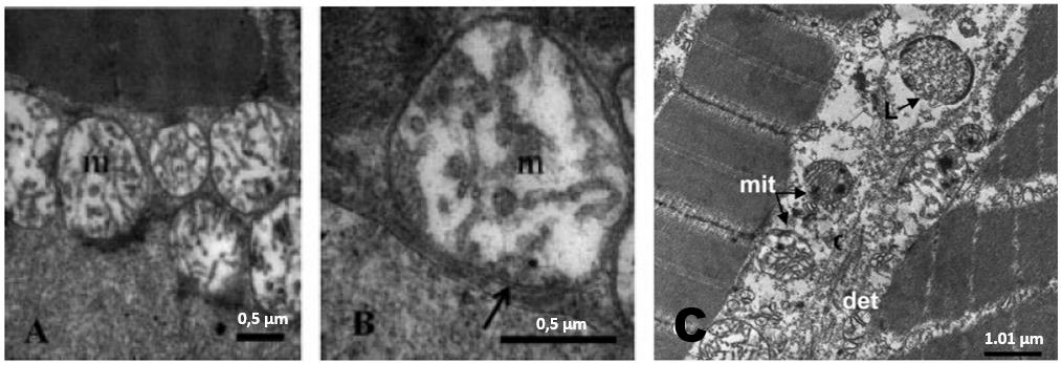


Figure 16 : Images de microscopie électronique à transmission de mitochondries de poisson
A, B : mitochondries de thon rouge du Pacifique (*Thunnus orientalis*) quelques heures *post mortem* (J0) ; C : mitochondrie de daurade royale (*Sparus aurata*) 10 jours *post mortem* (J10). Source : (Ayala et al., (2010), Roy et al., (2012))

Des similitudes ont également été rapportées d'un point de vue génétique. L'ADN mitochondrial du poisson est identique à 70 % à l'ADN humain et comporte le même nombre de gènes.

Les études axées sur les mitochondries ont permis également de mettre en évidence des caractéristiques atypiques des mitochondries de poisson.

Chez toutes les espèces vertébrées, on estime que 30 à 50 % du muscle cardiaque est « occupé » par les mitochondries. Par conséquent, l'activité oxydative y est très forte. En parallèle, le contenu mitochondrial des fibres musculaires squelettiques est compris entre 1 et 10 % chez tous les tétrapodes (Moyes et Hood, (2003), Vock *et al.*, (1996)). Chez le poisson, le contenu mitochondrial est beaucoup plus important et varie grandement selon les types cellulaires. Le nombre de mitochondries est cinq fois plus important dans le muscle rouge que dans le muscle blanc. En conséquence, la densité volumique mitochondriale dans le muscle rouge approche, voire excède celle retrouvée dans le cœur (Conley *et al.*, (1995), Moyes *et al.*, (1998), Moyes et Hood, (2003)). Le muscle rouge constitue ainsi une zone riche en mitochondries. Le foie, le cœur et le cerveau constituent également les principaux foyers de cellules riches en mitochondries. En effet, dans la plupart des études mitochondriales chez le poisson, les mitochondries sont extraites dans ces tissus. Les branchies constituent également une zone comportant des cellules riches en mitochondries (Jürss et Bastrop, (1995), Lin et Sung, (2003)).

La distribution des mitochondries entre les myofibrilles des cellules musculaires de poisson diffèrent considérablement suivant les espèces et leur milieu de vie : on peut ainsi retrouver un réseau de mitochondries autour de myofibrilles disposé sous forme de ruban ou disposé en amas (Johnston *et al.*, (1998)).

Les capacités respiratoires des cellules musculaires peuvent dépendre de plusieurs propriétés : la densité volumique mitochondriale, la densité surfacique des crêtes mitochondriales, la composition en phospholipides et en acides gras insaturés des membranes et le contenu enzymatique mitochondrial (Guderley, (2004)).

2. Modulation des structures et fonctions mitochondriales chez le poisson

Chez le poisson, les fonctions et les structures mitochondriales dépendent de nombreux facteurs tels que : l'âge, l'alimentation, le milieu et le mode de vie du poisson.

a. Influence de l'âge

Le filet de poisson est composé de muscles rouges et de muscles blancs. Chez la daurade royale, les proportions de muscle rouge et blanc varient au cours de la croissance. Au stade larvaire (3 premières semaines), les proportions de muscle rouge sont les plus élevées (30 % de muscle rouge contre 70% de muscle blanc). A l'âge adulte, le muscle rouge ne représente plus que 5 %. Ces données sont corrélées au pourcentage de mitochondries retrouvées dans

les fibres musculaires de muscles rouges. La diminution du pourcentage de muscle rouge et du contenu en mitochondries qui lui est associé à la fin de l'état larvaire coïncide avec le début de la respiration par les branchies dans la deuxième moitié du stade larvaire. Durant le stade larvaire, les activités mitochondriales du muscle rouge sont donc les plus élevées qu'à tout autre âge du poisson (Ayala *et al.*, (1999)).

Une approche génomique a également mis en évidence l'importance de l'âge du poisson dans les fonctions et l'intégrité mitochondriales en utilisant le modèle « turquoise killfish » *Nothobranchius furzeri* (Hartmann *et al.*, (2011)). Dans cette étude, Il a été démontré que l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale diminue avec l'âge menant à une diminution de la quantité des complexes III et IV de la chaîne respiratoire. Il en résulte une baisse de la respiration mitochondriale dans le muscle squelettique avec l'âge. D'autre part, cette étude a démontré que le nombre de copies d'ADN mitochondrial est 2 à 5 fois plus élevé dans le muscle, le foie, le cerveau en comparaison avec d'autres tissus comme les branchies ou la rate. Un lien étroit semble exister entre contenu en ADN mitochondrial et la demande en énergie des tissus (Hartmann *et al.*, (2011)).

b. Influence du milieu de vie

Chaque espèce de poisson peut être caractérisée suivant la température de son milieu de vie. D'autre part, une même espèce peut être amenée à évoluer à différentes températures. Il est admis que les poissons vivant à des températures faibles présentent un contenu mitochondrial (crête, enzymes, nucléotides…) plus important que des espèces vivant dans des eaux chaudes (Guderley, (2004)). L'activité enzymatique (citrate synthase et cytochrome c oxydase) est plus importante chez les espèces antarctiques que les espèces d'eau tempérée (Crockett et Sidell, (1990)). Cependant, les capacités oxydatives et catalytiques des enzymes (comme l'oxydation du pyruvate) ne sont pas systématiquement différentes selon les conditions thermales du poisson. D'autre part, une espèce active aura une proportion de mitochondries plus importante dans le muscle qu'une espèce faiblement active comme certains poissons benthiques. Une expérience menée sur deux espèces de cyprinidés a démontré que l'entraînement physique augmentait la densité mitochondriale dans le muscle (Sänger, (1992)).

On note également des changements mitochondriaux lorsque le milieu de vie du poisson est perturbé comme par exemple par un changement de température. Toutefois, l'adaptation phénotypique à ce changement de milieu de vie diffère selon les espèces. Chez certaines espèces, la densité volumique mitochondriale augmente alors que pour d'autres, elle ne se

modifie pas. En effet, chez la truite arc-en-ciel par exemple, les acides gras des phospholipides mitochondriaux sont plus polyinsaturés durant l'hiver que l'été (12 % de degré d'insaturation supplémentaire). C'est donc un remodelage de la membrane mitochondriale qui permet une meilleure acclimatation au froid (Guderley et Johnston, (1996)).

Une autre étude s'est intéressée à l'acclimatation d'espèces antarctiques suite à une élévation de la température durant 4 à 6 semaines. Il a été observé une acclimatation des capacités mitochondriales qui se traduit par des changements des taux de respiration à l'état 3 (voir paragraphe « Le contrôle respiratoire » page 72) pour les complexes respiratoires I (augmentation) et II (diminution). Toutefois, aucune modification significative de la composition en acides gras polyinsaturés dans les membranes mitochondriales n'a été observée (Strobel *et al.*, (2013)).

Le poisson est donc capable de modifier et de moduler ses caractéristiques mitochondriales en fonction de l'environnement, autrement dit le milieu de vie dans lequel il évolue. Les changements de la composition en acides gras insaturés et en phospholipides impactent sur la flexibilité, la perméabilité des membranes mitochondriales et la respiration. Un degré d'insaturation membranaire plus élevé rend la membrane plus fluide, perméable et augmente ainsi le mouvement de l'oxygène vers les membranes et permet d'augmenter la respiration mitochondriale (Guderley, (2004)). Il a aussi été démontré que les membranes mitochondriales sont plus flexibles, perméables et labiles chez le poisson que chez le rat suite à des changements de température ou d'osmolarité (Richardson et Tappel, (1962)).

Les conditions de vie et de reproduction chez le poisson peuvent se situer à des températures allant de 0°C à 40°C selon l'espèce tout comme les conditions d'osmose variant de 200 mOsm à 1000 mOsm pour les espèces d'eau de mer. Ainsi, il est important de prendre en considération ces données lors des étapes d'extraction. Cela concerne notamment la composition du milieu d'extraction. En effet, il faut faire en sorte que celui-ci respecte les conditions d'osmose les plus adaptées selon l'espèce afin d'optimiser au mieux la conservation des mitochondries isolées (Ballantyne, (1994)).

Il ressort de ces études que les poissons ont des caractéristiques mitochondriales très variables suivant l'espèce et ses conditions de vie.

c. *Importance de l'alimentation et de la ressource énergétique associée*

Les ressources en glycogène dans une cellule musculaire de filet sont étroitement liées à la diète du poisson. Ainsi, un poisson bien nourri bénéficiera d'un stock de glycogène important.

Or, plus le stock en glycogène est important, plus la production d'ATP *post mortem* par glycolyse anaérobie est importante. Or, quand la chaîne de transport d'électrons est perturbée, l'ATP synthase fonctionne dans « le sens inverse » en hydrolysant l'ATP produit par glycolyse anaérobie afin de préserver le potentiel membranaire mitochondrial (St-Pierre *et al.*, (2000)). A partir d'un modèle *in vivo*, Scheffler *et al.*, (2015) ont montré que le maintien des fonctions mitochondriales impacte positivement le métabolisme *post mortem*. Ce dernier limite la perte d'ATP, la dégradation du glycogène, l'accumulation du lactate et le déclin du pH. La quantité de glycogène participe donc grandement au maintien des fonctions mitochondriales *post mortem* et donc au maintien des fonctionnalités cellulaires du filet (Huss, (1999)). Pour une même espèce de poisson, l'étude des fonctions et de l'intégrité mitochondriales chez deux groupes à l'alimentation riche ou pauvre pourrait donner des résultats complétement différents. Le stress à l'abattage impacte également les stocks en glycogène dans la cellule musculaire. En effet, un poisson stressé lors de l'abattage consomme davantage de glycogène, et diminue ainsi ces stocks en se débattant. En conséquence, la production d'énergie *post mortem* serait potentiellement plus faible et les fonctions et l'intégrité mitochondriales pourraient être impactées. En parallèle, la *rigor mortis* surviendrait plus tôt et la chute du pH est plus rapide. Différentes méthodes d'abattage existent : asphyxie à température ambiante, asphyxie en hypothermie dans de l'eau glacée à 1,4 $\pm$ 1°C et plus récemment l'immersion et l'asphyxie dans de la glace liquide (- 2,2°C). D'après les données actuelles obtenues chez la daurade royale, les méthodes d'abattage qui retardent le temps nécessaire à l'étourdissement du poisson ont un effet négatif sur l'apparition de la *rigor mortis* et sur la qualité du poisson en général sans pour autant impacter la conformation protéique et la structure du muscle (Mendes, (2018)).

Nous avons vu chez le poisson que de nombreux facteurs peuvent influencer les fonctions et l'intégrité mitochondriales au sein d'une même espèce. Pour ces raisons, il nous a semblé judicieux de réaliser l'étude des fonctions et de l'intégrité mitochondriales chez des individus issus de l'aquaculture afin de minimiser l'impact des variables telles que : la pression, la température et l'osmolarité de l'eau.

C. Les voies métaboliques de la mitochondrie

La mitochondrie constitue le lieu de plusieurs voies métaboliques propres à cet organite dont les plus connues sont : le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs), le métabolisme des acides gras et une partie du cycle de l'urée.

Le cycle de Krebs sera décrit de façon succincte dans cette partie en mettant l'accent sur des éléments importants en lien avec les méthodologies utilisées dans ces travaux de thèse.

Le cycle de Krebs fut décrit pour la première fois par Hans Adolf Krebs en 1937 (Krebs, (1970)). Il joue un rôle important dans la régénération des cofacteurs : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) et Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) en NADH et $FADH_2$ respectivement qui sont essentiels au fonctionnement de la chaîne respiratoire au cours de la phosphorylation oxydative. Cette voie métabolique est composée de huit étapes résumées et illustrées par la Figure 17 ci-dessous. Le cycle est initié par l'entrée de l'acétyl-coenzyme A.

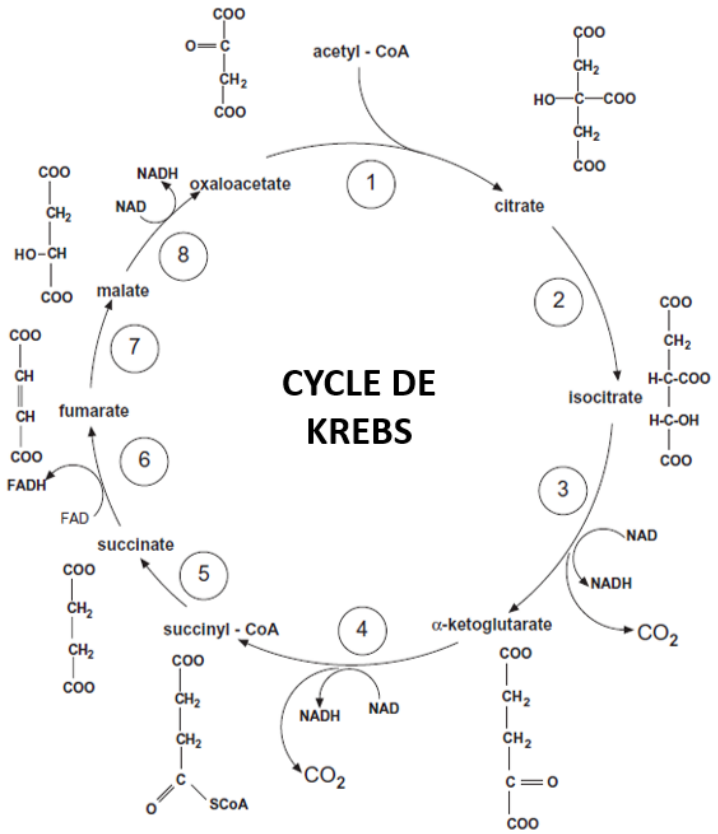


Figure 17 : Réactions du cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs (adapté de Scheffler, (2007))

L'oxaloacétate est également un élément de la première réaction et il est entièrement régénéré par la dernière permettant le commencement d'un nouveau cycle. Parmi les huit étapes du cycle de Krebs, quatre d'entre elles vont permettre la production des cofacteurs NADH + H^+ et $FADH_2$:

- conversion de l'isocitrate en α-cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase : 1 NADH + H^+ produit

- conversion de l'α-cétoglutarate en succinyl-CoA par l'α-cétoglutarate déshydrogénase : 1 NADH + H^+ produit.
- conversion du succinate en acide fumarique par la succinate déshydrogénase : 1 $FADH_2$ produit
- formation d'oxaloacétate à partir de malate sous l'action de la malate déshydrogénase : 1 NADH + H^+ produit

Au total, le cycle de l'acide citrique génère 3 NADH + H^+ et 1 $FADH_2$. Les molécules malate, α-cétoglutarate et succinate participent à la génération de ces cofacteurs. Une partie des produits formés lors du cycle de Krebs vont ainsi alimenter la chaîne respiratoire et participer à son fonctionnement.

D. Chaîne respiratoire et phosphorylation oxydative

La mitochondrie est définie comme la centrale énergétique de la cellule. Cette définition est due à son rôle essentiel dans la génération de la molécule à haut potentiel énergétique : l'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP intervient dans de nombreux mécanismes cellulaires importants tels que la contraction musculaire, la division cellulaire et le transport actif d'espèces chimiques très variées. Sa production est liée à l'activité de la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) par l'ATP synthase. Cette phosphorylation est couplée à l'activité de la chaîne de transport des électrons (CTE) ou « electron transfert chain » (ETC) en anglais. Cette chaîne est composée de quatre complexes protéiques situés au sein de la membrane interne mitochondriale (Figure 18 ci-dessous) :

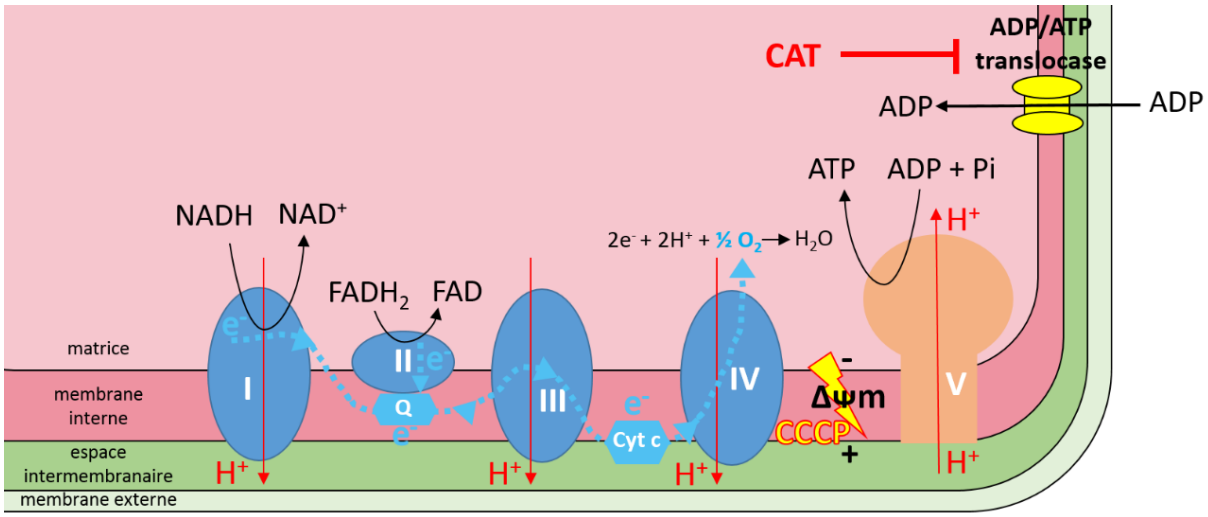


Figure 18 : Le processus de la phosphorylation oxydative permettant la génération d'ATP
Les 4 complexes de la chaîne de transfert des électrons sont représentées en bleu tout comme le sens de circulation des électrons le long de la chaîne. Le pompage des protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire est représenté par des flèches rouges. Les actions des poisons de la respiration sont également représentées : l'action du protonophore CCCP et l'inhibition de l'ADP/ATP translocase par le CAT.

- le NADH-Coenzyme Q réductase (complexe I)
- le succinate-coenzyme Q réductase (complexe II). La sous unité succinate déshydrogénase de ce complexe participe à l'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs et par conséquent à la génération de $FADH_2$
- le coenzyme Q-cytochrome c réductase (complexe III)
- le cytochrome c oxydase (complexe IV)

Cette chaîne respiratoire composée de ces quatre complexes est alimentée par les cofacteurs NADH + H^+ et $FADH_2$ qui cèdent leurs électrons aux complexes de la chaîne respiratoire. Le complexe I récupère les électrons du NADH + H^+ tandis que le complexe II récupère les électrons du $FADH_2$. Une circulation d'électrons va ainsi s'établir entre les différents complexes protéiques de la chaîne respiratoire *via* l'intervention des transporteurs mobiles tels que l'ubiquinone et le cytochrome c. L'oxygène constitue l'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire. La circulation des électrons au sein de cette chaîne permet de fournir l'énergie nécessaire aux pompages de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire mitochondrial. Une circulation de protons s'établit ainsi entre les complexes I, III et IV. Cette circulation est à l'origine de la formation d'un gradient de protons qui génère un gradient électrochimique qui constitue une force protomotrice (Δp). Ce gradient électrochimique est composé, comme son nom l'indique, à la fois d'un gradient électrique (plus communément dénommé potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)) et d'un gradient de pH (ΔpH). La force protomotrice représente une énergie d'environ 240 mV (Skulachev *et al.*, (1981)) en estimant que la part du $\Delta\Psi_m$ est de 180 mv et qu'une unité pH équivaut à 60 mV. Les protons, constituant la force protomotrice, circulent dans l'espace inter-membranaire et regagnent ensuite la matrice mitochondriale *via* la sous-unité F_0 de l'ATP synthase. Ceci permet la phosphorylation de l'ADP. De cette façon, la force protomotrice participe à la synthèse d'ATP (Mitchell, (1979), Tzagoloff, (1982), Boyer, (1987), Pedersen et Carafoli, (1987), Pedersen *et al.*, (1987)). Un lien est ainsi établi entre l'oxydation des cofacteurs dans la chaîne respiratoire et la synthèse de l'ATP suite à la phosphorylation de l'ADP par l'ATP synthase. Il s'agit du principe de phosphorylation oxydative. La CTE est ainsi couplée avec l'ATP synthase par le Δp. C'est le couplage mitochondrial.

E. Régulation de la phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est un processus impliquant la chaîne respiratoire qui est composée de quatre complexes protéiques dont trois pompes à protons (complexe I, III, IV) et

de l'ATP synthase qui constitue une quatrième pompe à protons, responsable de la synthèse d'ATP sous dépendance du $\Delta\Psi_{m.}$ La phosphorylation oxydative est donc permise par le couplage entre la CTE et l'ATP synthase *via* la force protomotrice (Δp).

La phosphorylation oxydative est régulée à deux niveaux :

- le taux de synthèse d'ATP, donc le taux de respiration
- la régulation de l'efficacité de la synthèse d'ATP (Kadenbach, (2003)).

Le taux de synthèse d'ATP est contrôlé par un mécanisme de rétrocontrôle dénommé le contrôle respiratoire. L'efficacité de la phosphorylation oxydative est définie par la production d'ATP en fonction du nombre d'atomes d'oxygène consommé (autrement dit le taux de respiration). C'est le ratio ATP/O (ou P/O). Ce paramètre et par conséquent l'efficacité de la phosphorylation oxydative est impactée par des composants qui diminuent le gradient de protons (découplage extrinsèque : voir paragraphe dédié page 73) ou par une baisse de l'efficacité du pompage des protons (découplage intrinsèque : voir paragraphe dédié page 74) (Kadenbach, (2003)).

1. Le contrôle respiratoire

Le contrôle respiratoire qui permet de contrôler la synthèse d'ATP peut s'effectuer selon plusieurs mécanismes. Historiquement, le contrôle respiratoire a été décrit par les travaux de Lardy et Wellman, (1952) et de Chance et Williams, (1955) sur mitochondries isolées. Ces travaux ont démontré que l'ajout d'ADP stimule la respiration mitochondriale suite à la conversion de l'ADP en ATP par l'ATP synthase. L'activité de l'ATP synthase étant augmentée, le Δp diminue ce qui, en conséquence, stimule l'activité du pompage de protons des trois complexes de la chaîne respiratoire et par conséquent la respiration mitochondriale (Nicholls et Ferguson, (2002)). Il s'agit du premier phénomène de contrôle respiratoire décrit. Chance et Williams, (1955) définissent ainsi différents états respiratoires à partir de mitochondries isolées couplées, dont l'état 3 et l'état 4.

- L'état 3 correspond à un état respiratoire stimulé par de fortes concentrations en ADP en présence d'un ou plusieurs substrats à des niveaux d'oxygènes saturés.
- L'état 4 correspond à un état respiratoire qui survient après l'état 3 quand la totalité de l'ADP a été transformée en ATP par l'ATP synthase.

Il est ainsi possible de déterminer l'index de contrôle respiratoire (RCI) qui est défini comme le rapport entre l'état 3 et l'état 4.

D'autre part, les niveaux de substrats respiratoires régulent la chaîne respiratoire mitochondriale. Le NADH + H^+ et le $FADH_2$ cèdent leurs protons et électrons à la chaîne

respiratoire. Leur synthèse est donc essentielle pour le processus de respiration mitochondriale. Dans des conditions expérimentales sur mitochondries isolées, l'ajout de glutamate, malate et de succinate participe à la synthèse de ces cofacteurs *via* le cycle de Krebs. Cela contribue à stimuler la respiration mitochondriale et donc la consommation d'oxygène.

D'autres mécanismes de contrôle respiratoire peuvent également intervenir tels que la régulation allostérique de la cytochrome c oxydase (complexe IV) par l'ATP (qui un phénomène indépendant du Δp), mais aussi la régulation par les hormones thyroïdiennes ou la phosphorylation du complexe I (Scacco *et al.*, (2000), Bender et Kadenbach, (2000), Goglia *et al.*, (1999), Arnold et Kadenbach, (1997)).

2. Régulation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative

a. Découplage extrinsèque

Le découplage extrinsèque s'effectue suite à l'action de composants ou mécanismes qui augmentent la perméabilité des membranes mitochondriales aux cations et aux anions et participent par conséquent à la diminution de la force protomotrice. Dans ce cas, une partie des protons pompés par les complexes retournent vers la matrice mitochondriale sans passer par l'ATP synthase. En réponse, l'activité de la chaîne respiratoire augmente afin de conserver le gradient de protons et ainsi compenser leur fuite. Cette dernière peut être due à la composition de la membrane interne mitochondriale (il s'agit principalement de lipides membranaires) qui joue un rôle dans une fuite naturelle des protons (Brand *et al.*, (1994)). Ce type de fuite est qualifié de fuite basale. La fuite de protons peut également être induite (fuite induite) par les protéines découplantes (UCP) (Azzone *et al.*, (1985), Nedergaard et Cannon, (1992)) qui comportent différentes isoformes. Ces dernières ont la capacité de transporter les protons mais leur mode d'action est encore mal défini. La fuite de protons peut également être induite par le transporteur ADP/ATP (Brand *et al.*, (2005)).

Enfin, le découplage extrinsèque implique également l'action d'agents découplants artificiels. Historiquement le 2,4 dinitrophénol (DNP) fait partie des premiers agents artificiels découplants utilisés (Loomis et Lipmann, (1948)). Le carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) compte parmi les agents découplants artificiels les plus utilisés de nos jours. Cette molécule est un agent lipidique faiblement acide. La forme ionisée possède une charge négative délocalisée lui permettant de se diffuser dans un milieu non polaire tel que les membranes mitochondriales. En passant par l'espace inter-membranaire, le CCCP capte un proton, traverse la membrane interne puis « relargue » ce proton dans la

matrice. Ainsi, cette molécule induit une dissipation du gradient de protons et par conséquent la chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) (voir paragraphe dédié page 74). Il en résulte une augmentation de la respiration et donc de la consommation d'oxygène. Ainsi, la respiration maximale est atteinte après ajout du CCCP. De par son action, le CCCP est qualifié de protonophore (Terada, (1990)) (voir Figure 18 page 70).

b. Découplage intrinsèque

Le découplage intrinsèque contribue à la baisse de l'efficacité du pompage des protons et implique les acteurs responsables de ce pompage de protons. Le découplage intrinsèque est qualifié de phénomène de « patinage ». Le découplage intrinsèque n'implique pas la force protomotrice (Pietrobon *et al.*, (1983)).

Le découplage intrinsèque résulte d'une variation des relations stœchiométriques qui s'effectue aux niveaux du complexe IV et de l'ATP synthase (Kadenbach, (2003)) :

- Au niveau du complexe IV, le découplage intrinsèque diminue la stœchiométrie H^+/e^-. Le pompage de protons est ainsi réduit pour un nombre équivalent d'électrons circulant.
- Au niveau de l'ATP synthase, le découplage intrinsèque augmente la stœchiométrie H^+/ATP. La quantité d'ATP synthétisée par l'ATP synthase diminue pour un nombre équivalent de protons circulant. Ce mécanisme a été démontré *in vitro* (Rigoulet *et al.*, (1998)).

Les différents mécanismes évoqués ci-dessus permettent à la mitochondrie de moduler sa production d'ATP et donc de s'adapter aux besoins énergétiques de la cellule. Les mécanismes de la réponse mitochondriale aux variations de demandes énergétiques dans les cellules eucaryotes ont été décrits par Devin et Rigoulet, (2007). Trois mécanismes d'ajustement de la réponse mitochondriale sont décrits par ces auteurs : un mécanisme d'adaptation à court terme et deux mécanismes d'adaptation à long terme.

Les mécanismes d'adaptation à long terme impliquent une modulation du contenu enzymatique mitochondrial et/ou la régulation cinétique par phosphorylation de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Ceci aboutit à une modification de l'activité de ces complexes.

F. Le potentiel membranaire mitochondrial

1. Définition et rôle du potentiel membranaire mitochondrial

Le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et le gradient de pH (ΔpH) sont les composants de la force protomotrice. Le $\Delta\Psi_m$ est donc essentiel à l'activité de l'ATP synthase

et la phosphorylation de l'ADP en ATP. Toutefois, son rôle ne s'arrête pas là. Le $\Delta\Psi_m$ joue également un rôle déterminant dans diverses fonctions telles que le transport, l'homéostasie et la régulation mitochondriale.

Il constitue une force motrice pour le transport de composés chargés dont certains sont essentiels. La présence du $\Delta\Psi_m$ dans les mitochondries implique que la membrane interne mitochondriale a tendance à être chargée négativement du côté matrice et positivement du côté de l'espace inter-membranaire. Ce contexte favorise le transport interne de cations dans la mitochondrie et le transport externe d'anions par des transporteurs « électrogéniques » dépendant du $\Delta\Psi_m$ tels que le calcium (Ca^{2+}) ou des ions ferreux (Fe^{2+}) (Zorova *et al.*, (2018), Gunter et Pfeiffer, (1990), Dong *et al.*, (2006)). La majorité des protéines mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol. Le $\Delta\Psi_m$ et le ΔpH sont impliqués dans l'importation des protéines au sein des différents compartiments de la mitochondrie (Neupert et Herrmann, (2007)). Le transport d'acides nucléiques tels que les acides ribonucléiques de transfert (ARN_t) dans la mitochondrie est possible selon deux voies : une voie nécessitant uniquement de l'ATP et une autre voie nécessitant de l'ATP et la présence du $\Delta\Psi_m$ (Tarassov *et al.*, (1995), Schneider, (2011)).

Tableau VIII : Les différents mécanismes de régulation du potentiel membranaire mitochondrial (adapté de Kadenbach, (2003))

Régulation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)
Paramètres qui diminuent le potentiel membranaire mitochondrial
1. Ratio ATP/ADP faible, *via* la stimulation de l'ATP synthase
2. Ratio $NADH+H^+/NAD^+$ faible dû à la limitation en substrats de la chaîne respiratoire
3. Action d'un découplant de la phosphorylation oxydative augmentant la perméabilté aux protons de la membrane
4. Phosphorylation du complexe IV (cytochrome c oxydase)
5. Anion radical superoxide, dû à l'activation de protéines découplantes
Paramètres qui augmentent le potentiel membranaire mitochondrial
1. Ratio ATP/ADP élevé, *via* l'inhibition de l'ATP synthase
2. Ratio $NADH+H^+/NAD^+$ élevé dû à la haute pression en substrats de la chaîne respirato
3. Déphosphorylation du complexe IV (cytochrome c oxydase)
Conséquences d'un haut potentiel membranaire mitochondrial (>150 mV)
1. Formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)
2. Augmentation exponentielle de la perméabilité de la membrane aux protons
3. Diminution de la stoechiométrie H^+/e^- du complexe IV
4. Efficacité dimuniée de la phosphorylation oxydative due à (2) et (3)
5. Thermogénèse augmentée due à (2) et (3)
6. Taux maximal de la phosphorylation oxydative avec un taux élevé d'utilisation d'ATP

Deux phénomènes impliquant des protéines mitochondriales peuvent jouer un rôle dans la formation et la régulation du $\Delta\Psi_m$:

- Les échanges électrogéniques entre ADP et ATP par le transporteur ATP/ADP qui ont un rôle dans le maintien du $\Delta\Psi_m$ (Chinopoulos, (2011))
- Le maintien du $\Delta\Psi_m$ par le fonctionnement inverse de l'ATP synthase (Walker, (2013))

Le $\Delta\Psi_m$ joue donc un rôle essentiel dans de nombreux processus mitochondriaux dont certains ont une influence sur la cellule entière. Son estimation est donc primordiale afin de déterminer la « santé » mitochondriale et même à plus large échelle la « santé » cellulaire.

Le potentiel membranaire mitochondrial est également impliqué dans l'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP) (voir paragraphe dédié page 81). Un $\Delta\Psi_m$ élevé favorise la fermeture de PTP mais en cas de dépolarisation, les probabilités d'ouverture du PTP sont élevées (Bernardi, (1992)). Toutefois, il a été démontré que la chute du potentiel n'est pas essentielle à la formation du PTP (Haworth et Hunter, (2000)). Il reste donc encore à déterminer si le potentiel est une cause ou une conséquence de la formation du PTP.
Les différents mécanismes de régulation du potentiel membranaire mitochondrial sont décrits dans le Tableau VIII page 75.

2. Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial par des sondes fluorescentes

De nombreuses sondes fluorescentes ont été développées depuis les années 80 afin d'étudier les fonctions mitochondriales telles que le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). De nos jours, les sondes mitochondriales fluorescentes sont couramment utilisées. Deux catégories de sondes mitochondriales sont à considérer : les sondes dites structurales et les sondes dites fonctionnelles. Les sondes structurales sont sensibles à la « masse » de la mitochondrie par exemple (MitoTracker Green FM : (Puleston, (2015)) alors que les sondes fonctionnelles sont sensibles aux fonctions et à l'intégrité mitochondriales comme le potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$).
Parmi ces sondes fonctionnelles, les sondes fluorescentes cationiques, autrement dit chargées positivement, sont naturellement attirées par le potentiel négatif généré au travers de la membrane interne mitochondriale. Elles s'accumulent ainsi dans la matrice mitochondriale. La membrane plasmique possède également un potentiel membranaire ($\Delta\Psi_p$). Toutefois, celui-ci est beaucoup plus faible que celui des mitochondries (32,8 mV pour le $\Delta\Psi_p$ contre 161 mV pour le $\Delta\Psi_m$ (négatif à l'intérieur)). Ainsi, les sondes cationiques s'accumulent et s'équilibrent beaucoup plus rapidement et fortement dans les mitochondries (Hoek *et al.*, (1980)). Par comparaison, le potentiel de la membrane plasmique permet d'augmenter de 10

fois l'accumulation d'une sonde cationique dans le cytosol alors que le potentiel membranaire mitochondrial permet d'augmenter de 10 000 fois l'accumulation de ce type de sonde dans la matrice mitochondriale (Yousif *et al.*, (2009)). Plus le potentiel est négatif à l'intérieur des mitochondries, plus la sonde cationique chargée positivement s'accumule (et vice et versa) selon l'équation de Nernst : $V = -\frac{RT}{ZF}\ln\frac{Ci}{C0}$

Avec :V : le potentiel membranaire ; R : la constante universelle des gaz parfaits (8,314 J mol^{-1} K^{-1}) ; T : la température absolue en Kelvin ; Z : la valence des espèces ioniques ; F : la constante de Faraday ($9{,}65.10^4$ $C.mol^{-1}$) ; C_i et C_0 : les concentrations des espèces ioniques à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule, respectivement.

Trois familles de fluorochromes cationiques sensibles au $\Delta\Psi_m$ sont principalement étudiées (Cottet-Rousselle *et al.*, (2011)) :

- les Rhodamines (Rhodamine 123 (Rh123), tétraméthylrhodamine éthyl ester (TMRE) et tétraméthylrhodamine méthyl ester (TMRM))
- les Carbocyanines (5 ,5', 6, 6' – tétrachloro-1, 1', 3, 3' – tétraéthyl-benzimidazol-carbocyanine (JC-1/JC-10))
- les Rosamines (MitoTracker (Green FM, Orange, CMXRos))

a. Un exemple de rhodamines : la Rhodamine 123

La Rh123 est une des plus anciennes (Johnson *et al.*, (1980), Emaus *et al.*, (1986)) et la plus utilisée des sondes cationiques pour évaluer le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées. Ces propriétés spectrales sont les suivantes : longueur d'onde d'excitation maximale : 490 nm et longueur d'onde d'émission maximale : 525 nm. La sonde peut être à la fois utilisée sur cellules entières (Johnson *et al.*, (1980)) ou sur mitochondries isolées (Emaus *et al.*, (1986)). Dans le cas d'une utilisation sur mitochondries isolées, la Rh123 fait partie des sondes qui peuvent être utilisées selon deux modes : un mode où la fluorescence de la sonde est éteinte (« quenching mode ») et un mode où la fluorescence est présente (« unquenching mode »).

- « Quenching mode » :

  A concentration élevée (50 nM –100 nM à plusieurs micromolaires), la sonde va s'accumuler dans la matrice mitochondriale pour former des agrégats provoquant ainsi une extinction de la fluorescence et donc une baisse du signal. Une dépolarisation de ces mitochondries par un agent découplant (tel que le Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (CCCP)) provoque un relargage de la sonde et par conséquent une augmentation du signal de fluorescence.

- « Unquenching mode » :

  Pour des concentrations en Rh123 très faibles comprises entre 0,5 à 30 nM, le « quenching » n'est pas possible. Dans ces conditions, les mitochondries polarisées contiennent plus de sondes Rh123 et ont par conséquent une intensité de fluorescence plus importante que des mitochondries dépolarisées (Perry *et al.*, (2011)).

Il est à noter que sur cellules entières, cette sonde présente les inconvénients d'être non spécifique en interagissant avec le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Cottet-Rousselle *et al.*, (2011)). Pour l'étude du $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées, les interactions non spécifiques ave d'autres organites sont impossibles. Ainsi, l'efficacité de la Rh123 à évaluer le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées a été mise en évidence (Barksdale *et al.*, (2010), Emaus *et al.*, (1986)).

Toutefois, si la Rh123 est utilisée à forte concentration (>20 $\mu g.mL^{-1}$), les fonctions mitochondriales sont perturbées avec comme conséquences l'inhibition de l'ATP synthase et l'inhibition des réactions de transfert des électrons (Modica-Napolitano *et al.*, (1984), Modica-Napolitano et Aprille, (1987)).

b. Un exemple de carbocyanines : le JC-10

La sonde JC-10 est un dérivé des sondes JC-1 et JC-9 qui se distingue de ces dernières par une meilleure solubilité en milieu aqueux. Toutefois, les caractéristiques de la sonde restent inchangées. En effet, la sonde JC-10 est une sonde ratiométrique dont les propriétés spectrales varient suivant son état : agrégé ou non agrégé. Sous forme non agrégée (monomérique), le JC-10 possède une longueur d'onde d'excitation maximale de 514 nm et une longueur d'onde d'émission maximale de 529 nm. Sous cette forme, une fluorescence verte est donc émise. Ainsi en conditions expérimentales, la fluorescence est majoritairement verte si le $\Delta\Psi_m$ étudié est faible. Lorsque des mitochondries sont polarisées et donc énergisées, la sonde JC-10 s'accumule dans la matrice mitochondriale puis forme des agrégats (J-aggregates). Les propriétés spectrales de la sonde sont ainsi modifiées. La longueur d'émission maximale, après excitation de la sonde, devient observable à 590 nm et non plus à 529 nm. La fluorescence à 590 nm est rouge. Il y a donc deux couleurs de fluorescence en fonction de la valeur du $\Delta\Psi_m$. Cette caractéristique permet de qualifier le JC-10 de sonde qualitative (Cottet-Rousselle *et al.*, (2011)).

La sonde JC-10 est donc une sonde hybride qui permet de distinguer une population de mitochondries à faible $\Delta\Psi_m$ d'une autre population à haut $\Delta\Psi_m$. Un ratio rouge/vert est

classiquement calculé pour évaluer le taux de mitochondries polarisées. Le JC-10 présente toutefois les inconvénients d'être très photosensible (Nicholls et Ward, (2000)).

c. Un exemple de rosamines : le CMXRos

Le Red CMXRos est une sonde appartenant au groupe des MitoTrackers. Ces sondes appartiennent à la famille des rosamines et ont la particularité d'être retenues dans la mitochondrie après une fixation au formaldéhyde. Cette rétention est possible car les MitoTrackers possèdent un groupement chloro-méthyle réactif qui permet de former des liaisons covalentes avec les thiols présents sur les protéines et les peptides « piégeant » ainsi la sonde dans la mitochondrie (Cottet-Rousselle *et al.*, (2011)). Les propriétés spectrales du Red CMXRos sont les suivantes : longueur d'onde d'excitation maximale : 579 nm et longueur d'onde d'émission maximale : 599 nm. La fluorescence émise est rouge. La valeur d'intensité de la fluorescence émise est dépendante de la valeur du $\Delta\Psi_m$. Si les mitochondries sont polarisées, alors l'intensité de fluorescence est élevée et inversement. Ainsi, la sonde est qualifiée de quantitative. Le Red CMXROS a été notamment utilisé pour mettre en évidence la chute du $\Delta\Psi_m$ dans le processus d'apoptose (Poot *et al.*, (1997)).

L'utilisation de l'ensemble de ces sondes fluorescentes cationiques spécifiques du $\Delta\Psi_m$ s'avère ainsi appropriée à l'étude des fonctions mitochondriales dans différents contextes comme les fonctions et l'intégrité mitochondriales *post mortem*.

G. Les transporteurs mitochondriaux

1. Le transporteur ADP/ATP

Le transporteur ADP/ATP, également dénommé translocateur de nucléotides à adénine, est une protéine localisée dans la membrane interne mitochondriale. Il représente la protéine la plus abondante de la membrane interne (Figure 19 ci-dessous).

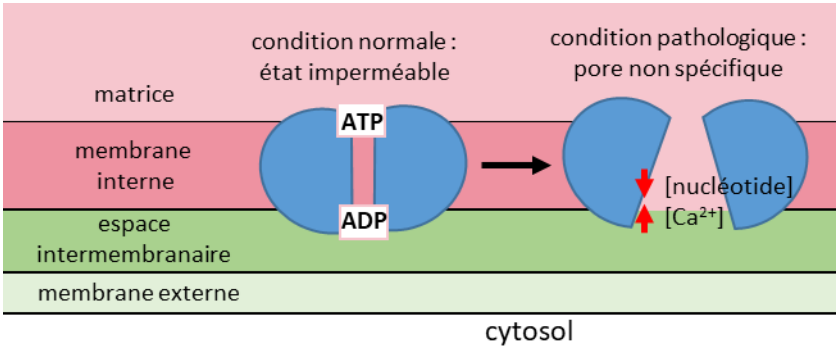


Figure 19 : Le transporteur ADP/ATP.
En condition de stress telle qu'une forte concentration d'ions calcium dans la mitochondrie ou suite à une diminution des nucléotides ADP/ATP, le transporteur ADP/ATP change de conformation et perd sa spécificité (d'après Weidemann *et al.*, (1970))

Il est impliqué dans l'échange réversible d'ATP produit dans la matrice mitochondriale par de l'ADP généré suite à des réactions cellulaires consommatrices d'énergie (Weidemann *et al.*, (1970)). Il s'agit d'un transporteur électrogénique donc l'échange de nucléotides est rendu possible grâce au gradient de protons qui s'effectue dans la membrane interne mitochondriale. Lorsque des conditions pathologiques sont présentes dans les mitochondries telles qu'une déplétion en nucléotides et/ou une concentration élevée de calcium dans les mitochondries, le transporteur ADP/ATP change de conformation et devient un pore non spécifique. Tout comme lors de conditions pathologiques, lors de la condition *post mortem*, une éventuelle altération du transporteur ADP/ATP pourrait être constatée suite à la baisse de la teneur en nucléotides et à l'augmentation de la teneur en calcium.

La molécule Carboxyactractyloside (CAT) est dérivée de plantes. Le CAT est un inhibiteur du transporteur ADP/ATP (Luciani *et al.*, (1971), Pebay-Peyroula *et al.*, (2003)). Il bloque le transporteur en position ouverte du côté cytoplasmique. Il induit un changement de conformation du transporteur incapable de fixer les nucléotides. L'acide bongkrek, une molécule isolée de souches *Pseudomonas* est également un inhibiteur spécifique du transporteur ADP/ATP (Scheffler, (2007)).

2. Les transporteurs calciques

La mitochondrie et le réticulum endoplasmique sont des organites connus pour leur rôle important dans l'homéostasie du calcium cellulaire (Vercesi *et al.*, (1993)). Lorsque les concentrations cytosoliques de calcium augmentent, celui-ci est rapidement intégré par les mitochondries. Ces dernières jouent ainsi un rôle tampon (Duchen, (2000)) en régulant les signaux calciques en interagissant avec le réticulum endoplasmique (Rizzuto *et al.*, (2004)). Le transport du calcium dans les mitochondries s'effectue par des canaux/transporteurs dépendant du $\Delta\Psi_m$ (Figure 20 ci-dessous).

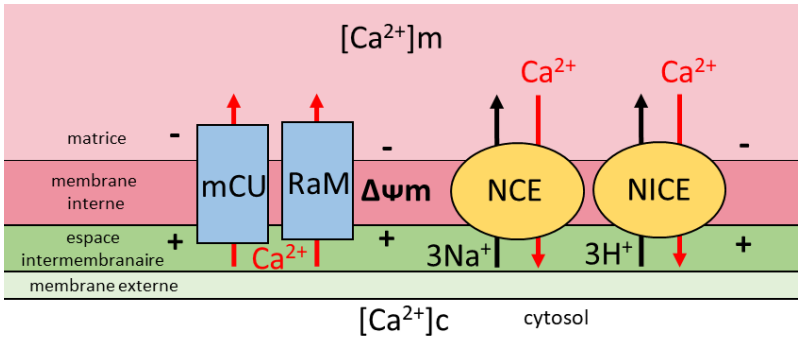


Figure 20 : Voies de transport des ions Ca^{2+} dans des mitochondries énergisées
Le canal uniporteur (mCU) et le rapid uptake mode permettent l'entrée du calcium dans la mitochondrie sous influence du potentiel membranaire mitochondrial. Les transporteurs NCE et NICE permettent la sortie du calcium. D'après Bernardi, (1999).

Chez les vertébrés, l'un des acteurs majeurs de l'entrée du calcium dans la mitochondrie est le canal à Ca^{2+} uniporteur (mCU) qui dépend du potentiel membanaire mitochondrial. Un autre mécanisme d'entrée rapide du calcium a également été décrit par Sparagna *et al.*, (1995) : le « Rapid Uptake Mode » abrégé « RaM ». La sortie des ions calciques des mitochondries est quant à elle assurée par le canal NCE (Na^+/Ca^{2+} exchanger) en échange de l'entrée d'ions Na^+ (Crompton, (1999)) ou par le canal NICE qui ne nécessite pas l'entrée de Na^+ (Na^+ Independent/Ca^{2+} exchanger). En conditions pathologiques, l'échangeur NCE peut opérer dans le sens inverse. Le calcium est reconnu comme un régulateur de la respiration (régulation de l'oxydation des substrats (Hansford et Zorov, (1998)) et comme un intermédiaire du métabolisme mitochondrial (Zorova *et al.*, (2018)). Par exemple, une stimulation de la production d'ATP peut être activée rapidement suite à l'augmentation du calcium mitochondrial. L'intégration de calcium (Ca^{2+}) dans la mitochondrie se fait donc en partie sous régulation du $\Delta\Psi_m$. Ce mécanisme est aujourd'hui reconnu et très étudié (Zorova *et al.*, (2018), Gunter et Pfeiffer, (1990), Dong *et al.*, (2006)). L'homéostasie calcique dans les mitochondries a été très étudiée dans le cas de lésions cellulaires dans trois types de tissus : le rein, le foie et le cœur (Dong *et al.*, (2006)). Dans le contexte de l'ischémie/reperfusion par exemple, l'homéostasie du calcium est perturbée aboutissant à des dommages des structures cellulaires incluant les mitochondries. Une forte accumulation de calcium dans les mitochondries mène à une chute du $\Delta\Psi_m$ et à une perméabilisation des membranes mitochondriales par la formation de pores de transition de perméabilité (mPTP) (voir paragraphe ci-dessous). Ces évènements aboutissent à l'altération des membranes et à la libération de facteurs induisant la mort cellulaire. Dans le cas d'études *post mortem*, le contexte s'apparente aux conditions d'ischémie. Par conséquent, nous pouvons supposer que les mécanismes retrouvés dans un tissu *post mortem* sont équivalents à ceux retrouvés en condition d'ischémie.

3. Les pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)

Le pore de transition de perméabilité (mPTP) est localisé au niveau des membranes mitochondriales (Morganti *et al.*, (2018)). Il constitue un méga canal non spécifique dont l'ouverture est responsable de la perméabilité des membranes mitochondriales. Sa structure et sa composition exactes sont encore mal définies et font l'objet de débats. Toutefois, plusieurs modèles ont été proposés. Les nombreuses recherches menées sur le mPTP ont permis d'améliorer la connaissance de sa composition. Le modèle présenté Figure 21 page 82 a été proposé par Morganti *et al.*, (2018).

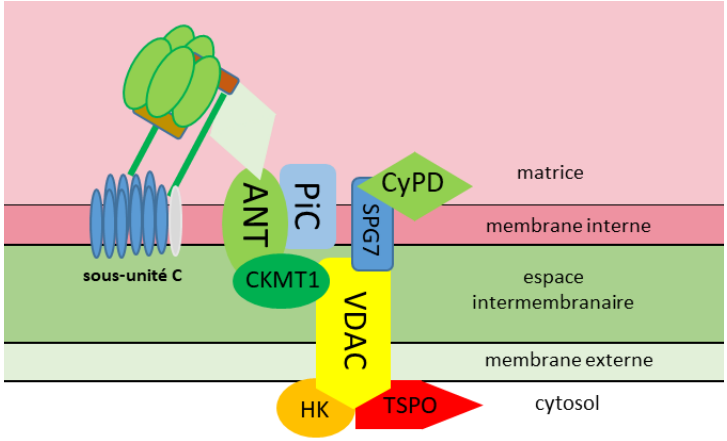


Figure 21 : Organisation et structure hypothétique du pore de transition de perméabilité mitochondriale (d'après Morganti *et al.*, (2018)).

D'après le modèle hypothétique de Morganti *et al.*, (2018), le mPTP est composé de plusieurs protéines juxtaposées entre la membrane interne et la membrane externe de la mitochondrie :

- le « voltage-dependent anion channel » : une porine qui assure le transport de solutés à travers la membrane externe mitochondriale
- le transporteur ADP/ATP
- la cyclophiline D (CyPD) principalement localisée dans la matrice mitochondriale joue un rôle de « gardien », de modulateur dans l'ouverture du mPTP (Nakagawa *et al.*, (2005), De Marchi *et al.*, (2006))
- le transporteur de phosphate inorganique PiC (phosphate carrier)
- la SPG7 : une protéine de la membrane interne possédant une activité métalloprotéase (Shanmughapriya *et al.*, (2015)).
- les kinases CKMT (créatine kinase mitochondriale) et HK (histidine kinase)
- la protéine « translocatrice » (translocator protein (TSPO)) localisée dans la membrane externe
- la sous-unité c du domaine F_0 de l'ATP synthase (Mnatsakanyan *et al.*, (2018)).

Ce modèle est toutefois fortement contestable. Les études génétiques ont en effet exclu l'implication du « voltage-dependent anion channel » et du transporteur ADP/ATP dans la formation du mPTP (Bernardi et Lippe, (2018). A ce jour, la plus récente hypothèse concernant la nature du mPTP est qu'il se forme après un changement de conformation calcium-dépendant de l'ATP synthase (Bernardi et Lippe, (2018). L'ATP synthase serait ainsi le seul élément du mPTP régulé par différentes protéines. Le débat reste ouvert sur la façon

dont l'ATP synthase peut transiter de sa fonction clé de conservateur d'énergie à celle de canal dissipant l'énergie favorisant ainsi la mort cellulaire (Bernardi *et al.*, (2015).

La formation du mPTP et son action ont surtout été décrites dans le cas des lésions dues à l'ischémie/reperfusion, le cancer ou encore les maladies neurodégénératives. L'ouverture de mPTP permet la libération dans le cytosol de molécules d'un poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa (Di Lisa et Bernardi, (2009)) telles que le cytochrome c et des facteurs ou des protéines induisant la mort cellulaire. L'ouverture du PTP est ainsi considérée comme un évènement central dans les mécanismes de mort cellulaire et comme un point de non-retour (Marchetti, (1996)). L'ouverture du mPTP est principalement stimulé par : une accumulation excessive de calcium dans les mitochondries, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), le phosphate inorganique ou encore l'alcanisation intracellulaire (augmentation du pH). Comme évoqué précédemment, le $\Delta\Psi_m$ joue un rôle dans la formation du mPTP. Il reste encore à déterminer si la chute du $\Delta\Psi_m$ est une cause de l'ouverture du mPTP ou alors une conséquence de cette ouverture. Dans un contexte *post mortem*, nous pouvons supposer que la formation de mPTP pourrait s'établir et induire le relargage du contenu mitochondrial.

H. Mitochondries et mort cellulaire

1. Implication des mitochondries dans l'apoptose

L'apoptose correspond à une mort cellulaire. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Kerr *et al.*, (1972). Il a fait depuis l'objet de nombreux travaux (Green et Reed, (1998)). Deux voies possibles mènent à l'apoptose : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 22 page 84).

La voie extrinsèque est indépendante des mitochondries. Cette voie fait intervenir les récepteurs de mort situés à la surface de la cellule ainsi que des caspases initiatrices. Ces dernières une fois clivées, activent des caspases effectrices menant à la fois à une fragmentation de l'ADN, une condensation de la chromatine et un bourgeonnement de la membrane plasmique (Couzinet *et al.*, (2002)).

La voie intrinsèque (dépendante des mitochondries) est déclenchée suite à divers stress : dommage à l'ADN, hypoxie, infection virale, diminution des facteurs de croissance, stress oxydant, altération du réticulum endoplasmique. Ces stress vont induire l'activation de la protéine p53 par phosphorylation ou activer directement des facteurs pro-apoptotiques. L'accumulation de p53 ou les divers stress cités vont permettre la transcription de gènes codant pour des protéines de la famille Bcl-2. Cette famille contient des protéines pro-

apoptotiques (BAD, Bak, Bax, Bid, Bim et Bok) ou anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w entre autres) (Desagher et Martinou, (2000), Brunelle et Letai, (2009), Estaquier *et al.*, (2012)).

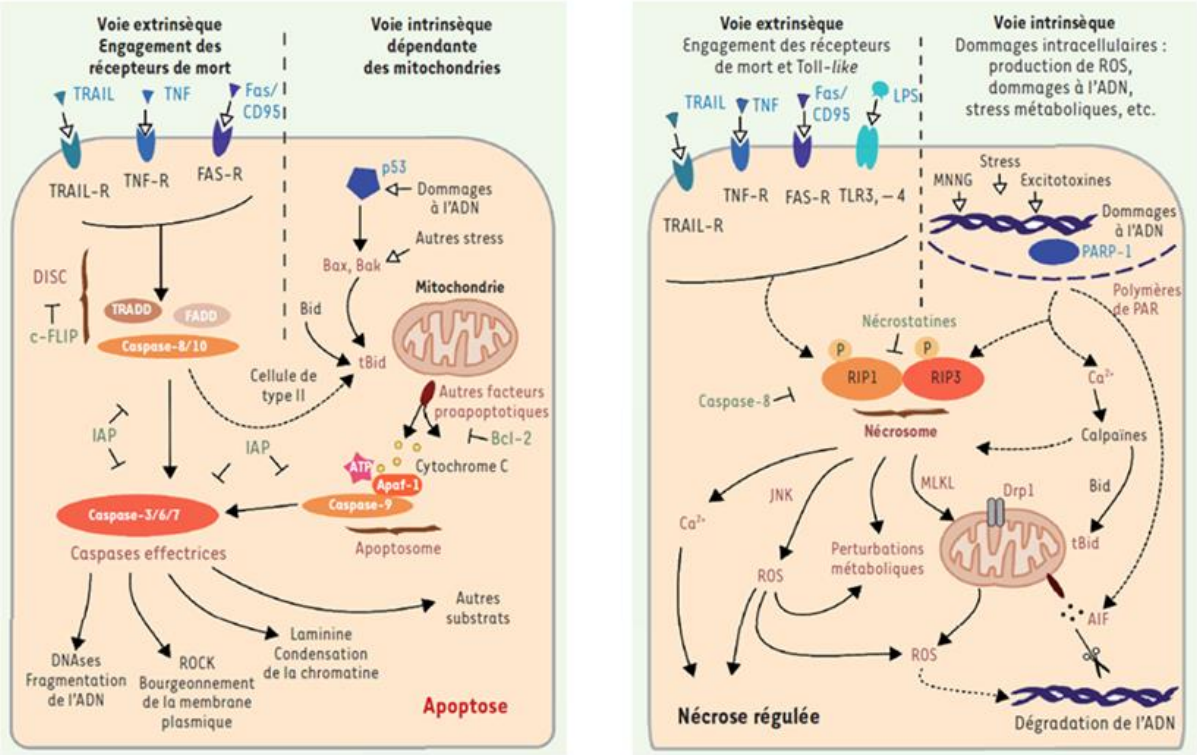


Figure 22 : Voies de signalisation de l'apoptose et de la nécrose (Cabon *et al.*, (2013))

Les protéines pro-apoptotiques vont ainsi perturber les fonctions et l'intégrité mitochondriales. Comme cité précédemment, la mitochondrie possède deux membranes plus ou moins perméables suivant la taille des molécules. La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) est une étape essentielle qui régule l'apoptose chez les eucaryotes supérieurs (Tait et Green, (2013)). Les protéines de la famille Bcl-2 à « BH3 seulement » telles que Bid vont interagir avec Bax causant une oligomérisation de Bax (Gavathiotis *et al.*, (2008)). Ces protéines à « BH3 seulement » participent également à l'homo-dimérisation de Bax et Bad après leur activation (Dewson *et al.*, (2008), Dewson et Kluck, (2010)). L'oligomérisation de Bax et Bak est essentielle pour la MOMP car les mutants qui ne peuvent « s'oligomériser » sont inactifs (George *et al.*, (2007)) Les oligomères de Bax et/ou les oligomères d'homo-dimères Bax/Bad vont participer à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) selon un mécanisme encore mal connu. Deux hypothèses sont avancées (Juin et Vallette, (2000)) :

- soient les oligomères provoquent directement l'ouverture d'un pore transitoire de perméabilité entraînant une rupture partielle de la membrane externe mitochondriale et par conséquent la libération de facteurs induisant la mort cellulaire
- soient les oligomères interagissent avec la protéine VDAC pour former un « méga-canal » (dont la composition est décrite Figure 23 page 86). Il en résulte L'ouverture d'un pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) et la perméabilisation de la membrane externe (Adachi *et al.*, (2004))

La perméabilisation des membranes mitochondriales aboutit à la libération dans le cytosol de nombreuses protéines mitochondriales telles que : le cytochrome c, Smac/DIABLO et Omi (HtrA2) et des facteurs induisant l'apoptose (FIA). La protéine Apaf1 (Apoptotic peptidase activating factor 1), en se liant avec le cytochrome c, subit des changements conformationnels en s'oligomérisant en heptamère et en exprimant un domaine de recrutement d'activation de caspases (CARD). Ce domaine permet l'interaction avec la pro-caspase 9 formant ainsi l'apoptomose qui clive et active les caspases effectrices 3/6/7. Les protéines mitochondriales Smac et Omi sont pro-apoptotiques en inhibant la protéine XIAP (« X-linked inhibitor of apoptosis protein ») qui inhibe à son tour l'activité des caspases. Ainsi, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque mènent toutes les deux à la mort cellulaire et se rejoignent dans les cellules de type 2 par l'intermédiaire des protéines à « BH3-seulement ». En parallèle, la MOMP va induire l'entrée de solutés tels que les K^+, Mg^{2+} et Ca^{2+} et de l'eau menant au gonflement des mitochondries et à la rupture de la membrane externe amplifiant ainsi le relargage des molécules pro-apoptotiques citées précédemment (Kroemer *et al.*, (1998), Ly *et al.*, (2003)).

Le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) décrit précédemment joue également un rôle important dans les mécanismes de mort cellulaire. Toutefois, il reste à élucider si la perte du $\Delta\Psi_m$ est un évènement initiateur de l'apoptose ou une conséquence. Selon Ly *et al.*, (2003), les deux scenarii sont possibles impliquant des systèmes apoptotiques avec une perte précoce ou tardive du $\Delta\Psi_m$. Ainsi, selon ces auteurs, un faible $\Delta\Psi_m$ ne peut suffire à prédisposer la cellule à l'apoptose. De plus, la dissipation du $\Delta\Psi_m$ par des agents découplants tels que le Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (CCCP) n'induit pas de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) et pas d'apoptose rapide (Pastorino *et al.*, (1998), Finucane *et al.*, (1999)).

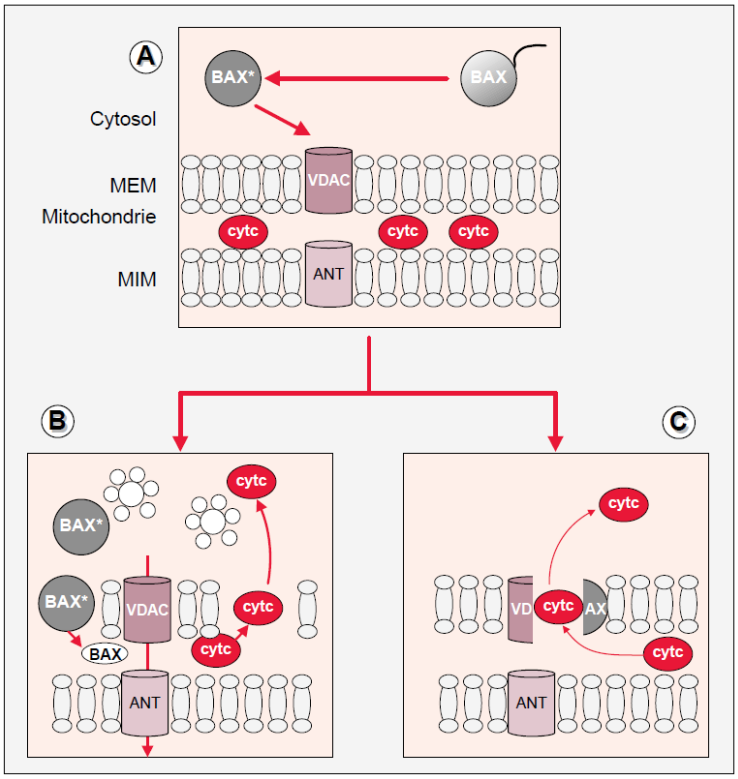


Figure 23 : Les deux 2 hypothèses de la perméabilisation des membranes mitochondriales sous l'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

- (A) au cours des mécanismes d'apoptose, la protéine partiellement cytosolique pro-apoptotique Bax de la famille Bcl-2 change de conformation et s'ancre dans les membranes mitochondriales
- (B) 1ère hypothèse : les molécules pro-apoptotiques Bax/Bad provoquent une lyse partielle de la membrane externe mitochondriale permettant une libération des facteurs induisant la mort cellulaire tels que le cytochrome c.
- (C) 2ème hypothèse : les molécules pro-apoptotiques Bax/Bad interagissent avec VDAC pour former le pore de transition de perméabilité (mPTP). Ce méga-canal provoque la libération de facteurs induisant la mort cellulaire

(d'après Juin et Vallette, (2000))

Ceci démontre qu'un changement du $\Delta\Psi_m$ n'induit pas nécessairement l'apoptose. Ces données laissent supposer que la chute du $\Delta\Psi_m$ est une conséquence de l'apoptose permettant peut être ensuite une amplification du mécanisme d'apoptose.

2. Implication des mitochondries dans la nécrose

La nécrose est un phénomène de mort cellulaire qui fut décrit initialement comme un évènement pro inflammatoire non régulée déclenché suite à un traumatisme cellulaire (Figure 22 page 84). Elle est caractérisée par un gonflement de la cellule et de ses organites aboutissant à une rupture des membranes cellulaires et à une libération de facteurs induisant la réponse pro-inflammatoire (Kroemer *et al.*, (1998)). De nos jours, il est admis que la nécrose est un phénomène régulé impliquant les mitochondries et présentant des analogies avec l'apoptose. On parle ainsi de nécrose régulée ou de nécroptose (Cabon *et al.*, (2013)). Tout

comme pour l'apoptose, deux voies sont possibles : une voie intrinsèque et une voie extrinsèque impliquant la mitochondrie (Figure 22 page 84).

La voie extrinsèque est déclenchée par l'engagement des récepteurs de mort et Toll-like (TRAIL-R, TNF-R, FAS-R, TLR3) qui active les kinases RIP1 et RIP3 formant le nécrosome (Holler *et al.*, (2000)). Ce complexe engendre ainsi diverses perturbations intracellulaires telles que : l'élévation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), du calcium et des perturbations mitochondriales.

La voie intrinsèque induite lors de la nécrose régulée est déclenchée suite à l'activation de l'enzyme de réparation de l'ADN PARP-1 (Schreiber *et al.*, (2006)). L'hyper activation de PARP-1 aboutit à l'activation des calpaïnes (calcium dépendantes), à la diminution de l'ATP intracellulaire et à la perméabilisation mitochondriale (Heeres et Hergenrother, (2007)).

Dans les deux voies impliquées au cours de la nécroptose, la mitochondrie subit une perméabilisation de ses membranes aboutissant à une libération de facteurs induisant la mort cellulaire.

Les voies de signalisation de l'apoptose et de la nécrose diffèrent sensiblement mais ont en commun le rôle central de la mitochondrie dans la mort cellulaire.

3. Evolution cellulaire en conditions *post mortem*

a. Processus mis en jeu post mortem

Les mécanismes de mort cellulaire qui interviennent dans les conditions *post mortem* sont encore mal connus et peu étudiés. S'agit-il d'apoptose, de nécrose, des deux ou d'un autre mécanisme de mort cellulaire spécifique aux conditions *post mortem* ? L'autophagie constitue également un troisième type de mort cellulaire. Cependant, ce processus n'a jamais été rapporté dans le muscle *post mortem*.

Chez le rat Wistar, Tomita *et al.*, (2004) ont démontré que les changements ultra-structuraux *post mortem* observés dans les organes tels que le pancréas, le foie, le cœur ou le muscle squelettique (conservation 24 h à 23°C) se rapprochent de la nécrose (disparition des organelles) et également de l'apoptose (condensation de la chromatine et rétrécissement de la cellule). L'étude met ainsi en évidence les caractéristiques des deux mécanismes de mort cellulaire : apoptose et nécrose. Une autre étude également menée chez le rat Wistar a démontré la mort cellulaire par apoptose dans le muscle *post mortem* (Becila *et al.*, (2010)). Dans cette étude, les carcasses de rat ont été conservées durant 3 jours à 4°C. Ces auteurs ont mis en évidence trois phénomènes caractéristiques de l'apoptose : l'externalisation de la

phosphatidyl-sérine, le rétrécissement cellulaire et la dégradation de l'actine. Les changements observés étaient similaires entre muscle blanc et muscle rouge.

Chez le modèle bovin, l'implication de l'apoptose comme processus de mort cellulaire *post mortem* a également été mise en évidence (Huang *et al.*, (2016)). Dans du muscle de bœuf stocké à 4°C durant 72 h *post mortem*, Huang *et al.*, (2016) ont démontré : l'activation de la caspase 3, le relargage du cytochrome c de la mitochondrie, une augmentation de l'expression de Bax et une diminution de l'expression de la protéine Heat-shock 27 (Hsp27). Ces données ont démontré que les conditions d'ischémie induites après la mort participent au processus d'apoptose dépendant de la voie mitochondriale.

D'autre part, des études ont corrélé les caractéristiques de l'apoptose *post mortem* (dégradation de l'ADN, activité des caspases 3/7/9) avec des paramètres de qualité de la viande de canard et de porc tels que : la tendreté, la capacité de rétention d'eau et la couleur de la viande (Zhang *et al.*, (2013), Cao *et al.*, (2010), Kemp *et al.*, (2006)).

Chez le modèle Humain, une surexpression de gènes liés à l'apoptose est observable dans des échantillons de quadriceps durant 16 h à 46 h *post mortem*. Toutefois, cette surexpression n'implique pas des marqueurs clés de l'apoptose suggérant que l'apoptose *post mortem* dérive du mécanisme d'apoptose physiologique observé « durant la vie » (Sanoudou *et al.*, (2004)).

Chez le thon (*Thunnus orientalis*), des changements structuraux au niveau des noyaux des cellules musculaires de filets ont été décrits au premier jour de conservation à 4°C (J0) : membrane nucléaire gonflée, chromatine condensée avec un aspect irrégulier. Ces dommages structuraux nucléaires sont d'autant plus accentués à J5. Les auteurs concluent que ces changements, qui affectent le noyau, sont caractéristiques de la nécrose (Roy *et al.*, (2012)).

Au vu de l'ensemble des données bibliographiques, il semblerait que l'apoptose soit le mécanisme le plus décrit et mis en évidence dans les conditions *post mortem* durant les premiers jours de conservation. L'activité des caspases, le rétrécissement cellulaire et les dommages de l'ADN sont les principales caractéristiques mises en évidence pour le démontrer.

L'apoptose est le processus de mort cellulaire retrouvé majoritairement dans de nombreux modèles d'étude. Ce travail de thèse s'appuie sur ces mécanismes dans les filets de poisson *post mortem* durant les premiers jours de conservation à basse température (entre 0 et 4°C). Ainsi, du fait de son rôle central dans l'apoptose, la mitochondrie est impliquée dans des mécanismes de mort cellulaire *post mortem*. Toutefois, l'ordre de ces évènements reste encore mal élucidé. L'ischémie établie dans les cellules *post mortem* peut inhiber la cytochrome c

oxydase dans la chaîne de transport des électrons (CTE). Ceci mène à une chute du $\Delta\Psi_m$ qui engendre une activation de Bax et Bak. L'activation de ces facteurs pro-apoptotiques va ensuite permettre la formation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) et donc rendre les membranes mitochondriales perméables. Le cytochrome c va ainsi être libéré dans le cytoplasme et induire l'apoptose en activant les caspases effectrices 3/6/7 (Brunelle et Chandel, (2002)).

Un autre scénario hypothétique possible est que l'ischémie établie *post mortem* provoque une diminution du taux d'ATP dans les cellules. Il en résulte une diminution de l'activité des pompes calciques de la membrane plasmique et par conséquent une perturbation de l'homéostasie calcique dans la cellule. Le niveau de calcium cytosolique va ainsi augmenter. Le $\Delta\Psi_m$ est préservé car l'ATP synthase fonctionne à revers permettant le maintien du gradient de protons. Le calcium en excès dans le cytosol va ainsi s'intégrer dans les mitochondries par le canal uniporteur mCU régulé par le $\Delta\Psi_m$ préservé. L'accumulation de calcium dans les mitochondries va engendrer la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). La perméabilité des membranes mitochondriales va aboutir à la libération de facteurs de mort cellulaires dans le cytosol (Dong *et al.*, (2006)).

b. Fonctionnalité et structure mitochondriales post mortem

D'un point de vue médical, la mort est définie comme une cessation irréversible de la respiration, de la circulation et des fonctions cérébrales. L'absence de circulation sanguine aboutit à une rapide consommation puis à la disparition de l'oxygène et par conséquent à l'instauration du métabolisme anaérobie dans les tissus de l'organisme. En parallèle, les nutriments ne sont plus apportés et les mécanismes dépendant d'énergie cessent. Des changements irréversibles vont alors s'effectuer dans les cellules. Il s'agit de l'autolyse. Elle correspond à une destruction des tissus sous l'action des enzymes lysosomiques, hydrolytiques et d'autres mécanismes induits suite à l'arrêt des pompes ioniques (Hostiuc *et al.*, (2017)). La vitesse d'autolyse est influencée par différents facteurs tels que la température et l'humidité (Hostiuc *et al.*, (2017)). Des études microscopiques ont démontré que l'évolution structurale des mitochondries dépendait fortement du type d'organe (Penttilä et Ahonen, (1976)). Après 20 jours *post mortem*, ces auteurs ont démontré que les mitochondries de cœur de rat (conservation à 19°C) restaient structurellement intègres. Dans les autres organes comme le foie, le rein et le pancréas, les mitochondries de rat sont fortement altérées à 24 heures *post mortem* dans le cas d'une conservation à 19-20°C.

Les premiers articles axés sur les fonctions et l'intégrité mitochondriales *post mortem* exposent des études réalisées chez des modèles de type bovin, humain et murin.

Cheah et Cheah furent les premiers à partir de 1971 (Cheah et Cheah, (1971), Cheah et Cheah, (1974)) à étudier *post mortem* l'intégrité et la fonctionnalité des mitochondries isolées de muscle squelettique. Leur étude a été menée dans le muscle de cou de bœuf. Les mitochondries ont été extraites d'un muscle conservé à 4°C dans un sac en polyéthylène durant : 0,5 ; 24 ; 70 ; 96 ; 120 et 144 heures. L'intégrité structurale des mitochondries est conservée *post mortem* entre 0,5 et 96 heures *post mortem*. A partir de 120 heures, seulement une faible population de mitochondries présente un aspect gonflé et une petite altération structurale. Le temps critique de conservation du muscle est estimé à 96 heures (soit 4 jours ou J4). Au-delà de cette durée de conservation, les paramètres ADP/O, RCI et la respiration à l'état 3 diminuent significativement. Après 8 jours de conservation à 2°C, 40 % de perte de cytochrome c est observé par rapport à J0. Le complexe III de la chaîne respiratoire est le moins perturbé des complexes de la chaîne respiratoire *post mortem*. Il est plus stable que les complexes I et II. Une autre étude a été menée sur des mitochondries isolées de muscle cardiaque bovin stockées sous vide à 4°C durant 2 heures ; 96 heures et 60 jours (Tang *et al.*, (2005)). Il est mentionné que l'intégrité structurale des mitochondries est conservée à 2 heures *post mortem*. A 96 heures de conservation, la majorité des mitochondries isolées (*in vitro*) et dans le tissu (*in situ*) présente un aspect gonflé. Etant donné les dommages structuraux à partir de 96 heures, l'intégrité fonctionnelle des mitochondries isolées est compromise sans toutefois être éliminée. En effet, le taux de consommation d'oxygène des mitochondries est plus faible (par rapport à 2 heures *post mortem*) mais toujours présent. Il y a donc une capacité des mitochondries à consommer de l'oxygène (96 heures *post mortem* et 60 jours *post mortem*) en dépit des dommages morphologiques. La plupart des enzymes y compris celles de la chaîne de transport des électrons sont encore actives après trois semaines. Les études de Cheah et Cheah, (1971) et Tang *et al.*, (2005) démontrent également l'importance du pH. Des conditions d'oxygraphie avec un pH faible (5,5) induiront un taux de consommation de l'oxygène des mitochondries ou du tissu plus faible que des conditions avec un pH se situant entre 7 et 7,2. De ce fait, l'évolution du pH dans la matrice analysée joue un rôle déterminant dans l'activité biochimique des mitochondries et donc *in fine* sur la qualité du produit. Les fonctions et l'intégrité mitochondriales *post mortem* ont également été suivies chez les modèles murin et humain (Barksdale *et al.*, (2010)). L'activité énergétique de mitochondries isolées de cerveaux humains et murins a été évaluée *post mortem* (conservation 4°C) à travers l'étude du potentiel de membrane avec la sonde fluorescente Rhodamine 123.

Chez la souris, l'intégrité structurale et fonctionnelle a été conservée jusqu'à 10 heures *post mortem*. Le $\Delta\Psi_m$ est encore présent à 24 heures *post mortem*. Après 24 heures de conservation, le cerveau étant un muscle mou, l'extraction des mitochondries devient difficile. Concernant les trois cerveaux humains analysés pendant 8,5 heures *post mortem* maximum, les résultats d'évaluation du $\Delta\Psi_m$ sont beaucoup plus variables. Ceci est imputable d'après les auteurs à des facteurs *pre mortem* des individus tels que : l'âge, l'utilisation de médicaments, et de possibles infections cérébrales.

À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée chez le modèle poisson sur l'étude des fonctionnalités mitochondriales *post mortem* à différents temps de conservation. Toutefois, des études basées sur la microscopie électronique à transmission ont mis en évidence les évolutions structurales *post mortem* des mitochondries de poisson. Ces études ne sont pas centrées sur les mitochondries. Mais, la structure des organites dans les cellules musculaires de filet de poisson est décrite à différents temps de conservation *post mortem*. Les travaux de Florenciano *et al.*, (2013) ont permis de mettre en évidence les changements structuraux des mitochondries *post mortem* chez le turbot (*Scophthalmus maximus*), le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) et la daurade royale (*Sparus aurata*). L'ensemble de ces travaux ont été réalisés sur des filets de poissons conservés à 4°C. Chez le turbot, il a été rapporté un gonflement des mitochondries à J1 (24 heures *post mortem*). À J7, le gonflement des mitochondries était accentué avec l'apparition de granules internes denses (Florenciano *et al.*, (2013)). Chez la daurade royale, les mitochondries sont gonflées pendant la phase de *pre rigor* (3 h *post mortem*). À J1, les mitochondries sont davantage gonflées et les crêtes sont altérées. À J5, des granules denses sont présentes dans les mitochondries (Ayala *et al.*, (2010)). Ces deux études ont en commun l'observation et la description de granules denses internalisées dans les mitochondries. Les auteurs n'expliquent ni leur nature ni leur origine. Toutefois, il est fort probable que ces granules correspondent à des agrégats de calcium, suite à la perturbation de l'homéostasie calcique dans les conditions *post mortem* (Dong *et al.*, (2006), Wolf *et al.*, (2017)). Chez le bar commun, le gonflement des mitochondries est également présent en phase de *pre rigor* à 3 heures *post mortem*. Les altérations mitochondriales à d'autres jours *post mortem* n'ont pas été analysées (Ayala *et al.*, (2005)). Chez le thon (*Thunnus orientalis*), les mitochondries de filets conservés à 4°C présentaient un aspect gonflé à J0 avec des altérations au niveau des membranes. A J5, les crêtes mitochondriales étaient dégradées et peu visibles (Roy *et al.*, (2012)).

V. Synthèse de l'étude bibliographique

De cette étude bibliographique, il en ressort premièrement que l'industrie de la pêche fait face à une constante et rapide évolution. En effet, l'import/export, la production (aquaculture) et la consommation de poisson ne cessent d'augmenter aussi bien à l'échelle mondiale qu'à l'échelle nationale. En France, les importations de poisson ont subi une très forte hausse et ne cessent d'augmenter depuis ces trente dernières années. La qualité de ces produits d'import liée à la fraîcheur doit être contrôlée. En parallèle, la pêche française dite « fraîche » doit être valorisée par rapport aux produits d'import. Il est également souligné, en première partie, le manque d'informations concernant le poisson vendu et en particulier la date de capture qui n'est toujours pas obligatoire à communiquer. De plus, le consommateur est, de nos jours, plus exigeant et vigilant concernant la qualité du produit consommé. Il en ressort que la recherche de marqueurs de fraîcheur pour contrôler la qualité des poissons constitue toujours un défi d'actualité important pour l'industrie de la pêche.

Dans une seconde partie, l'anatomie du poisson a été détaillée, puis les changements *post mortem* du poisson ont été décrits soulignant la périssabilité rapide de cette matrice et justifiant ainsi la recherche de marqueurs de fraîcheur précoces.

Dans une troisième partie, l'ensemble des méthodes permettant de déterminer la fraîcheur du poisson est décrit. Les avantages et les inconvénients de chaque méthode sont exposés. Il en ressort que les méthodes utilisées en routine dans l'industrie de la pêche ne constituent pas toujours des moyens efficaces pour déterminer la fraîcheur à un stade précoce.

Enfin, la quatrième et dernière partie est axée sur les mitochondries. Après avoir énoncé des généralités sur les mitochondries, l'accent a été porté sur le rôle des mitochondries dans les mécanismes de mort cellulaire ainsi que sur les différents composants impliqués dans les fonctions mitochondriales (transporteur, chaîne respiratoire, ATP synthase, potentiel membranaire…). Il est mentionné que les fonctions et l'intégrité mitochondriales sont préservées *post mortem* et que les processus de nécrose et surtout d'apoptose sont conservés dans ces conditions. Les fonctionnalités et l'intégrité mitochondriales peuvent ainsi constituer de potentiels marqueurs précoces et fiables pour déterminer la fraîcheur de filet de poisson.

Matériels et méthodes

I. Modèles d'étude

A. *La lignée cellulaire SAF-1*

La lignée cellulaire SAF-1 a été utilisée comme modèle de référence et de développement des méthodologies dans l'ensemble de ces travaux de thèse. SAF est l'acronyme de *Sparus aurata* fibroblast en anglais. La lignée cellulaire SAF-1 constitue l'unique modèle cellulaire de la daurade royale et représente une des rares lignées cellulaires de poissons marins aussi bien caractérisées. Cette lignée cellulaire fut développée en 1996 à partir d'une nageoire d'un spécimen adulte de daurade royale (Bejar *et al.*, (1997)). Il s'agit de cellules de type fibroblaste immortalisée spontanément (sans traitement immortalisant) dont la stabilité génétique et l'absence de contamination ont été vérifiées (Bejar *et al.*, (2005), Figure 24 ci-dessous). Les cellules, en provenance de l'ECACC (European Collection of Cell Culture, United Kingdom), ont été cultivées en milieu RPMI complété de 2 % de L-glutamine, 100 $U.mL^{-1}$ de pénicilline, de 100 $\mu g.mL^{-1}$ de streptomycine, 10 % de sérum de veau fœtal et 30 mM de NaCl. Les cellules ont été ensemencées à une concentration de 8000 cellules/cm² dans des flasques de culture à 25°C et 5 % de CO_2.

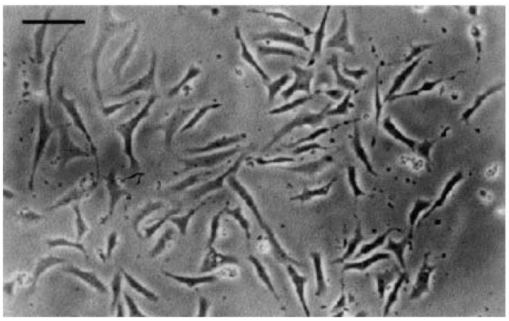


Figure 24 : Photographies de cellules SAF-1 en culture mettant en évidence la morphologie caractéristique des fibroblastes
La barre représente 100 µM. Source : Bejar *et al.*, (2005)

B. *Les filets de daurade royale (*Sparus aurata*)*

Nous avons utilisé comme modèle d'étude la daurade royale d'élevage (*Sparus aurata*) (Figure 25 page 96). La daurade royale appartient à l'ordre des perciformes et la famille des sparidés. C'est un poisson démersal d'une taille moyenne comprise entre 33 et 40 cm évoluant généralement à une profondeur comprise entre 1 et 30 mètres. Sa localisation géographique se situe majoritairement en Mer Méditerranée, en Mer du Nord et en Océan Atlantique du Nord, des côtes françaises jusqu'au sud du Maroc. Selon un rapport de la FEAP (Federation of European Aquaculture Producers, (2017)), la daurade royale est la troisième espèce de poisson d'élevage la plus cultivée en Europe avec 160 563 tonnes produits en 2016, derrière

le saumon et la truite. Afin d'obtenir une parfaite traçabilité de la date de capture, des conditions de vie et de minimiser les variabilités inter-espèces, nous avons effectué notre étude sur des daurades royales d'élevage de la ferme aquacole Aquanord (Gravelines, France) d'un calibre compris entre 300 et 400 g. Les conditions d'élevage étaient les suivantes : température de 18 ± 6°C, pH 8,2, concentration en ammoniac < 30 pmol, oxygène dissous 99 % (v / v) jusqu'à saturation (7 ppm). Les poissons ont été sacrifiés par asphyxie en hypothermie dans de l'eau glacée puis stockés dans des caisses en polystyrène avec de la glace pilée. A leur arrivé au laboratoire, moins de six heures après le sacrifice, les poissons sont immédiatement filetés. Ensuite, les filets sont entreposés dans des caisses en polystyrène sur lit de glace pilée en chambre froide à 4°C durant 4 jours : J0 (jour d'arrivée au laboratoire), J1 (24 heures de stockage), J2 (48 h), J3 (96 h) et J4 (120 h). Un film plastique est placé entre la glace et le filet afin d'en éviter le contact. A chaque jour d'expérimentation, un filet a été choisi au hasard.

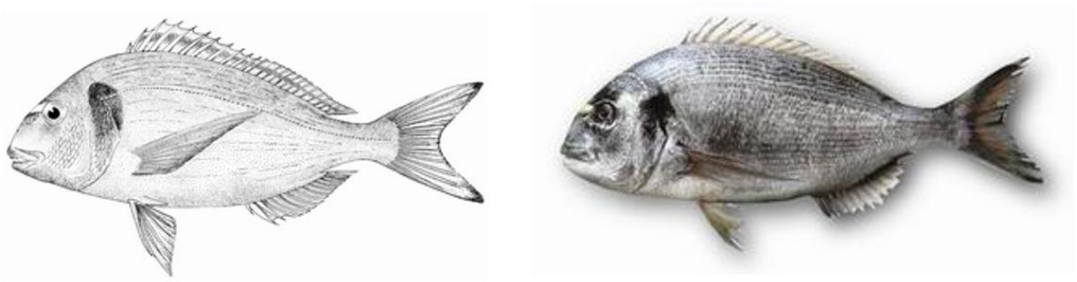


Figure 25 : Illustrations de la daurade royale (*Sparus aurata*)
source : FAO, (2016)

C. *La souche bactérienne :* Escherichia coli

Afin d'étudier les capacités du fluorimètre NanoDrop 3300 à évaluer un potentiel membranaire, nous avons utilisé la souche Gram négative *Escherichia Coli* (UN 3373) en provenance de l'Institut Pasteur de Paris (France). Les cellules ont été cultivées en milieu LB (Luria-Bertani) en étuve à 37°C. Pour chaque série d'expériences, une fraction d'*E. Coli* en phase stationnaire a été inoculée dans du milieu LB frais et incubé pendant 4 heures afin d'obtenir une population de bactéries en phase exponentielle.

II. Etude structurale des mitochondries par microscopie électronique à transmission (MET)

Des observations par microscopie électronique à transmission ont été effectuées afin d'étudier la structure et l'ultrastructure des cellules musculaires composant le filet de poisson mais

également des cellules de type fibroblaste de la lignée SAF-1. Les cellules SAF-1 ont été cultivées en flasque T175 jusqu'à une confluence de 75 % et détachées à l'aide d'un grattoir afin de minimiser le stress. Les morceaux de muscle de daurade royale ont été prélevés dans le filet à l'aide d'un scalpel (5 mm^3). Les tissus ou les culots de cellules SAF-1 ont été fixés dans une solution tampon contenant du dialdéhyde glutarique à 2,5 % et 0,1 M de cacodylate de sodium puis post fixés avec du tétroxyde d'osmium à 1 % dans le même tampon et colorés en bloc avec de l'acétate d'uranyle à 2 %. Après déshydratation à l'acétonitrile, les échantillons ont été incorporés dans une résine de type « epon » (Embed-812). Des coupes ultraminces (90 nm) ont été effectuées en utilisant un ultramicrotome Leica UC7 et récoltées sur une grille en cuivre possédant un maillage de 150 (150 lignes/pouce (150 mesh)). Après une coloration à l'acétate d'uranyle à 2 % préparé dans de l'éthanol à 50 % et une incubation avec une solution de citrate de plomb, des coupes ont été observées sur un microscope électronique à transmission Hitachi H-600 équipé d'une source d'électrons (fonctionnant à 75 kV) et d'un appareil numérique Hamamatsu C4742-95. Ces observations ont été réalisées en collaboration avec Anne-Sophie LACOSTE et Christian SLOMIANNY de la Plateforme d'Imagerie Cellulaire « Sciences et Technologies » de Lille (Bio Imaging Center Lille).

III. Extraction des mitochondries

A. Extraction de mitochondries de cellules de la lignée SAF-1

La méthodologie appliquée pour l'extraction des mitochondries des cellules de la lignée SAF1 (Figure 26 page 98) est adaptée de Pasdois *et al.*, (2011). Toutes les étapes d'extraction ont été effectuées en chambre froide à 4°C. L'extraction nécessite au préalable 6 flasques de culture T175 de SAF-1 à une confluence comprise entre 80 et 90 % afin de récupérer une quantité suffisante de mitochondries isolées. Dans une première étape, les cellules ont été détachées par action de la trypsine après rinçage au PBS (Phosphate Buffered Saline). L'ensemble des cellules des 6 flasques a été regroupé et centrifugé à 700 *g* durant 10 minutes puis resuspendu dans 3 mL de solution tampon d'extraction (180 mM KCl, 80 mM sucrose, 5mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, 2mM EGTA, pH 7,2 à 4°C) contenant 0,1 $mg.mL^{-1}$ de protéinase de type XXIV d'origine bactérienne (*Bacillus licheniformis*) durant 7 minutes. La suspension cellulaire a ensuite été homogénéisée à l'aide d'un broyeur de type Potter composé d'un piston en verre rugueux et d'un cylindre en verre borosilicaté. 30 à 40 allers-retours ont été appliqués avec le piston à la main afin d'éclater les cellules et d'en extraire les mitochondries. L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 7500 *g* durant 10 minutes. Le culot résultant a

été lavé puis resuspendu dans 3 mL de solution tampon d'extraction contenant 2 mg.mL^{-1} de BSA (Bovine Serum Albumin) et homogénéisé avec le broyeur de type Potter comme décrit précédemment.

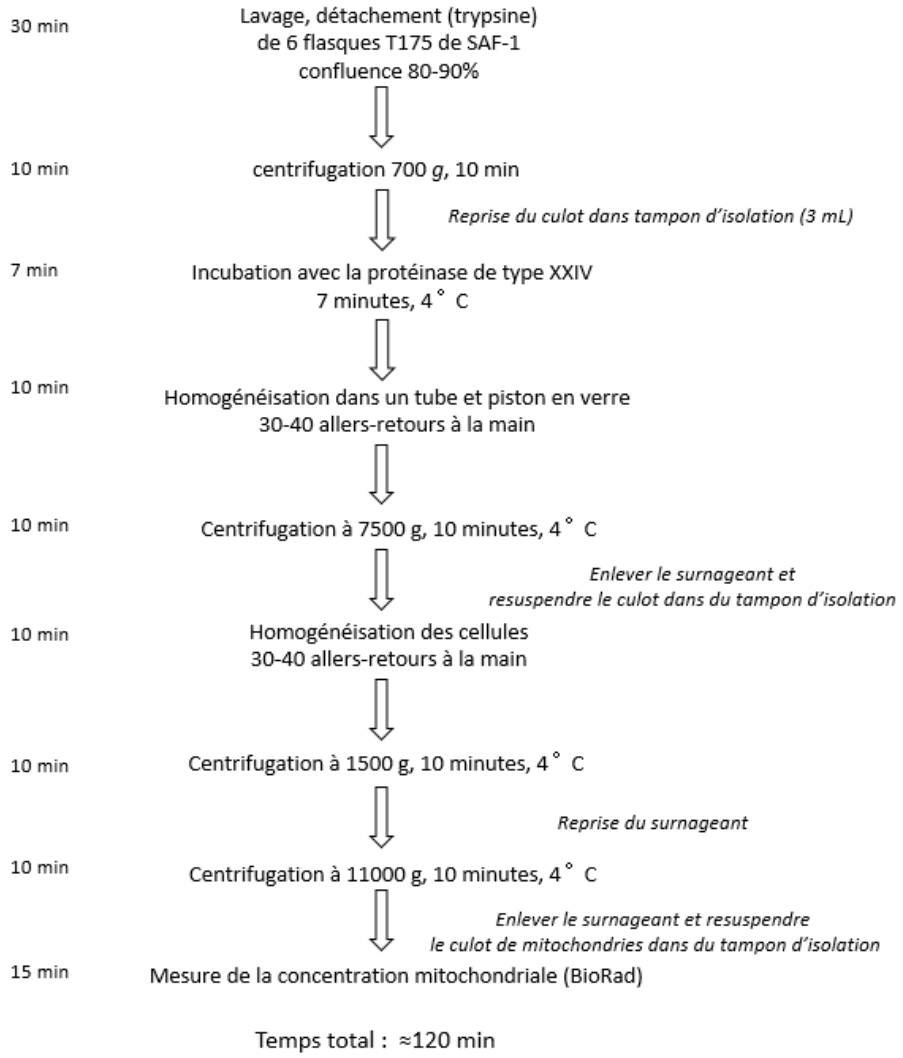


Figure 26 : Schéma résumant les grandes étapes et le temps nécessaire à l'extraction des mitochondries des cellules de la lignée SAF-1

L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 1500 *g* durant 10 minutes. Le surnageant résultant a été centrifugé à 11000 *g* durant 10 minutes. La fraction mitochondriale obtenue a ensuite été reprise dans 30 µL de solution tampon d'extraction afin de concentrer les mitochondries et ainsi de ralentir leur altération. La concentration de protéines mitochondriales a été déterminée en utilisant un kit Bio-Rad dérivé de la méthode de Bradford, (1976) (voir paragraphe « Dosage des protéines mitochondriales » page 100). Les mitochondries ont été conservées sur glace à 4°C à une concentration comprise entre 20 à 25 mg.mL^{-1} durant une période n'excédant pas 4 heures.

B. Extraction de mitochondries de filets de daurade royale

La méthodologie appliquée pour l'extraction des mitochondries des cellules musculaires de filets de daurade royale fut également adaptée de Pasdois *et al.*, (2011). Toutes les étapes d'extraction ont été effectuées en chambre froide à 4°C (Figure 27 ci-dessous). Dans une première étape, le muscle rouge du filet a été isolé puis découpé finement en petits morceaux de 2 à 3 mm^3 à l'aide de ciseaux et d'un scalpel. 10 grammes environ de petits morceaux de muscle rouge ont ensuite été incubés durant 7 minutes sous agitation dans 20 mL de solution tampon d'extraction (180 mM KCl, 80 mM sucrose, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, 2 mM EGTA, pH 7,2 à 4°C) contenant 0,1 $mg.mL^{-1}$ de protéinase de type XXIV.

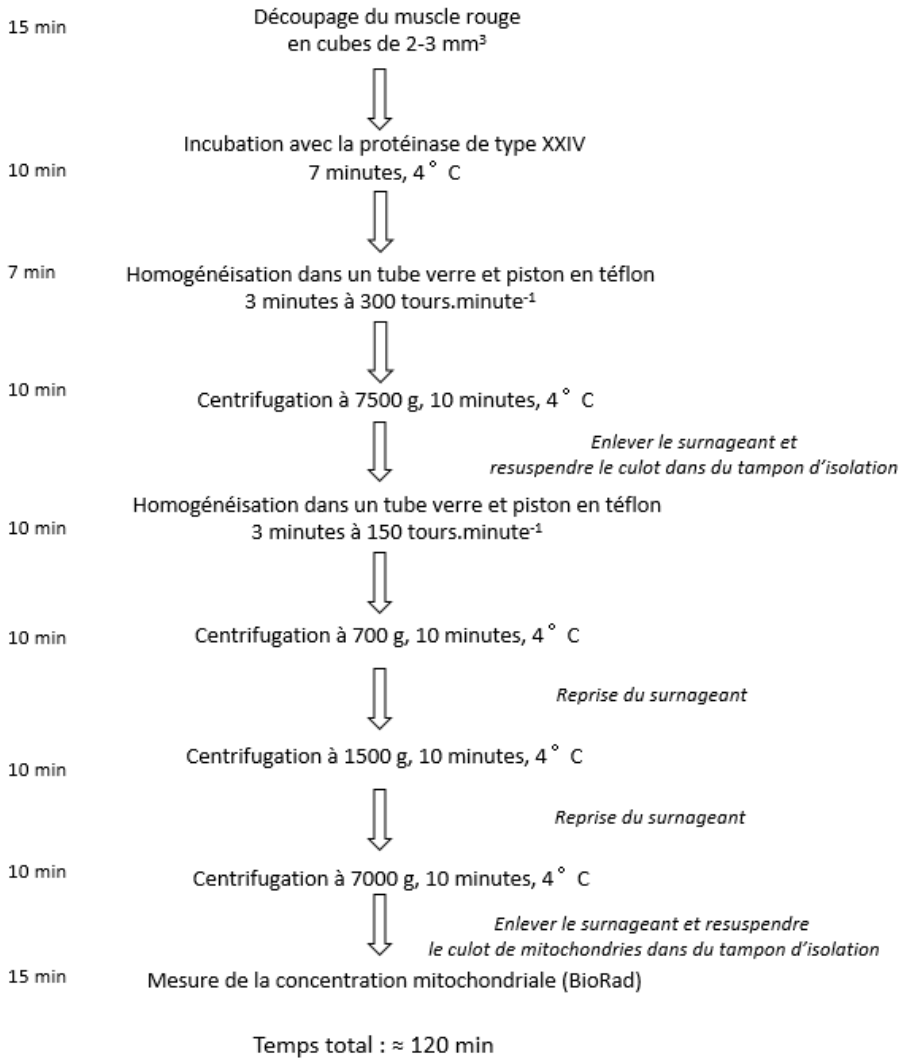


Figure 27 : Schéma résumant les grandes étapes et le temps nécessaire à l'extraction des mitochondries de filets de daurade royale

Le tissu en suspension a ensuite été homogénéisé à l'aide d'un piston en téflon dans un tube en verre de type Potter-Elvehjem durant 3 minutes à 300 $tours.min^{-1}$. L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 7500 *g* pendant 10 minutes. Le culot obtenu a ensuite été lavé puis

resuspendu dans 20 mL de tampon d'extraction contenant 2 mg.mL^{-1} de BSA et homogénéisé comme précédemment avec un piston motorisé à 150 tours.min^{-1} durant 3 minutes. L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 700 *g* durant 10 minutes. Le surnageant a été centrifugé à 1500 *g* durant 10 minutes. A la fin de cette étape de centrifugation, la majorité des gros débris cellulaires a été éliminé. Il s'agit entre autres des membranes et noyau des cellules. Le surnageant obtenu a alors été centrifugé à 7000 *g* durant 10 minutes afin de récupérer une fraction de mitochondries. Le culot mitochondrial a été récupéré dans 50 µL de tampon d'extraction. La concentration des mitochondries dans un petit volume permet de limiter leur exposition à l'oxygène et préserver le maintien de leur fonctionnalité plus longtemps. Aucune étape de centrifugation en solution de Percoll n'a été réalisée. Par conséquent, notre préparation en mitochondries n'est pas pure et peut éventuellement contenir des débris d'autres organites cellulaires tel que le réticulum sarcoplasmique, l'appareil de Golgi, des vacuoles... La concentration de protéines mitochondriales a été déterminée en utilisant un kit Bio-Rad dérivé de la méthode de Bradford, (1976). Les mitochondries ont été conservées sur glace à 4°C à une concentration comprise entre 80 à 100 mg.mL^{-1} durant une période n'excédant pas 4 heures.

C. Dosage des protéines mitochondriales

La concentration de protéines mitochondriales a été déterminée en utilisant le kit BioRad protein assay (Bradford, (1976)). Il s'agit d'un test colorimétrique utilisant le bleu de Coomasssie qui se fixe sur les acides aminés (notamment l'arginine) et les composés aromatiques des acides aminés. Ainsi, l'intensité du colorant dépend de la concentration protéique. Nous avons réalisé une gamme étalon en prenant comme standard des solutions de BSA à des concentrations de 0,1,/0,2/0,4/0,6/0,8 mg.mL^{-1}. Les dosages sont effectués en plaque de 96 puits. 200 µL de solution BioRad diluée au cinquième sont ajoutés dans les puits avec 4 µL de solution standard ou d'échantillon à doser. Un puits contrôle constitué d'eau ultrapure milli-Q ayant servi aux dilutions est effectué. La plaque est incubée 5 minutes à température ambiante avant lecture. L'absorbance des solutions est lue à 595 nm avec le spectrophotomètre µQuant (BioTek Instruments).

IV. Evaluation de la respiration mitochondriale par oxygraphie

L'oxygraphie est une méthode d'analyse très utilisée dans la recherche mitochondriale afin d'étudier la respiration mitochondriale en se basant sur la consommation d'oxygène (Frezza *et al.*, (2007)) (Figure 28 page 101). L'oxygraphe permet la mesure cinétique et/ou spatiale de

l'oxygène moléculaire en milieu gazeux ou en milieu liquide. Il est composé d'une électrode, elle-même constituée d'une cathode en platine et d'une anode en argent, soumise à une tension de 0,6 à 0,7 Volts. La cathode et l'anode sont en contact avec une solution conductrice de chlorure de potassium (KCl). Une membrane de téflon uniquement perméable à l'oxygène est présente afin de séparer la solution de KCl et le milieu à étudier comme une suspension de mitochondries isolées. L'oxygène du milieu étudié va ainsi traverser la membrane en téflon et être réduit au niveau de la cathode selon l'équation :

$$O_2 + 2\ H_2O + 4\ e^- \rightarrow 4\ OH^-$$

Au niveau de l'anode, suite à la dissociation du KCl (K^+ + Cl^-), il y a une réaction d'oxydation selon l'équation suivante :

$$4\ Cl^- + 4\ Ag \rightarrow 4\ AgCl + 4\ e^-$$

Le courant ainsi généré va être proportionnel à la concentration en dioxygène dissout dans le milieu à étudier. Ainsi, l'oxygraphie va permettre de suivre la consommation d'oxygène par les mitochondries isolées.

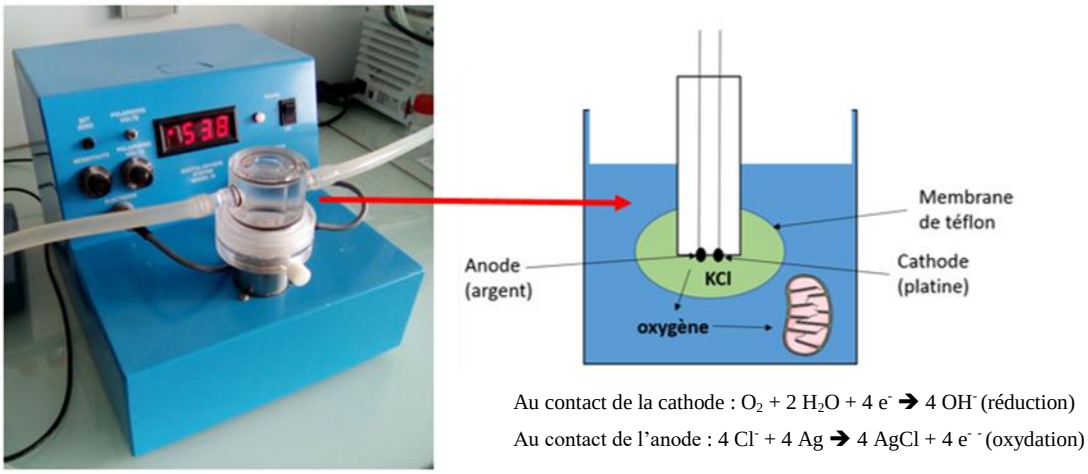


Figure 28 : Schéma explicatif du fonctionnement d'un oxygraphe

L'évaluation de la consommation d'oxygène par les mitochondries isolées a été réalisée par oxygraphie (Rank Brothers digital model 10, Cambridge, Royaume-Uni). Les acquisitions sont réalisées à 25°C sous agitation. Premièrement, 2,1 mL de tampon de respiration (KCl 125 mM, MOPS 20 mM, Tris 10 mM, EGTA 10 µM, KH_2PO_4 2,5 mM, BSA 2 mg/mL, pH 7,2) ont été ajoutés dans la chambre d'incubation de l'oxygraphe complémenté d'un mix de substrats respiratoires : glutamate (5 mM), malate (2 mM) et succinate (5 mM). L'acquisition est lancée afin d'établir la ligne de base durant 2 minutes puis les mitochondries isolées sont ajoutées dans la chambre d'incubation à une concentration de 0,2 $mg.mL^{-1}$. Les taux de consommation d'oxygène ont été évalués sans ou avec l'ADP (état basal et état 3

respectivement). Puis, le CAT (5 µM) a été ajouté afin de bloquer la consommation d'oxygène liée à la synthèse d'ATP. Afin d'évaluer l'intégrité de la membrane mitochondriale externe, 10 µM de cytochrome c exogène ont ensuite été injectés. Lorsque la membrane externe mitochondriale est altérée, le cytochrome c endogène est relargué de l'espace inter-membranaire. Dans ce cas, l'ajout de cytochrome c exogène stimule la respiration mitochondriale et augmente donc la consommation d'oxygène. Enfin, la molécule Carbonyl cyanide 3-chlorophénylhydrazone (CCCP) est ajoutée à une concentration de 2 µM. Le CCCP a une action ionophore en dissipant le gradient de protons à travers la membrane interne mitochondriale ($\Delta\Psi_m$). L'activité de la chaîne de transfert des électrons va augmenter afin de « compenser » la perte du $\Delta\Psi_m$. Il en résulte une augmentation de la consommation d'oxygène. Le milieu de respiration était en agitation dans la chambre d'incubation durant les acquisitions. La calibration a été réalisée en utilisant le dithionite de sodium afin d'atteindre le niveau 0 d'oxygène dans la chambre d'incubation.

Les taux de consommation d'oxygène (ou taux respiratoires) ont été déterminés pour les différents états respiratoires (basal, état 3 et CAT. Comme index de couplage mitochondrial, l'index de contrôle respiratoire (RCI) a été calculé selon la formule suivante :

$$RCI = \frac{état\ 3\ (ADP)}{CAT}$$

Ou l'état 3 est le taux de respiration durant la synthèse maximale d'ATP et CAT le taux de respiration qui n'est pas lié à la synthèse d'ATP.

L'intégrité de la membrane externe a été évaluée en calculant le pourcentage de stimulation de la consommation d'oxygène non liée à la synthèse d'ATP stimulée suite à l'ajout de cytochrome c exogène. En d'autres termes, le pourcentage d'augmentation du taux respiratoire entre la respiration à l'état basal et la respiration après ajout du cytochrome c exogène a été calculé.

Durant les étapes d'extraction, l'intégrité des mitochondries peut être impactée. Il en résulte une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et un relargage de cytochrome c. L'ajout de cytochrome c exogène peut ainsi permettre d'évaluer l'intégrité mitochondriale après extraction. Cela constitue une mesure de contrôle qualité. Le cytochrome c exogène ne peut pas pénétrer dans les membranes externes mitochondriales intactes. Ainsi, l'absence d'effet stimulant de la respiration après ajout de cytochrome c est représentatif d'une préparation de haute qualité.

V. Evaluation du potentiel membranaire par fluorimétrie

A. Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) des cellules SAF-1

1. Etude du $\Delta\Psi_m$ par microscopie à fluorescence

Le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) des cellules SAF-1 a été étudié en microscopie à fluorescence.

a. Marquage des cellules de la lignée SAF-1 pour analyse en microscopie à fluorescence

Les cellules ont été cultivées dans une plaque 6 puits dans du milieu RPMI (composition détaillée décrite dans la partie « La lignée cellulaire SAF-1 » page 95) jusqu'à une confluence comprise entre 50 et 60 %. Une lamelle en verre de microscopie stérilisée a été préalablement déposée au fond de chaque puits. L'action de l'agent découplant CCCP a été étudiée d'un point de vue « effet dose » et d'un point de vue « effet temps ». Pour l'étude de l'effet dose du CCCP, chaque puits de la plaque correspondait aux 6 conditions suivantes : non traitées (contrôle négatif)/10/20/50/100/200 µM de CCCP. Le temps d'exposition au CCCP était fixé à 20 minutes en milieu RPMI. Pour l'étude de l'effet temps, la concentration de CCCP était fixée à 10 µM avec des temps d'exposition de 3/24/48 heures. Après exposition au CCCP dans les deux types d'approches, les puits ont ensuite été lavés à trois reprises avec une solution de PBS afin d'éliminer toute trace de CCCP. Les cellules ont été incubées avec 10 $\mu g.mL^{-1}$ de sonde Rh123 (Chazotte, (2011)) durant 30 minutes. Après incubation, les puits ont été lavés trois fois afin d'éliminer toute présence de Rhodamine 123 qui pourrait provoquer un bruit de fond conséquent lors de l'analyse microscopique. Toutes les étapes d'incubation ont été effectuées dans une étuve à 25°C. Les lamelles présentes au fond de chaque puits, constituant des supports de croissance pour les cellules, ont ensuite été retirées et utilisées pour l'observation microscopique décrite dans la section « Etude structurale des mitochondries par microscopie électronique à transmission (MET) » page 96.

b. Analyse des cellules de la lignée SAF-1 par microscopie à fluorescence

Les analyses microscopiques en fluorescence (ou en épifluorescence) ont été réalisées avec l'appareil Zeiss HBO-50 (Microvision Instruments, France). En résumé, pour chaque puits, la lamelle où ont été cultivées les cellules SAF-1 dans la plaque 6 puits (voir partie « Etude du $\Delta\Psi_m$ par microscopie à fluorescence » page 103) est retournée sur une lame en verre sur une goutte de PBS préalablement déposée sur la lame. Puis, une observation est réalisée avec l'objectif X20. Pour l'observation, les réglages du microscope étaient : excitation : 4 sec,

finesse : 4, luminosité : 0. Les photographies sélectionnées ont ensuite été corrigées avec le logiciel Microsoft PowerPoint de la façon suivante : +30 % de luminosité et + 40% de contraste.

2. Etude du $\Delta\Psi_m$ par cytométrie en flux

Le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) des cellules SAF-1 a été étudié par cytométrie en flux. Dans ce cas, les cellules SAF-1 ont été cultivées en flasque T75. Après 48 heures de culture et une confluence atteinte comprise entre 60 et 80 %, les cellules ont été lavées au PBS puis décollées sous action de la trypsine durant 10 minutes. L'action de la trypsine a été annulée par ajout de milieu de culture puis les cellules ont été centrifugées à 700 g. Le culot de cellules a été lavé au PBS puis repris dans du milieu de culture. Les cellules ont été réparties dans 6 tubes Eppendorf de 1,5 mL (1 tube par condition) à une concentration de 1 million de cellules par mL. Les cellules ont été traitées à différentes doses de CCCP (10/20/50/100/200 µM) comme décrit précédemment dans le cadre des études microscopiques à fluorescence. Un contrôle a été réalisé en traitant les cellules uniquement avec le DMSO (2 % DMSO). Après traitement, les cellules ont été centrifugées à 700 g. Le culot cellulaire a été lavé au PBS puis repris dans du milieu de culture. Les cellules ont ensuite été marquées à la Rhodamine 123 (10µg.mL^{-1}) ou au Red CMXRos (100 nM) durant 30 minutes. Après marquage, les cellules ont été centrifugées à 700 g. Le culot cellulaire a été lavé au PBS puis repris dans du PBS. Dans le cas du marquage à la Rh123 uniquement, l'opération de centrifugation (700 g) et le lavage du culot au PBS ont été répétés deux fois. Les tubes ont été incubés dans la glace puis analysés par cytométrie en flux avec l'appareil Cytoflex (Beckman Coulter, Inc., États-Unis). Le laser bleu (488 nm) a été utilisé pour exciter les fluorochromes Rh123 et Red CMXRos. Le canal de fluorescence « FITC » (525 nm avec bande passante de 20 nm) a été utilisé pour la détection de l'émission de fluorescence de la Rh123. Le canal de fluorescence « PE » (585 nm avec bande passante de 42 nm) a été utilisé pour la détection de l'émission de fluorescence du Red CMXRos. Pour chaque mesure, 10 000 évènements ont été enregistrés à une vitesse de flux moyenne.

B. Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) de mitochondries isolées

1. Mesures avec le spectrofluorimètre SAFAS Xenius XC

Le spectrofluorimètre Xenius XC (SAFAS, Monaco) a été utilisé afin d'enregistrer la fluorescence de la Rh123 dans le but d'évaluer le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

des mitochondries extraites de cellules SAF-1 ou de filets de daurade royale à différents temps de conservation. Il est important de préciser que cette approche ne permet pas de mesurer ou de quantifier le $\Delta\Psi_m$ mais permet d'établir un index de qualité de la polarisation mitochondriale.

1 mL de tampon de respiration (KCl 125 mM, MOPS 20 mM, Tris 10 mM, EGTA 10 µM, KH_2PO_4 2,5 mM, BSA 2 mg/mL, pH 7,2) à 25°C est ajouté dans une cuve plastique de 3 mL avec la sonde Rh123 (50 nM) et les substrats respiratoires : malate (2 mM), glutamate (5 mM) et succinate (5 mM). La ligne de base de la fluorescence de la Rh123 libre a été enregistrée durant 2 minutes puis les mitochondries extraites ont ensuite été ajoutées à une concentration de 0,2 $mg.mL^{-1}$ dans la cuve. La génération d'un $\Delta\Psi_m$ mène à l'accumulation de la Rh123 dans la matrice mitochondriale et par conséquent au « quenching » de la fluorescence (accumulation de la sonde). Afin d'évaluer les fonctions mitochondriales, les molécules suivantes ont été ajoutées dans l'ordre suivant : ADP (1 mM), CAT (5 µM) et CCCP (2 µM). L'ajout d'ADP stimule la production d'ATP par l'ATP synthase qui utilise l'énergie des protons. En conséquence, le $\Delta\Psi_m$ va diminuer. L'ajout du CAT à l'inverse va bloquer l'effet de l'ADP en inhibant le transporteur ADP/ATP et « restaurer » le $\Delta\Psi_m$. Enfin le CCCP, en tant qu'agent dépolarisant, va effondrer totalement le $\Delta\Psi_m$. Le taux d'échantillonnage était de 1 Hz. Le voltage du tube photomultiplicateur était de 700 V. Les échantillons ont été excités à 500 nm et la fluorescence a été récupérée à 535 nm. La bande passante était de 15 nm pour l'excitation et l'émission.

Pour l'interprétation des résultats, l'intensité de fluorescence de la Rh123 enregistrée à différents états respiratoires (basal, état 3 (addition d'ADP), CAT) a été normalisé avec l'intensité de fluorescence enregistrée après l'ajout de CCCP selon la formule suivante :

$$100 - (\left(\frac{X - Y}{X}\right) * 100)$$

Avec : X = l'intensité de fluorescence de la Rh123 après ajout de CAT

Y = l'intensité de fluorescence de la Rh123 après ajout des mitochondries ou ADP ou CCCP

Le CCCP à 2 µM dépolarise complétement les mitochondries en perturbant le flux de protons établi par la chaîne respiratoire. Ainsi, l'intensité de fluorescence enregistrée après ajout du CCCP correspond uniquement à la dissipation du $\Delta\Psi_m$ et permet de prendre en compte l'intégration non spécifique de la sonde dans d'autres organites ou résidus de cellules tels que du réticulum sarcoplasmique.

2. Mesures avec le spectrofluorimètre NanoDrop 3300

Le potentiel membranaire des mitochondries extraites des cellules SAF-1 ou des filets de daurade royale a été estimé en utilisant le NanoDrop 3300. Le protocole de marquage des mitochondries extraites et de suivi de la fluorescence de la Rh123 est identique à celui utilisé avec l'appareil SAFAS Xenius XC décrit dans la section « Mesures avec le spectrofluorimètre SAFAS Xenius XC» page 104. Le blanc a été réalisé avec du tampon de respiration (composition décrite précédemment) contenant glutamate (5 mM), malate (2 mM) et succinate (5 mM). 2 µL d'échantillon sont déposés sur le socle d'acquisition de l'appareil puis l'intensité de fluorescence de la Rh123 est mesurée après ajouts successifs toutes les 2 minutes des mitochondries (0,2 $mg.mL^{-1}$), de l'ADP (1 mM), du CAT (5 µM) et du CCCP (2 µM). Pour chacune de ces 4 conditions, 5 mesures ont été effectuées. Tout comme pour les résultats obtenus avec le SAFAS Xenius XC, l'intensité de fluorescence de la Rh123 enregistrée à différents états respiratoires (basal, ADP (état 3), CAT) a été normalisé avec l'intensité de fluorescence enregistrée après l'ajout de CCCP. L'appareil NanoDrop possède trois sources d'excitation de l'échantillon. La source d'excitation White LED (champ d'excitation = 460 – 650 nm) a été choisie pour nos acquisitions avec la Rh123.

C. *Evaluation du potentiel membranaire bactérien (ΔΨ) à l'aide de sondes fluorescentes*

1. Marquage des bactéries pour la microscopie en fluorescence et le NanoDrop 3300

a. *Marquage des bactéries par les sondes Rh123 ou JC-10*

Les sondes Rhodamine 123 (Rh123) et JC-10 ont été utilisées afin d'évaluer le potentiel membranaire bactérien. Les cellules d'*E.coli* ont été inoculées en phase stationnaire dans du milieu LB frais. Après 4 heures de culture, les bactéries sont en phase exponentielle. Durant cette phase, la valeur du potentiel membranaire est élevée (Monfort et Baleux, (1996), Comas et Vives-Rego, (1997), Jiao *et al.*, (2004), Rezaeinejad et Ivanov, (2011)). Les bactéries sont récoltées après centrifugation à 9000 *g* durant 3 minutes et resuspendues en PBS (1 mL) (pH = 7,4). L'absorbance à 600 nm a été ajustée à 0,3 correspondant approximativement à 10^8 $cellules.mL^{-1}$. Ensuite 1 mL de cette préparation a été traité avec l'agent dépolarisant CCCP (0.5, 1 ou 20 µM) ou DMSO (1 µL) (contrôle négatif) et incubé durant 30 minutes à 37° C. La sonde DAPI (concentration finale = 5 $µg.mL^{-1}$) a été ajoutée à la suspension 10 minutes avant la fin de l'incubation mais seulement dans le cas du marquage à la Rh123. Après incubation, les cellules ont été centrifugées à 9000 g durant 3 minutes et le surnageant a été éliminé. Le

culot a ensuite été resuspendu dans du PBS contenant de la Rh123 à 10 µg.mL^{-1} ou du JC-10 (à une concentration donnée par le kit MAK160 ; Sigma, France) durant 30 minutes à 37°C à l'obscurité. Après incubation et seulement dans le cas du marquage avec la Rh123, les bactéries ont été centrifugées et le surnageant contenant la Rh123 en excès a été éliminé. Le culot a ensuite été resuspendu dans 1 mL de solution PBS et centrifugé à 9000 g durant 3 minutes. Le culot a été resuspendu dans 50 µL de solution PBS et la fluorescence de la rhodamine a été analysée par microscopie à fluorescence ou avec le spectrofluorimètre NanoDrop 3300.

Ce protocole a également été utilisé dans le cas où nous avons étudié l'impact de la congélation des bactéries sur le potentiel membranaire. Dans cette série d'expérimentations, l'effet cryoprotecteur du DMSO sur le potentiel membranaire bactérien a été mis en évidence. Dans ce cas, une étape de centrifugation (9000 g, 3 minutes) a été ajoutée pour les échantillons de bactéries congelées (stockées à -20°C ou -80°C avec ou sans 15 % de DMSO durant 24 heures) et les échantillons contrôles non congelés. Cette étape supplémentaire a été réalisée juste après la décongélation des échantillons dans le but de retirer toute trace de DMSO avant le marquage afin d'éviter tout effet toxique sur les cellules induites par le DMSO et également afin d'éviter les possibles effets du DMSO sur la dispersion du JC-10.

b. Marquage des bactéries par la sonde DAPI

Un protocole de marquage des bactéries *E. coli* avec la sonde DAPI a été établi pour l'estimation de la concentration bactérienne d'une solution avec le spectrofluorimètre NanoDrop 3300. L'intensité de fluorescence de la sonde DAPI est corrélée avec le nombre de bactéries analysées. 5 concentrations de bactéries en phase exponentielle (correspondant à différentes valeurs d'absorbances à 600 nm : 0,15/0,3/0,4/0,7/1) ont été marquées dans 1 mL de solution PBS contenant 5 µg.mL^{-1} de DAPI à 37°C durant 10 minutes à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 9000 *g* durant 3 minutes et le surnageant contenant le DAPI en excès a été retiré. Le culot a été resuspendu dans du PBS et la fluorescence du DAPI a été analysée avec le spectrofluorimètre NanoDrop 3300.

2. Etude du potentiel membranaire bactérien ($\Delta\Psi$) d'*E. coli* par microscopie à fluorescence

Les analyses microscopiques en fluorescence (ou en épifluorescence) ont été réalisées avec l'appareil Zeiss HBO-50 (Microvision Instruments, France). En résumé, 5 µL de chaque échantillon ont été observés sur une lame en verre couverte ensuite par une lamelle en plastique avec l'objectif X40 sous huile à immersion. Pour l'observation après marquage avec la Rhodamine 123, les réglages du microscope étaient : excitation : 90 msec, finesse : 4,

luminosité : -15. Pour l'observation après marquage avec le DAPI, les réglages du microscope étaient : excitation : 90 msec, finesse : 4, luminosité : -10.

3. Etude du potentiel membranaire bactérien (ΔΨ) d'*E. coli* avec le NanoDrop 3300

Le NanoDrop 3300 (Ozyme, France) est une spectrofluorimètre initialement conçu pour la quantification des acides nucléiques et des protéines. Cependant, il est possible de créer à partir du logiciel développé par Thermo Fisher Scientific des « méthodes » permettant de configurer de nouvelles analyses pour différents fluorochromes. Ainsi, nous avons pu créer une méthode pour analyser la fluorescence des sondes Rh123 et DAPI. Le logiciel propose préalablement d'exciter l'échantillon avec différentes sources d'excitation dans le but de sélectionner la plus adéquate pour chaque sonde. 3 sources d'excitation sont possibles : UV LED (maximum d'excitation = 365 nm), Blue Led (maximum d'excitation = 470 nm) et White LED (champ d'excitation = 460 – 650 nm). La source UV LED a été sélectionnée pour la sonde DAPI et la sonde White LED a été sélectionnée pour la Rh123, même si la sonde Blue LED peut être aussi efficace. Dans le cas de l'étude du potentiel membranaire bactérien, 2 µL de suspension bactérienne ont été utilisés pour la mesure de l'intensité de fluorescence. Les bactéries étant en suspension dans une solution de PBS, une acquisition avec 2 µL de solution PBS a été réalisée pour le blanc. Pour chaque échantillon, 5 mesures sont acquises comme préconisé par Thermo Fisher Scientific.

VI. Détermination de la viabilité bactérienne

Dans le but d'établir une corrélation entre mortalité bactérienne et perturbation du potentiel membranaire, un dénombrement bactérien a été réalisé en utilisant la méthode de l'étalement en surface avec 1 mL d'échantillon sur gélose dans une boîte de Pétri. Au total, 5 conditions ont été testées : bactéries non congelées (contrôle négatif), bactéries congelées à -20°C, bactéries congelées à -20°C avec 15 % de DMSO, bactéries congelées à -80°C, bactéries congelées à -80°C avec 15 % de DMSO. L'énumération a été réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C. L'impact de la congélation sur le dénombrement bactérien a été mis en évidence par le calcul du « log inactivation », d'après la formule proposée par Gao *et al.*, (2009) :

$$Log\ inactivation = (\log_{10} N - \log_{10} N_0)$$

Avec : N_0 = concentration cellulaire avant congélation

N = concentration après congélation

VII. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS 17. Chaque expérience a été réalisée au moins en triplicata. Pour chaque expérimentation, le nombre exact de réplica est indiqué dans la figure correspondante. Les données sont exprimées en valeur moyenne avec l'écart type standard correspondant (±). Des tests de Student (T-test) ont été réalisés afin de mettre en évidence les différences entre les moyennes calculées ($P \leq 0,05$) et des tests de Levene afin de déterminer l'homogénéité des variances.

Travaux de recherche

I. Analyse morphologique des cellules SAF-1 et des tissus de daurade royale par microscopie électronique à transmission

Afin d'étudier l'intégrité mitochondriale dans les cellules SAF-1 et dans les filets de daurade royale, une analyse structurale des cellules SAF-1 et des cellules musculaires de filets a été réalisée par microscopie électronique à transmission. Cette analyse a permis d'obtenir des données concernant la morphologie, la structure, l'organisation des cellules de poisson et leurs organites tels que les mitochondries. Ces observations microscopiques nous ont également permis d'analyser l'évolution structurale *post mortem* des cellules musculaires de filets de daurade royale à différents temps de conservation à 4°C. Une collaboration avec la plateforme d'imagerie cellulaire « Bio Imaging Center » de Lille nous a permis de réaliser ces études microscopiques.

A. Lignée cellulaire SAF-1

La lignée cellulaire SAF-1 est le modèle de référence pour réaliser une étude préliminaire *in vitro* sur la daurade royale (Bejar *et al.*, (1997)). La majorité des études réalisées sur SAF-1 aborde une thématique bactériologique (Cuesta *et al.*, (2008), Acosta *et al.*, (2009)), virologique (Perez-Prieto *et al.*, (1999), Bandín *et al.*, (2006)) ou éco-toxicologique (Morcillo *et al.*, (2016)). A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux caractéristiques mitochondriales des cellules SAF-1 telles que leur morphologie, leur composition ou encore leur activité. Nous avons souhaité pour la première fois étudier la morphologie mitochondriale des cellules SAF-1. Pour cela, une étude structurale des mitochondries a été réalisée chez la lignée SAF-1 par microscopie électronique à transmission (MET). Les cellules SAF-1 ont été cultivées jusqu'à atteindre une confluence de 75 % dans la flasque de culture. Après détachement et centrifugation, elles ont été immédiatement fixées puis stockées à 4°C en vue d'une observation microscopique (Figure 29 page 114). Nous avons choisi de ne pas dépasser une confluence de 75 % dans les flasques de culture afin de minimiser d'éventuelles altérations cellulaires dues à de fortes confluences.

L'ensemble des mitochondries des cellules SAF-1 présente les caractéristiques décrites pour la première fois de façon complète par Palade, (1952) chez le rat (lignée Wistar). Certaines mitochondries observées sont sphériques (globulaires) (Figure 29.a,b) alors que d'autres ont un aspect filamenteux en forme de bâtonnet (Figure 29.d). Pour la plupart des mitochondries, la morphologie générale et les structures sont intactes. Les membranes externes et internes

sont bien visibles, discernables tout comme les crêtes qui sont de type lamellaire ou sacculaire.

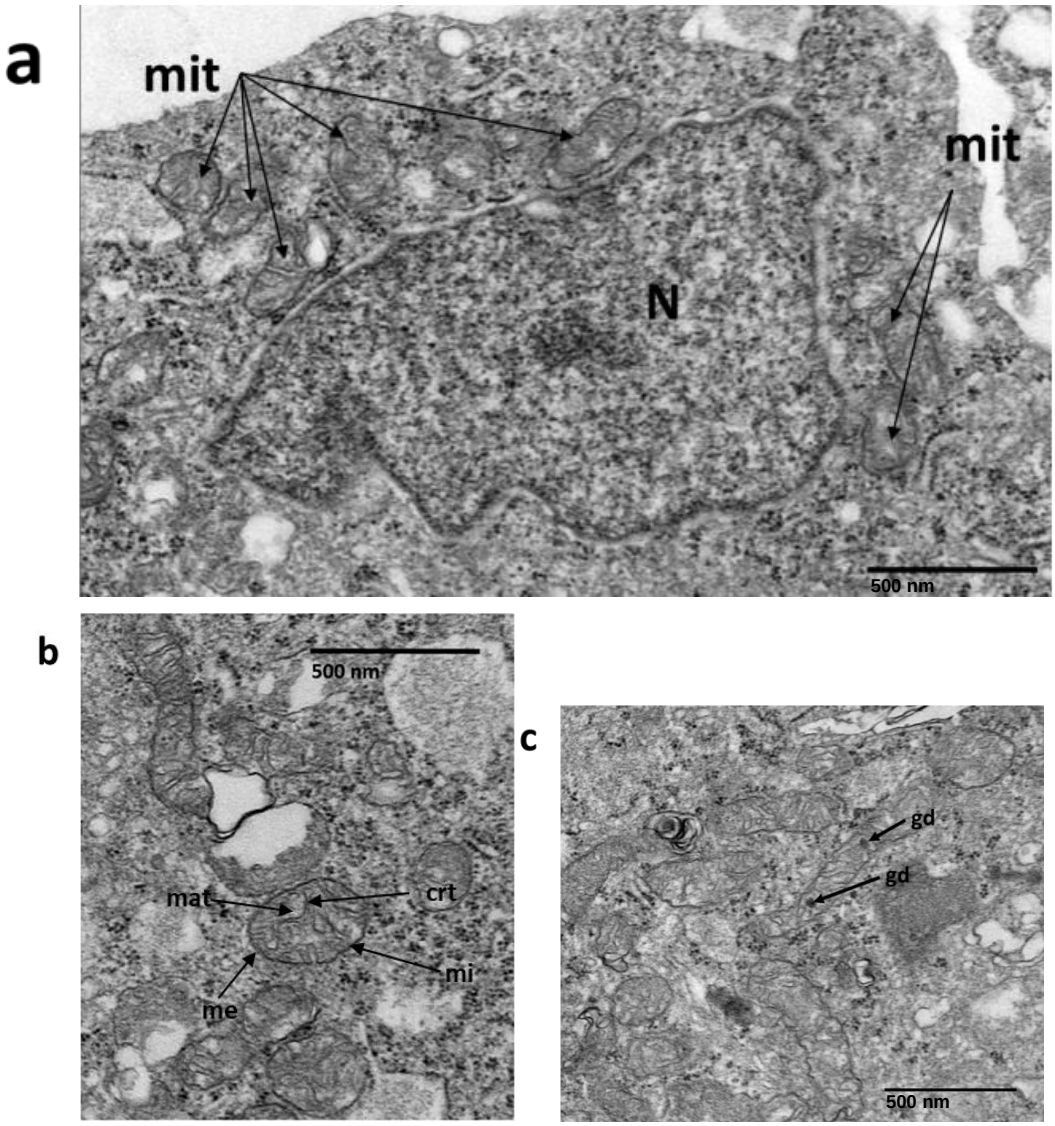


Figure 29 : Observation structurale des cellules SAF-1 par microscopie électronique à transmission (MET)
a : noyau (**N**) entouré de mitochondries (**mit**)
b : mitochondries sphériques ou en bâtonnets. **crt** : crête ; **mat** : matrice ; **me** : membrane externe ; **mi** : membrane interne.
c : Présence de quelques granules denses (**gd**) autour de quelques mitochondries
Barre d'échelle : 500 nm.

Les mitochondries sont réparties de façon uniforme autour du noyau (Figure 29.a). Celles qui sont très allongées peuvent être le résultat « d'assemblages », autrement dit le résultat d'une fusion. Cette morphologie permet d'obtenir un large réseau mitochondrial bénéfique pour les cellules métaboliquement très actives. A l'inverse, les mitochondries plus petites à forme sphérique ou en petit bâtonnet sont plus présentes dans les cellules peu actives ou en quiescence comme a pu le montrer Westermann, (2010). Chez quelques rares mitochondries, des granules denses sont visibles dans la matrice (Figure 29.c). Ces amas correspondent à des

granulations de calcium (Ca^{2+}) (Wolf *et al.*, (2017)). En condition normale, les mitochondries participent à la régulation du Ca^{2+} cytoplasmique et par conséquent à l'homéostasie du Ca^{2+} dans les cellules. Elles ont ainsi un rôle de tampon. De plus, l'accumulation de Ca^{2+} dans les mitochondries régule le métabolisme mitochondrial (Duchen, (2000)). La présence de granulations de calcium n'est donc pas systématiquement imputable à une cellule à l'état pathologique.

Concernant la taille, le diamètre moyen des mitochondries à forme sphérique est d'environ 0,3 µm sans jamais dépasser 0,5 µm. D'après des mesures effectuées sur plusieurs clichés, les mitochondries de type bâtonnet présentent une largeur moyenne d'environ 0,13 µm sans grandes variations. A l'inverse, la longueur de ce type de mitochondries varie grandement allant de 0,4 µm à 1,1 µm. Nous pouvons estimer une longueur moyenne de 0,7 µm. D'un point de vue général, la longueur des mitochondries est de l'ordre de 1 à 2 µm tandis que la largeur est comprise entre 0,1 et 0,5 µm (Frey et Mannella, (2000), Palade, (1952)). La taille des mitochondries varie grandement au niveau de la longueur mais leur diamètre ou largeur sont souvent constants dans la plupart des cellules (0,5 ± 1,0 µm) (Griparic et van der Bliek, (2001)). La morphologie et la taille mitochondriales dépendent également du type cellulaire. Les mitochondries des fibroblastes sont habituellement de type longiforme d'une longueur comprise entre 1 à 10 µm et d'une largeur moyenne de 0,7 µm. A l'inverse, les mitochondries d'hépatocytes sont majoritairement sphériques (Youle et van der Bliek, (2012)). Nous en déduisons que les différentes tailles des mitochondries des cellules SAF-1 se situent dans la fourchette de taille habituellement observée. Toutefois, nous pouvions nous attendre à observer plus de mitochondries longiformes de grande taille (1 à 10 µm de longueur) étant donné le type fibroblastique des cellules SAF-1. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les cellules SAF-1 ont été développées artificiellement à partir de nageoires de daurade royale adulte (Bejar *et al.*, (1997)). Cela peut expliquer que certaines caractéristiques fibroblastiques ne sont pas présentes.

B. Cellules musculaires de filets de daurade royale

Les cellules musculaires de filets de daurade royale ont ensuite été étudiées par MET en se focalisant sur les mitochondries. Cette observation nous a permis d'avoir des informations générales sur la morphologie, la structure des cellules musculaires de filet de daurade royale et de leurs composants tels que la mitochondrie. Elle nous a également permis d'évaluer les changements structuraux *post mortem* à différents temps de conservation à 4°C de J0 à J6 : J0

(6 h PM : Figure 30 ci-dessous), J3 (72 h PM : Figure 31 page 117), J4 (96 h PM : Figure 32 page 118), J6 (144 h PM : Figure 33 page 119).

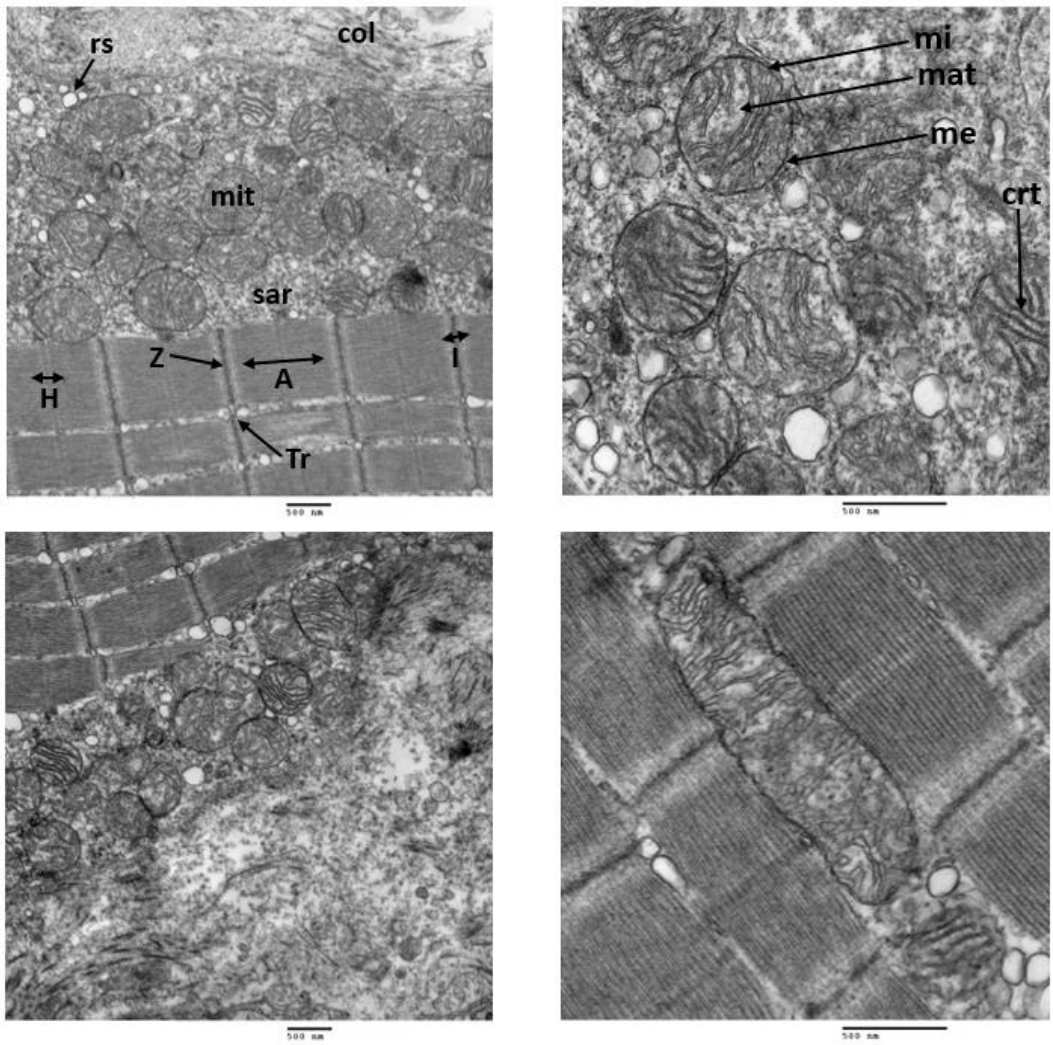


Figure 30 : Sections longitudinales de muscles de daurade royale à 6 heures *post mortem* (J0).
A : bande A ; **col :** collagène ; **crt :** crête ; **H :** bande H ; **I :** bande I; **mat :** matrice ; **me :** membrane externe ; **mi :** membrane interne ; **mit :** mitochondrie ; **rs :** réticulum sarcoplasmique ; **sar :** sarcoplasme ; **Tr :** triade ; **Z :** ligne Z. Barre d'échelle : 500 nm.

À J0 (Figure 30 ci-dessus), les myofibrilles, étaient caractérisées par différentes bandes (bandes I et bandes A) et lignes (lignes Z et lignes M) bien organisées et intactes. Les myofilaments d'actine et de myosine constituant les sarcomères (unité de base des myofilaments) étaient bien définis et leur alignement parallèle. Tous les éléments des myofibrilles étaient ainsi clairement visibles et intactes. La majorité des mitochondries possédait une forme de type sphérique dont le diamètre excède souvent 0,5 µm. De rares mitochondries de type bâtonnet étaient également observables d'une longueur d'environ 2 µm et d'une largeur de 0,5 µm. La grande majorité des mitochondries avait une structure intacte. La matrice était dense de par son aspect sombre et grisâtre. Les crêtes étaient nombreuses,

compactes et bien organisées sous forme lamellaire. Cette forme lamellaire est caractéristique des cellules à haute activité comme les cellules musculaires. Pour la majorité des mitochondries, les deux membranes (externe et interne) étaient visibles et bien définies avec une forme régulière.

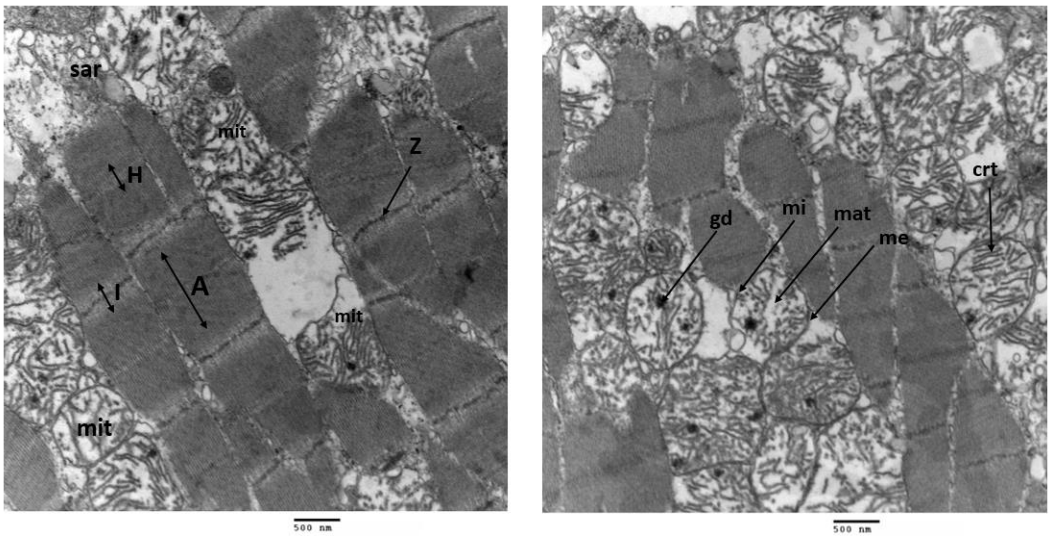


Figure 31 : Sections longitudinales de muscles de daurade royale à 72 heures *post mortem* (J3).
A : bande A; **crt :** crête ; **gd :** granule dense ; **H :** bande H ; **I :** bande I; **mat :** matrice ; **me :** membrane externe ; **mi :** membrane interne ; **mit :** mitochondrie; **sar :** sarcoplasme; **Z :** ligne Z. Barre d'échelle : 500 nm.

Les intervalles *post mortem* J3 et J4 constituent les stades précoces de l'altération du poisson au cours desquels les réactions d'autolyse sont majoritaires.

À J3 (Figure 31 ci-dessus), une désorganisation des bandes I et des bandes H a été observée à partir de J3. Une perturbation de l'alignement parallèle des lignes Z, a été observée. Les myofilaments d'actine et de myosine n'étaient plus alignés et serrés entre eux et divers espaces étaient visibles entre les sarcomères. La morphologie mitochondriale avait également évolué. Les mitochondries présentaient un aspect gonflé. La forme des membranes était discontinue et à certains endroits endommagée. Les crêtes avaient perdu leur organisation et sont apparues plus étendues ou ont parfois disparu dans certaines mitochondries. La matrice avait un aspect plus blanchâtre, pâle avec la présence de quelques rares granules denses.

À J4 (Figure 32 page 118), la situation a légèrement évolué par rapport à J3. La désorganisation des bandes I et des bandes H s'est amplifiée. L'alignement parallèle des lignes Z était davantage perturbé. Les espaces entre les sarcomères se sont accentués. La dégradation des mitochondries s'est également légèrement accentuée. Certaines d'entre elles présentaient des ruptures au niveau des membranes.

L'intervalle J6 *post mortem* a également été choisi car il est estimé comme la limite de transition entre les stades précoces d'altération due à l'autolyse et les stades tardifs d'altération associés à l'activité microbienne (Huss et Asenjo, (1976), Ghaly *et al.*, (2010)).

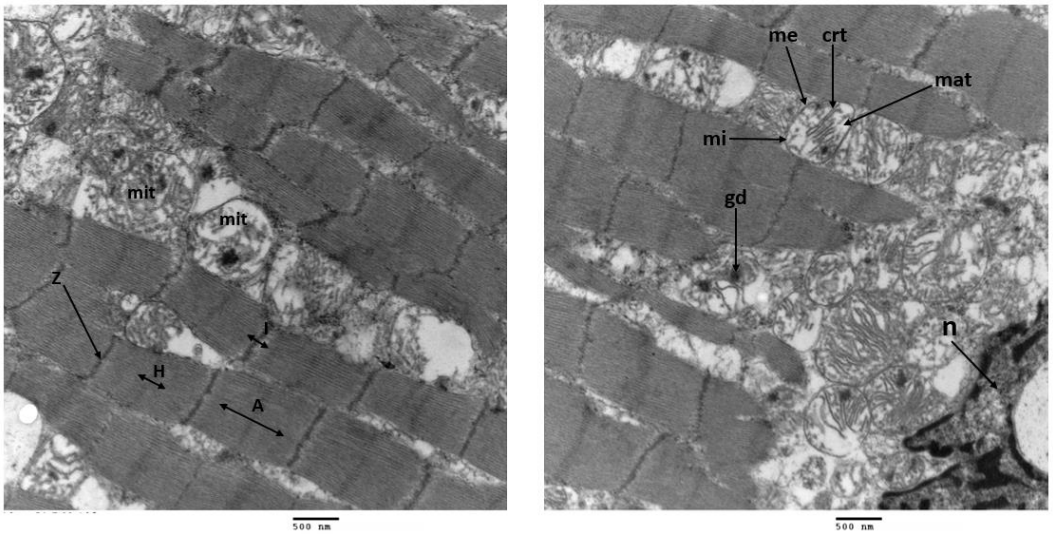


Figure 32 : Sections longitudinales de muscles de daurade royale à 96 heures *post mortem* (J4).
A : bande A; **crt :** crête ; **gd :** granule dense ; **H :** bande H ; **I :** bande I; **mat :** matrice ; **me :** membrane externe ; **mi :** membrane interne ; **mit :** mitochondrie; **n :** noyau; **Z :** ligne Z. Barre d'échelle : 500 nm.

À J6 (Figure 33 page 119), les bandes I et les lignes Z ont complétement disparu. Les myofilaments étaient sévèrement dégradés. Les mitochondries étaient toutes gonflées La matrice mitochondriale apparaissait blanchâtre, pâle. La totalité des mitochondries présentaient des granules denses dans la matrice. Les crêtes avaient disparu et celles encore présentes étaient très dégradées.

Ces images de microscopie électronique nous ont donc permis d'étudier et de mettre en évidence les changements structuraux des mitochondries de filets de poissons à différents temps de conservation à 4°C.

À J0 (6 h PM : Figure 30 page 116), l'intégrité structurale des cellules musculaires de poisson est conservée. L'arrangement des myofibrilles est conservé et bien organisé. Aucun espace entre les sarcomères n'a été observé et le collagène était encore visible. Ces observations sont en corrélation avec d'autres études décrivant une bonne conservation des myofibrilles de cellules de filets de daurade royale (Caballero *et al.*, (2009), Ayala *et al.*, (2010), Ayala *et al.*, (2011)). Certains auteurs ont observé les mitochondries de cellules musculaires de poisson à J0 (Ayala *et al.*, (2010)). Chez la daurade royale (filets conservés à 4°C), le gonflement d'organelles tels que les mitochondries et le réticulum sarcoplasmique durant la phase de *pre rigor* 3 heures *post mortem* a été mis en évidence. Une autre étude de ces mêmes auteurs menée sur le bar commun a mis en évidence une rapide évolution de la structure

mitochondriale (avec gonflement) à 3 heures *post mortem* (Ayala *et al.*, (2005)). D'autre part, Roy *et al.*, (2012) ont décrit la présence de mitochondries altérées avec des crêtes désorganisées dans des cellules musculaires de thon rouge du Pacifique à J0. Dans notre cas, la majorité des mitochondries à J0 observées étaient intactes ou très faiblement altérées.

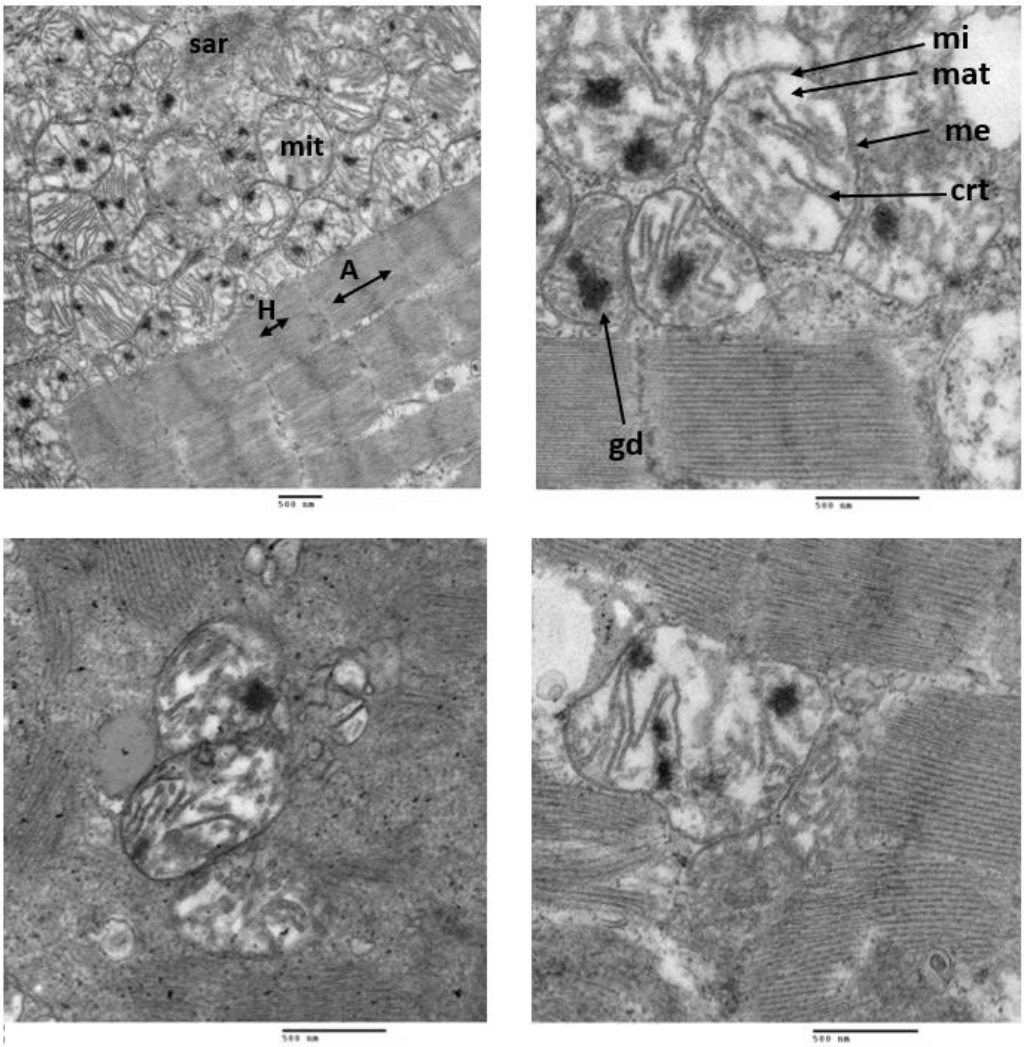


Figure 33 : Sections longitudinales de muscles de daurade royale à 144 heures *post mortem* (J6). **A :** bande A; **crt :** crête ; **gd :** granule dense; **H :** bande H; **mat :** matrice ; **me :** membrane externe ; **mi :** membrane interne ; **mit :** mitochondrie; **sar :** sarcoplasme. Barre d'échelle : 500 nm.

La conservation de l'intégrité mitochondriale à J0 est également rapportée dans des études centrées sur les cellules de mammifères. Ces dernières ont démontré une bonne conservation des structures mitochondriales plusieurs heures après la mort de l'organisme (Tang *et al.*, (2005), Cheah et Cheah, (1971), Cheah et Cheah, (1974), Barksdale *et al.*, (2010)). D'un point de vue structural, il en ressort que les mitochondries de daurade royale subissent peu de changements quelques heures après la mort tout comme chez les mammifères.

A J3 (Figure 31 page 117), J4 (Figure 32 page 118) et J6 (Figure 33 ci-dessus), nous avons observé de nombreux dommages au niveau des myofibrilles dans les cellules musculaires de

filet de daurade royale. Ayala *et al.*, (2010) ont rapporté les mêmes dommages structuraux des myofibrilles à J5 dans les cellules musculaires de daurade royale : altérations des sarcomères au niveau des bandes I, des filaments d'actine et des lignes Z. De J3 à J6, notre observation s'est ensuite centrée sur les mitochondries qui présentaient un gonflement avec des membranes fragmentées et la présence de granules denses dans la matrice. Ces granules denses ont été observées par Ayala *et al.*, (2010) à J5 chez la daurade royale. Ils les ont qualifié de « dense internal material ». Leur présence *post mortem* est également présentée dans des mitochondries de mammifères (pancréas de rat, 4 h *post mortem*) (Kuypers et Roomans, (1980)). Comme évoqué précédemment, ces granules denses correspondent à des agrégats de calcium. Wolf *et al.*, (2017) ont récemment étudié la morphologie et les quantités d'agrégats de calcium présents dans les mitochondries. Dans ces travaux, les images de microscopie électronique ont mis en évidence des dépôts de calcium dont la forme s'apparente aux granules denses observées dans notre étude. Lorsque la cellule subit des dommages, en condition d'ischémie-reperfusion par exemple, l'homéostasie du calcium est perturbée. Il en résulte une entrée massive de calcium dans les mitochondries causant des altérations structurales aux mitochondries et par conséquent la libération de facteurs induisant la mort cellulaire (Dong *et al.*, (2006)). Les mécanismes d'apoptose induits par une forte accumulation de calcium dans les mitochondries sont également décrits par Giorgi *et al.*, (2012). Nous pouvons supposer que les phénomènes d'agrégation du calcium décrits par Dong *et al.*, (2006) en condition d'ischémie sont similaires à ceux retrouvés *post mortem* dans les cellules musculaires de poisson qui sont également privées d'oxygène.

Une comparaison entre les images de MET de SAF-1 et de cellules musculaires de filets de daurade royale permettent de mettre en évidence quelques différences. D'un point de vue général, les mitochondries de filets de daurade royale sont de plus grande taille avec un contenu matriciel plus dense. Le ratio entre le nombre de mitochondries et le volume cellulaire est également plus élevé dans les cellules musculaires de filet. Ces observations nous laissent supposer que l'activité mitochondriale serait plus importante dans les mitochondries de filet que dans les cellules SAF-1.

A ce niveau, au vu des données microscopiques, nous pouvons supposer que les fonctions et l'intégrité mitochondriales sont conservées et analysables à J0 (3 h PM) tout comme dans l'étude de Barksdale *et al.*, (2010). Dans ce sens, d'après les images de microscopie à J3, J4 et J6, les fonctions et l'intégrité mitochondriales sont négativement impactées étant donné les nombreuses altérations structurales mises en évidence à ces temps de conservation *post mortem*.

Ces résultats ont fait l'objet d'une partie de la publication soumise à *Food Chemistry* (Annexe 2 page 207).

Les chapitres suivants vont ainsi exposer les expérimentations menées sur l'analyse des fonctions et de l'intégrité mitochondriales *post mortem* des cellules musculaires de filets de daurade royale. La lignée cellulaire SAF-1 a servi de modèle d'étude de référence et de témoin dans le développement de nos méthodologies.

II. Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) sur cellules entières

Le travail sur les lignées cellulaires SAF-1 a pour objet d'estimer les fonctions mitochondriales et de mettre en évidence la dissipation du $\Delta\Psi_m$ par le choix de drogues ciblées afin d'établir une méthodologie applicable ensuite à l'étude des tissus de daurade royale. Le $\Delta\Psi_m$ est un composant de la force protomotrice qui représente un élément majeur et essentiel dans le processus de phosphorylation oxydative. Il joue également un rôle dans l'homéostasie mitochondriale à travers l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles. De plus, il constitue une force motrice pour les ions et les protéines qui est nécessaire pour le bon fonctionnement des mitochondries (Zorova *et al.*, (2018)). L'estimation du $\Delta\Psi_m$ est ainsi un bon indicateur des fonctions et de l'intégrité mitochondriales. Dans un premier temps, nous avons étudié *in vitro* en test préliminaire le $\Delta\Psi_m$ chez la lignée cellulaire SAF-1 à travers deux approches : la microscopie à fluorescence et la cytométrie en flux.

A. *Microscopie à fluorescence*

Les cellules SAF-1 ont été analysées par microscopie à fluorescence (MF) après marquage avec la sonde de potentiel membranaire Rhodamine 123. Cette dernière a émergé dans les années 1980 et y a été grandement utilisée chez des cellules de mammifères (rat, souris, humain). A notre connaissance, aucune publication ne recense une étude du potentiel membranaire mitochondrial par microscopie à fluorescence chez des cellules de poisson.

Le potentiel membranaire a été artificiellement altéré en utilisant l'agent découplant CCCP soit à différentes concentrations (Figure 34 page 122), soit à différents temps d'exposition à concentration fixe (Figure 35 page 123).

Les cellules ont été marquées à différentes concentrations de CCCP (10/20/50/100/200 µM) durant un temps court de 20 minutes (Figure 34). Dans le cas où les cellules sont non traitées (Figure 34.A), les mitochondries apparaissent sous forme d'un réseau filamenteux vert réparti tout le long de la cellule, comparable aux observations d'études antérieures (Johnson *et al.*,

(1980), Hollenbeck *et al.*, (1985), Chen, (1988), Lum et Nagley, (2003)). Ce réseau délimite le noyau de forme sphérique. Ce dernier occupe, dans la plupart des cellules, une position centrale dans le cytoplasme.

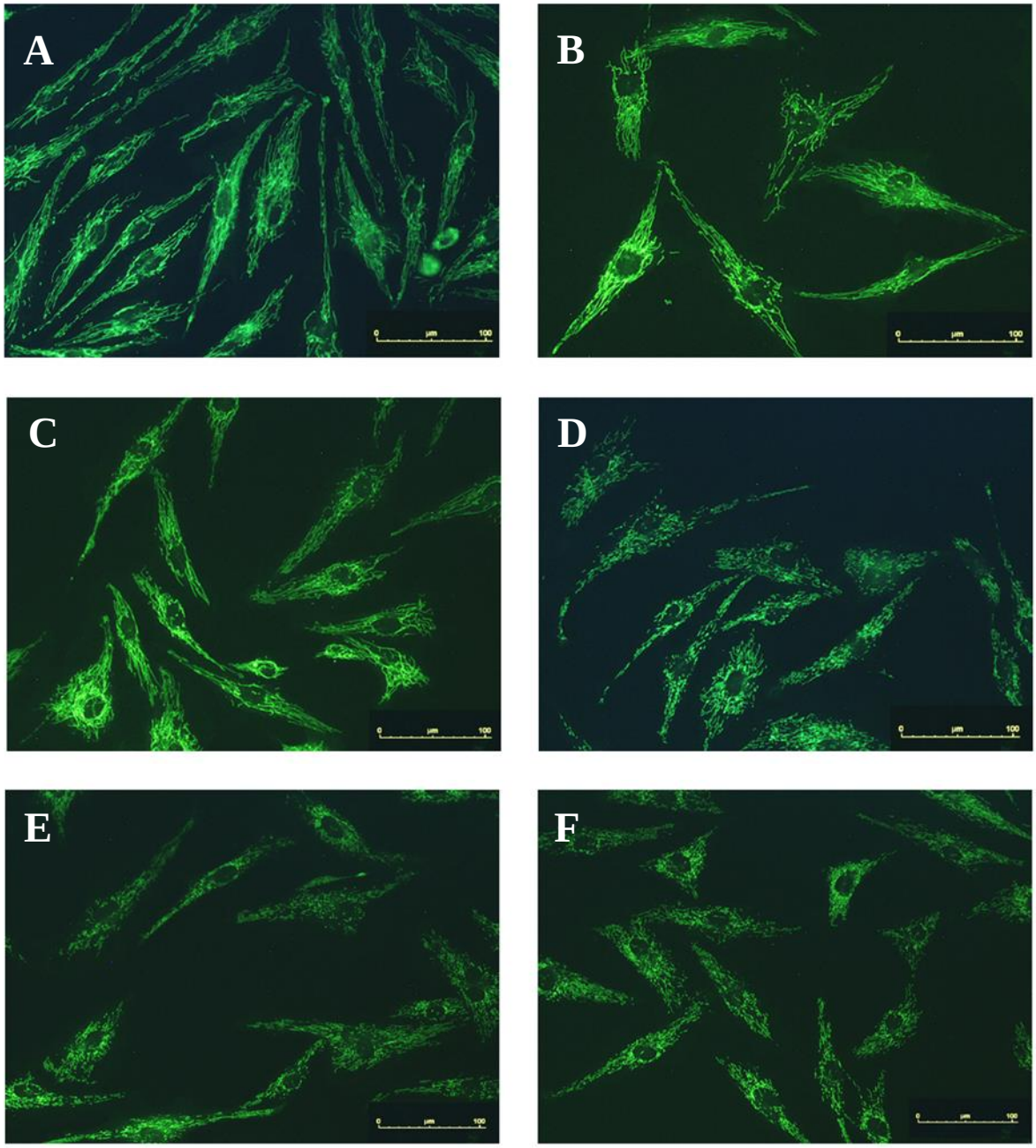


Figure 34 : Microscopie à fluorescence de cellules SAF-1 marquées avec la sonde Rhodamine 123 après traitement au CCCP à différentes concentrations

Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de CCCP pour un temps de contact de 20 minutes :

A : 0 µM, contrôle négatif — B : 10 µM
C : 20 µM — D : 50 µM
E : 100 µM — F : 200 µM

Après traitement au CCCP, les cellules ont été marquées avec 10 µg.mL^{-1} de Rhodamine 123. Les espaces noirs à l'intérieur des cellules constituent les noyaux cellulaires.

La forme très allongée caractéristique des fibroblastes est ainsi bien mise en évidence par le réseau mitochondrial marqué à la Rh123 quelles que soient les concentrations croissantes en CCCP (Figure 34.B, C, D, E, F). Dans ces conditions, le réseau mitochondrial n'est impacté qu'à partir d'une exposition à une concentration de CCCP de 50 µM (Figure 34.D, E, F). Le réseau mitochondrial n'est plus filamenteux ni connecté, mais fragmenté en bâtonnets de différentes tailles éparpillés dans le cytoplasme et non connectés. À de hautes concentrations de CCCP (100 et 200 µM), certaines cellules présentent un aspect rabougri et par conséquent paraissent plus petites que les cellules non traitées. Ces modifications morphologiques du réseau mitochondrial sont également observées chez des cellules traitées à la colchicine ou infectées par le virus du sarcome de Rous et marquées à la Rh123 (Johnson *et al.*, (1980)). Ainsi, lorsque que le réseau de mitochondries est altéré, il subit des modifications morphologiques visibles avec l'utilisation de sondes fluorescentes (Minamikawa *et al.*, (1999), Lum et Nagley, (2003)). Pour toutes les concentrations de CCCP testées, aucun impact sur l'intensité de fluorescence n'est observable.

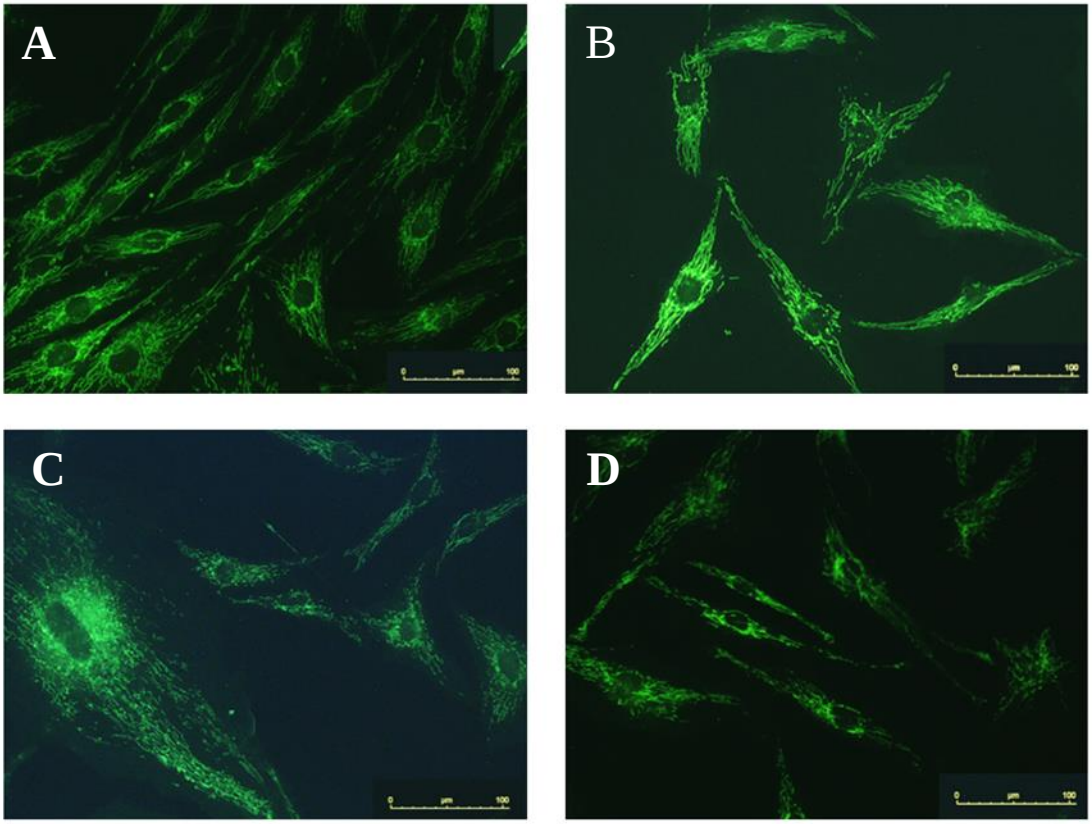


Figure 35 : Microscopie à fluorescence de cellules SAF-1 marquées avec la sonde Rhodamine 123 après traitement au CCCP à différents temps d'exposition

Les cellules ont été traitées à une concentration fixe de 10 µM de CCCP (B, C, D) durant différents temps d'exposition.

A : 0 min et contrôle négatif B : 20 min
C : 3 h D : 24 h

Après traitement au CCCP, les cellules ont été marquées avec 10 µg.mL^{-1} de Rhodamine 123.

L'effet du temps d'exposition au CCCP a également été étudié en exposant les cellules SAF-1 à 10 µM de CCCP durant 20 min, 3 heures ou 24 heures (Figure 35 page 123). Comme décrit précédemment, une exposition de 20 minutes à une concentration de CCCP de 10 µM n'affecte pas la morphologie (Figure 35.B). A partir de 3 heures de traitement, quelques cellules présentent des signes de fragmentation du réseau mitochondrial (Figure 35.C). Après 24 heures d'exposition, la grande majorité des cellules présente un réseau mitochondrial fragmenté avec une tendance à être réorganisé autour du noyau et non plus sur la totalité du cytoplasme (Figure 35.D). De plus, certaines cellules ont perdu leur aspect longiforme. Aucun changement d'intensité de fluorescence n'est observable selon les temps d'exposition. En conclusion, la sonde Rhodamine 123 s'avère efficace pour mettre en évidence le réseau mitochondrial des cellules de daurade royale SAF-1 en utilisant la microscopie à fluorescence. Lorsque que le potentiel membranaire mitochondrial est altéré avec un agent découplant de référence comme le CCCP à différentes concentrations ou différents temps, la fragmentation et le réarrangement du réseau mitochondrial sont nettement visibles. Toutefois, aucun changement de l'intensité de fluorescence n'est observable quelles que soient la concentration ou la durée d'exposition du traitement CCCP. La microscopie à fluorescence n'étant pas l'approche la plus appropriée pour mesurer des intensités de fluorescence, une étude du potentiel membranaire mitochondrial de cellules SAF-1 par cytométrie en flux a été réalisée en complément.

B. Cytométrie en flux

1. Marquage à la Rh123 par cytométrie en flux

Les cellules SAF-1 ont été traitées en suspension à des différentes concentrations en CCCP identiques à celles utilisées pour la microscopie à fluorescence : 10/20/50/100/200 µM. Deux types de représentations ont été choisies afin d'analyser la fluorescence de la Rh123 : une représentation graphique de la structure (granularité) des cellules SAF-1 (side-scatter (SSC)) *versus* la fluorescence de la Rh123 (Figure 36.A page 125) et une représentation graphique du nombre de cellules SAF-1 *versus* la fluorescence de la Rh123 (Figure 36.B). Pour chaque représentation graphique, une zone a été délimitée afin de localiser les cellules SAF-1 à faible potentiel membranaire mitochondrial à partir du profil obtenu avec les cellules non traitées (contrôle).

Les résultats obtenus par cytométrie en flux démontrent que les traitements CCCP à différentes doses n'impactent pas le niveau de fluorescence de la Rh123. Aucune variation de l'intensité de fluorescence n'est observable pour toutes les concentrations de CCCP testées.

Ainsi, les résultats de cytométrie en flux sont en corrélation avec les résultats obtenus par microcopie à fluorescence. Ils confirment que la Rh123 n'est pas une sonde adéquate et sensible pour évaluer le $\Delta\Psi_m$ des cellules SAF-1.

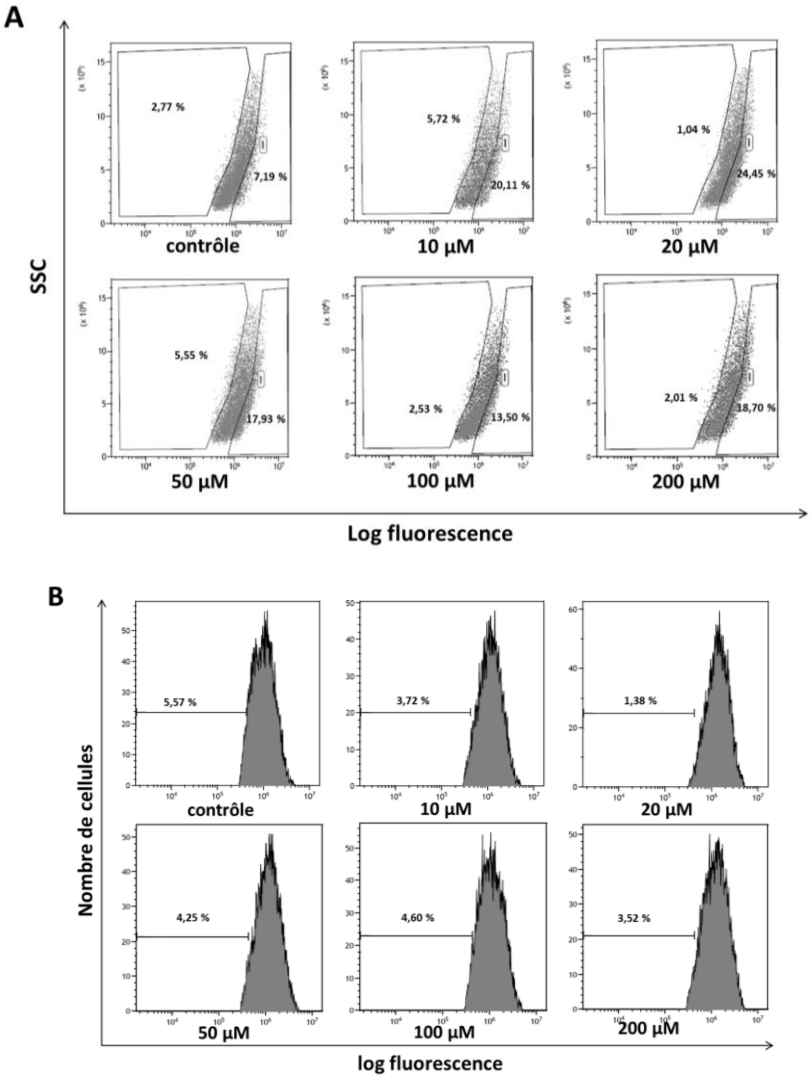


Figure 36 : Estimation du potentiel membranaire mitochondrial des cellules SAF-1 traitées à différentes concentrations de CCCP après marquage à la Rh123 par cytométrie en flux

Les cellules SAF-1 ont été traitées à différentes concentrations en CCCP (10/20/50/100/200 µM) durant 20 minutes puis marquées avec 10 µg.mL^{-1} de Rh123. Deux représentations graphiques ont été réalisées : une représentation graphique de la structure (granularité) des cellules SAF-1 (side-scatter (SSC)) *versus* la fluorescence de la Rh123 (A) et une représentation graphique du nombre de cellules SAF-1 *versus* la fluorescence de la Rh123 (B). Les résultats exposés sont représentatifs de trois expérimentations indépendantes.

Des données de littérature exposent ce manque de spécificité. La Rh123 est décrite comme une sonde non spécifique au $\Delta\Psi_m$ du fait de son interaction avec l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Cottet-Rousselle *et al.*, (2011)). Salvioli *et al.*, (1997)) ont également mis en évidence le manque de spécificité de la sonde Rh123 en supposant des interactions de la sonde avec des composants de la membrane interne mitochondriale ou autres sites de fixation énergie-indépendants. Ils ont en effet observé par cytométrie en flux un

très faible effet du FCCP (concentration : 250 nM et temps de traitement : 2 à 8 heures), un homologue du CCCP, sur la lignée de cellules humaines U937.

Ces résultats montrent que la Rhodamine 123 est une sonde efficace pour l'observation du réseau mitochondrial tel que sa morphologie et son organisation dans la cellule. Cependant, la capacité de la Rh123 à évaluer le potentiel membranaire mitochondrial des cellules SAF-1 est limité du fait de sa faible sensibilité. Il s'avère que l'utilisation d'autres sondes, telles que le Red CMXRos, permettant d'étudier le $\Delta\Psi_m$ est plus appropriée.

2. Marquage au Red CMXRos par cytométrie en flux

Le $\Delta\Psi_m$ des cellules SAF-1 a ainsi été estimé en utilisant la sonde Red CMXRos avec des conditions de traitements CCCP identiques à celles utilisées pour le marquage par la Rh123. Deux types de représentations graphiques ont également été représentés (Figure 37 page 127).

À partir d'une concentration de 10 µM de CCCP, l'intensité de fluorescence du Red CMXRos diminue démontrant une baisse du $\Delta\Psi_m$. La représentation graphique exposant la structure des cellules (ssc) *versus* la fluorescence du Red CMXRos permet de mieux visualiser la baisse de fluorescence suite aux traitements CCCP (Figure 37.A) par rapport à la représentation du nombre de cellules en fonction de la fluorescence (Figure 37.B). Les différentes concentrations testées de CCCP (10 – 200 µM) impactent de façon équivalente le $\Delta\Psi_m$.

Les expérimentations réalisées sur les cellules SAF-1 ont permis de mettre en évidence le manque de spécificité de la Rh123 pour l'évaluation du $\Delta\Psi_m$. À l'inverse, la sonde Red CMXRos s'est montrée sensible dans l'évaluation du $\Delta\Psi_m$.

Ces résultats d'étude préliminaire auraient dû nous permettre de mettre au point une méthode afin de mesurer les variations du $\Delta\Psi_m$ sur des cellules extraites de filet de daurade royale.

Le choix s'est porté sur l'étude du $\Delta\Psi_m$ d'adipocytes extraits de filets de daurade royale à différents intervalles de temps *post mortem* en utilisant la sonde Red CMXRos. Les adipocytes sont des cellules nombreuses dans le filet de poisson et facilement extractibles. Leur analyse par cytométrie en flux est également exposée dans la littérature (Majka *et al.*, (2014)). Toutefois, des contraintes techniques et logistiques ne nous ont pas permis de réaliser cette approche. Contrairement aux cellules SAF-1, les adipocytes sont des cellules fragiles supportant mal le transport. La plateforme de cytométrie étant située à 120 km de notre laboratoire, les cellules étaient fortement altérées avant l'acquisition à notre arrivée à la plateforme. Une analyse de microscopie à fluorescence des cellules SAF-1 marquées au Red CMXRos n'a également peut-être réalisable étant donné l'absence de filtres spécifiques sur nos microscopes.

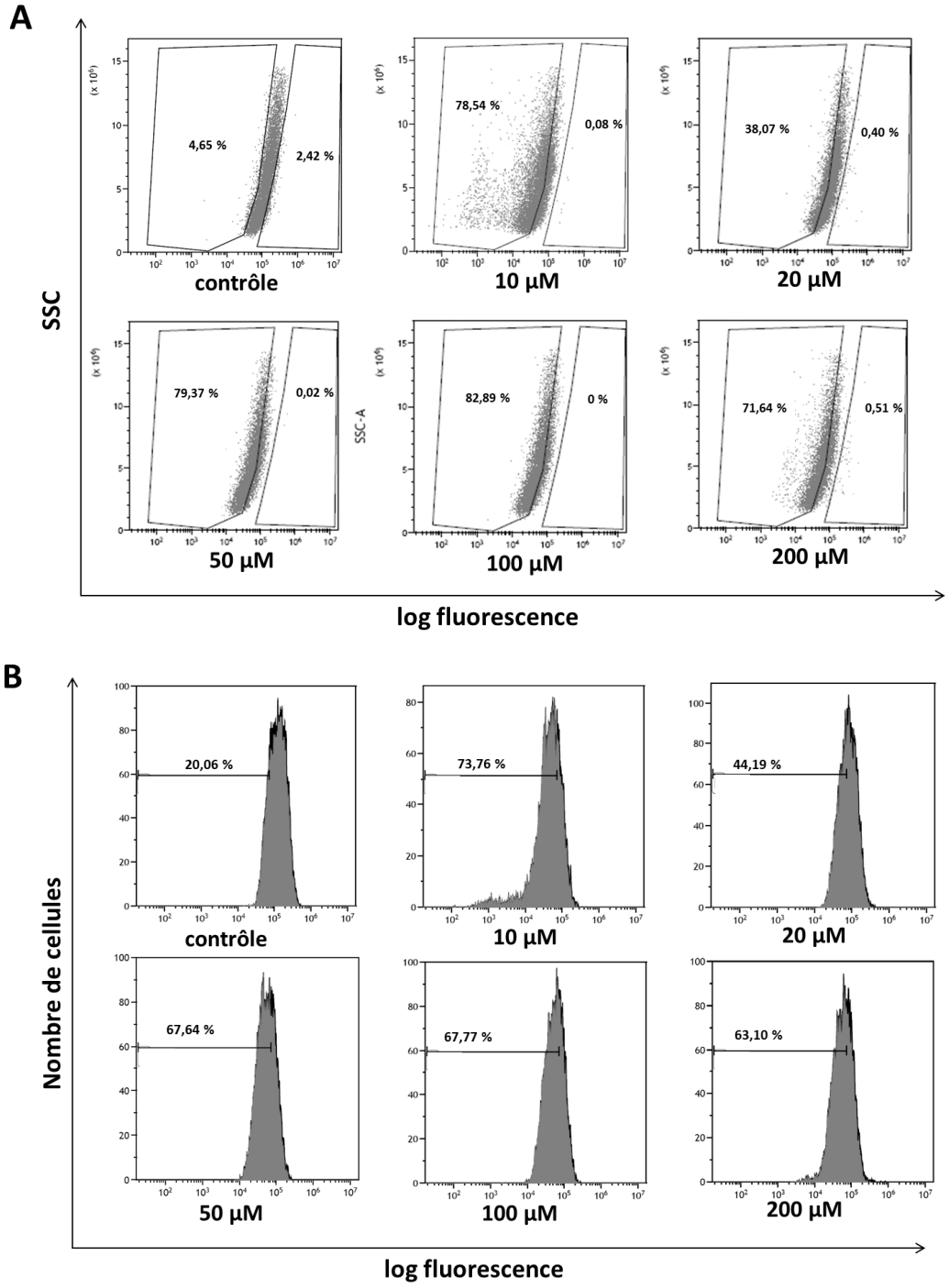


Figure 37 : Estimation du potentiel membranaire mitochondrial des cellules SAF-1 traitées à différentes concentrations de CCCP après marquage au Red CMXRos par cytométrie en flux

Les cellules SAF-1 ont été traitées à différentes concentrations en CCCP (10/20/50/100/200 µM) durant 20 minutes puis marquées avec 100 nM de Red CMXRos. Deux représentations graphiques ont été réalisées : une représentation graphique de la structure (granularité) des cellules SAF-1 (side-scatter (SSC)) *versus* la fluorescence du Red CMXRos (A) et une représentation graphique du nombre de cellules SAF-1 *versus* la fluorescence du Red CMXRos (B). Les résultats exposés sont représentatifs de trois expérimentations indépendantes.

Etant donné ces contraintes logistiques et techniques, nous avons orienté nos recherches sur l'étude du $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées extraites de filets de daurade royale. L'étude du $\Delta\Psi_m$

de mitochondries isolées nécessite l'utilisation de matériels peu coûteux (oxygraphe, spectrofluorimètre). Dans un premier temps, nous avons validé nos protocoles d'extraction de mitochondries de cellules SAF-1 er de filets de daurade royale grâce à des mesures d'oxygraphie.

III. Evaluation de la respiration de mitochondries isolées

A. Lignée cellulaire SAF-1

Les acquisitions réalisées en oxygraphie nous ont permis d'étudier la respiration des mitochondries isolées de cellules SAF-1 et de mettre en évidence la qualité de notre méthodologie d'extraction des mitochondries. La Figure 38 ci-dessous illustre un exemple d'acquisition de mesure d'oxygraphie.

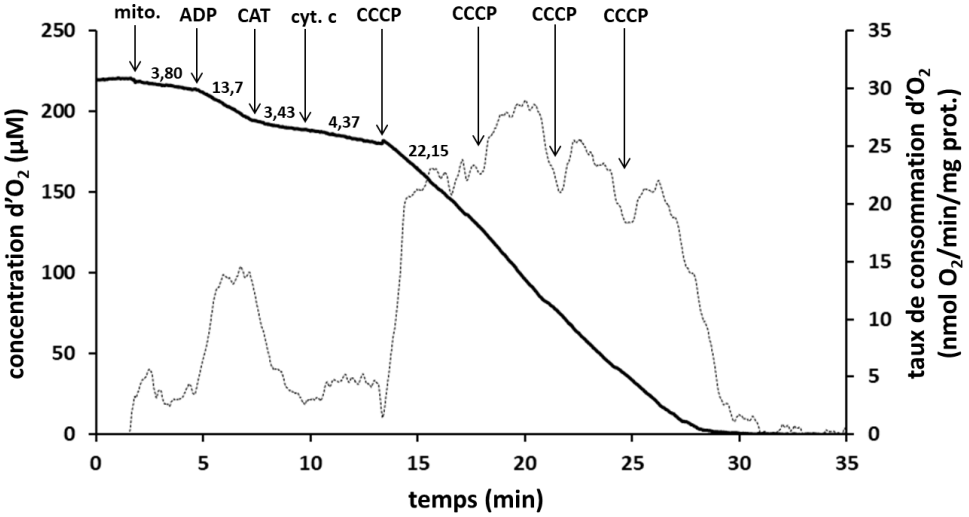


Figure 38 : Exemple de suivi de la consommation d'oxgène de mitochondries isolées de cellules SAF-1 par oxygraphie

La courbe noire correspond à l'évolution de la concentration d'O_2. La dérivée de cette courbe correspond à la courbe en pointillés. Les nombres disposés le long de la courbe noire en gras constituent les taux de consommation d'O_2 (taux de respiration) à chaque état respiratoire. Ce graphique est représentatif d'une expérimentation.

Une ligne de base est enregistrée durant deux minutes avec le tampon de respiration seul dans la chambre d'incubation complété de glutamate (5 mM), malate (2 mM) et succinate (5 mM). Après stabilisation du signal, 0,2 $mg.mL^{-1}$ de mitochondries isolées sont ajoutées. Toutes les deux minutes, ont ensuite été ajoutées consécutivement les molécules ADP (1 mM), CAT (5 µM), cytochrome c exogène (10 µM) et CCCP (2 µM).

Dans un premier temps une ligne de base est acquise avec le tampon de respiration contenant les substrats respiratoires glutamate, malate, et succinate. Ainsi, durant 2 minutes, la stabilité du signal est vérifiée. Ensuite, les mitochondries sont ajoutées à une concentration de 0,2 $mg.mL^{-1}$. Le taux de la respiration basale était de 3,80 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines. L'ajout d'ADP en excès a ensuite stimulé la respiration (état 3) en augmentant l'activité de l'ATP synthase. Le taux de respiration à l'état 3 était de 13,70 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines. A partir

de trois expérimentations réalisées, le taux de consommation d'oxygène est en moyenne 2,8 fois plus important après l'ajout d'ADP (Tableau IX ci-dessous). A l'inverse, le CAT ralentit fortement le transfert d'ADP vers la mitochondrie et par conséquent l'activité ATP synthase entraînant une diminution de la consommation d'oxygène. L'activité de la chaîne respiratoire n'était plus couplée à la synthèse d'ATP. Le taux de respiration après ajout du CAT était de 3,43 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines.

Tableau IX : Données résumant la respiration de mitochondries isolées de SAF-1 à partir de trois expérimentations indépendantes
Taux de consommation d'oxygène (OCR) à différents états respiratoires (respiration basale, ADP (état 3), CAT), RCI (Respiratory Control Index) et stimulation de la respiration par le cytochrome c exogène. Les taux de consommation d'oxygène sont exprimés en nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéines mitochondriales

respiration basale	ADP (état 3)	CAT	RCI	stimulation cytochrome c (%)
2,82 ± 0,84	8,10 ± 4,86	2,74 ± 0,66	2,83 ± 1,10	13,2 ± 5,22

L'ajout de cytochrome c exogène démontre une faible stimulation de la respiration. Cette donnée indique une faible action du cytochrome c exogène et apporte la preuve que l'intégrité de la membrane externe mitochondriale est préservée. Sur l'ensemble de trois expérimentations indépendantes, la stimulation de la respiration est de 13,2 ± 5,2 %. Entre 5 et 15 % d'augmentation, la stimulation du cytochrome c sur la respiration est considérée négligeable. L'intégrité de la membrane externe est préservée (Kuznetsov *et al.*, (2008)). L'ajout final du protonophore CCCP dissipe le gradient de protons entraînant ainsi la chute du potentiel membranaire mitochondrial. Afin de compenser cette perte, l'activité de la chaîne respiratoire est poussée à son maximum entraînant une forte consommation d'oxygène. Le Tableau IX ci-dessus présente les valeurs moyennes des taux de consommation d'oxygène à différents états respiratoires, du RCI (index de contrôle respiratoire) et du pourcentage de stimulation du cytochrome c obtenues sur 3 expériences indépendantes. Les variations des taux de consommation d'oxygène à différents états respiratoire induits par l'ajout des molécules ADP, CAT et CCCP mettent en évidence le bon fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons couplée à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Il s'agit du couplage mitochondrial.

Les données d'oxygraphie acquises avec la lignée cellulaire SAF-1 ont démontré que le protocole d'extraction permet d'obtenir une solution enrichie en mitochondries isolées de cellules SAF-1 aptes à consommer l'oxygène dans différents états respiratoires. L'oxygraphe a permis d'évaluer la consommation d'oxygène par des mitochondries isolées de cellules

SAF-1 utilisées comme modèle de référence. En effet, la respiration est nécessairement conservée dans des mitochondries extraites d'une lignée cellulaire comme SAF-1. L'ensemble des méthodologies développées chez les cellules SAF-1 pour l'étude de la respiration mitochondriale a ensuite été appliqué aux cellules musculaires de filets de daurade royale.

B. Cellules musculaires de filets de daurade royale

La mesure de la consommation d'oxygène par oxygraphie nous a permis d'étudier la respiration mitochondriale et par conséquent d'évaluer les fonctions et l'intégrité mitochondriales. En parallèle, l'oxygraphie nous a permis de valider le protocole d'extraction des mitochondries de filets de daurade royale. La respiration de mitochondries isolées de filets de daurade royale a été évaluée *post mortem* à différents temps de conservation à 4°C (Figure 39 page 131 et Figure 40 page 132). La Figure 39 illustre l'évolution *post mortem* de la respiration de mitochondries isolées de filets de daurade royale à différents temps de conservation pour une cinétique type (a : J0 ; b : J1 ; c : J2 ; d : J3 ; e : J4). À J0, dans le cas de cette expérimentation, le taux de respiration à l'état basal (mesurable dès l'ajout des mitochondries dans la chambre d'incubation) était de 13,9 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines. L'état 3 a débuté après ajout de l'ADP qui amplifie l'activité de la chaîne respiratoire en augmentant l'activité de l'ATP synthase. Le taux de respiration à l'état 3 était de 39,94 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines. L'addition de CAT (inhibiteur des transporteurs mitochondriaux de nucléotides adényliques) a bloqué l'effet de l'ADP. Le taux de respiration était de 5,70 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines après ajout du CAT. L'addition de cytochrome c exogène n'a montré aucun effet de stimulation de la respiration mitochondriale démontrant la conservation de l'intégrité membranaire des mitochondries à J0. L'addition finale, à une concentration de 2 µM, de l'agent découplant CCCP a augmenté brutalement le taux de respiration (20 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines) en perturbant le $\Delta\Psi_m$. Ces résultats obtenus à J0 ont été comparés avec les respirations mitochondriales enregistrées à J1 (Figure 39.b), J2 (Figure 39.c), J3 (Figure 39.d) et J4 (Figure 39.e). De J0 à J3, les additions successives d'ADP de CAT et de CCCP ont significativement impacté la respiration mitochondriale. À J4, les effets de ces molécules étaient très faibles démontrant un découplage mitochondrial. De J0 à J4, le taux de respiration à l'état basal a augmenté (13,90 contre 17,75 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines). Ce résultat est également valable pour le taux de respiration sous action du CAT (5,70 contre 16,21 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines). À l'inverse, de J0 à J4, le taux de respiration à l'état 3 a progressivement diminué en passant de 39,94 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines à 24,22 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines. De J0 à J2, l'effet du cytochrome c sur la respiration mitochondriale

est très faible (<5 %) voire nul. A partir de J3, une stimulation de 10,9 % du taux respiratoire a été observée (par rapport à l'état basal). À J4, la stimulation de la respiration était encore plus importante avec 14,1 % d'augmentation.

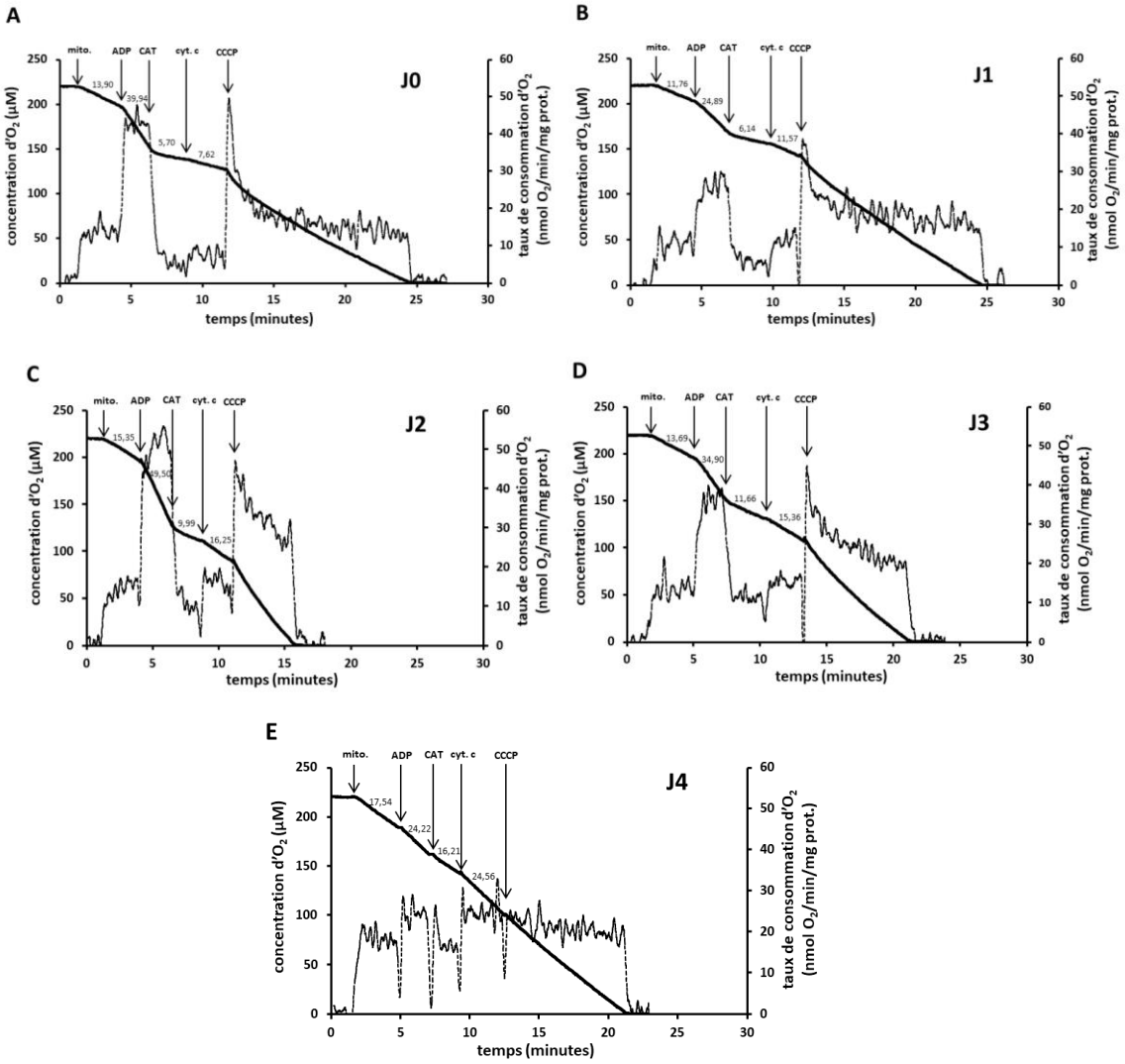


Figure 39 : Evaluation de la respiration *post mortem* de mitochondries isolées de filets de daurade royale par oxygraphie à différents temps de conservation

Pour chaque graphique, la courbe noire représente l'évolution de la concentration en oxygène (µM). Sa dérivée (courbe en pointillés) représente le taux de consommation d'O_2 (taux respiratoire) (en nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines). Chaque graphique représente un intervalle de temps *post mortem* : a : J0, b : J1, c : J2, d : J3, e : J4. Ces graphiques sont représentatifs d'une expérience. Une ligne de base est enregistrée durant deux minutes avec le tampon de respiration seul dans la chambre d'incubation complété de glutamate (5 mM), malate (2 mM) et succinate (5 mM). Après stabilisation du signal, 0,2 $mg.mL^{-1}$ de mitochondries isolées sont ajoutées. Toutes les deux minutes, ont ensuite été ajoutées consécutivement les molécules ADP (1 mM), CAT (5 µM), cytochrome c exogène (10 µM) et CCCP (2 µM)

L'intégrité membranaire est ainsi impactée au cours de la conservation *post mortem*. Ces résultats d'une expérimentation ont démontré que l'oxygraphie a permis d'obtenir des informations concernant l'évolution de la respiration mitochondriale *post mortem* de cellules de filets de daurade royale. Il est intéressant de constater une hétérogénéité au niveau des taux

de respiration calculés. Dans le cas de cette cinétique, nous pouvons observer des taux de respiration plus élevés à J2 qu'à J1, par exemple, quel que soit l'état de respiration. Pour expliquer cela, rappelons que les extractions ont été réalisées pour chaque jour de conservation à partir de filets différents provenant d'individus différents. Ainsi, la variabilité intra-spécifique est à prendre en considération. Les fonctions mitochondriales, mais également les appareils de mesure (oxygraphe, fluorimètre), sont très sensibles aux conditions expérimentales telles que la température, la pression ou l'humidité. Il est impossible d'affirmer que ces conditions sont identiques d'un jour à l'autre dans notre laboratoire. Malgré ces différences constatées, il en ressort, pour l'ensemble de nos cinétiques, que la respiration mitochondriale est fortement et significativement altérée à partir de J4.

La Figure 40 ci-dessous illustre la répétabilité de l'expérimentation présentée en Figure 39 page 131 à travers 3 à 5 répétitions selon les conditions. L'évolution des taux de respiration à l'état basal, à l'état 3 et sous action du CAT est illustrée par cette Figure 40 à différents temps de conservation à 4°C. De J0 à J3, les taux de respiration à l'état basal et sous CAT ont très peu varié. Ils étaient en moyenne de 10,46 ± 0, 497 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines pour l'état basal et de 8,80 ± 0,81 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines pour l'état respiratoire sous action du CAT. À J4, ces taux de respiration ont considérablement augmenté en atteignant 15,93 ± 5,38 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines pour l'état basal et 15,66 ± 5,66 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines pour l'état respiratoire CAT. Concernant le taux de respiration à l'état 3, une diminution significative fut observée entre J0 et J4 (33,78 ± 8,125 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines contre 17,73 ± 8,18 nmol $O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ protéines).

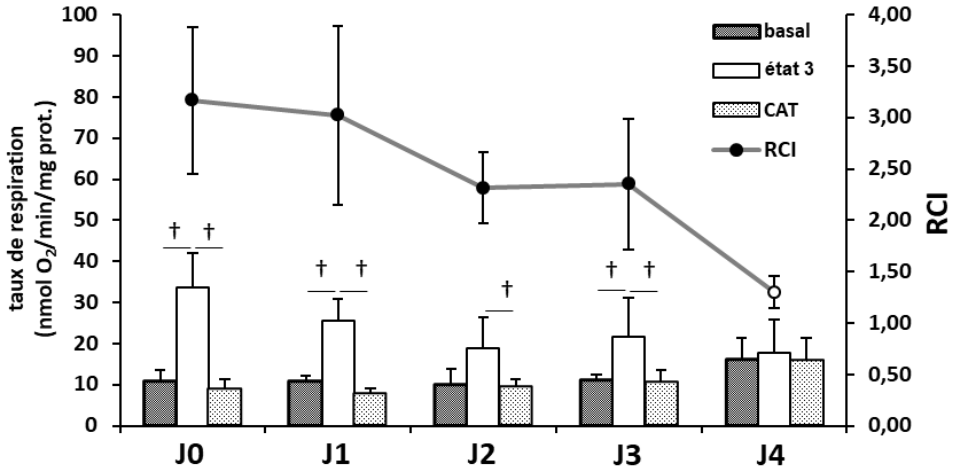


Figure 40 : Taux de respiration (basal, état 3 et CAT) et index de contrôle respiratoire (RCI) de mitochondries isolées de daurade royale à différents temps de conservation

Le seul cercle rempli en blanc (RCI) représente la valeur qui est significativement différente des valeurs acquises à J0, J1, J2 et J3. Les dagues représentent les valeurs qui sont significativement différentes. Le T-test pour échantillons indépendants a été appliqué (P<0,05; N=3-5).

De J0 à J3, les taux de respiration à l'état basal (excepté J2) et à l'état respiratoire sous effet du CAT étaient significativement différents du taux de respiration à l'état 3 démontrant l'effet ADP significatif sur la chaîne respiratoire et le couplage de la chaîne respiratoire avec l'ATP synthase. À J4, les taux de respiration de l'état basal et de l'état respiratoire sous effet du CAT n'étaient pas significativement différents du taux de respiration à l'état 3 mettant en évidence le découplage mitochondrial. L'index de contrôle respiratoire (RCI = état 3/CAT) a été calculé pour chaque jour de conservation. Le calcul du RCI est très informatif afin d'estimer l'état fonctionnel des mitochondries. En effet, La baisse du RCI est associée à la dysfonction mitochondriale (Brand et Nicholls, (2011)). De J0 à J4, une diminution du RCI était observable. À J4, le RCI était significativement plus faible que le RCI à J0 (3,17 ± 0,71 contre 1,30 ± 0,15) reflétant l'altération des fonctions mitochondriales.

Il est intéressant de noter que chez les mitochondries de SAF-1, les taux de respiration à l'état basal, à l'état 3 et à l'état sous action du CAT sont plus faibles que chez les mitochondries de filets de daurade royale à J0. Ceci peut s'expliquer par les différences structurales et morphologiques décrites dans le premier chapitre. Toutefois, les valeurs de RCI restent très proches démontrant un effet ADP équivalent chez les deux modèles.

La Figure 41 ci-dessous illustre également l'évaluation de l'intégrité membranaire mitochondriale par l'addition de cytochrome c exogène.

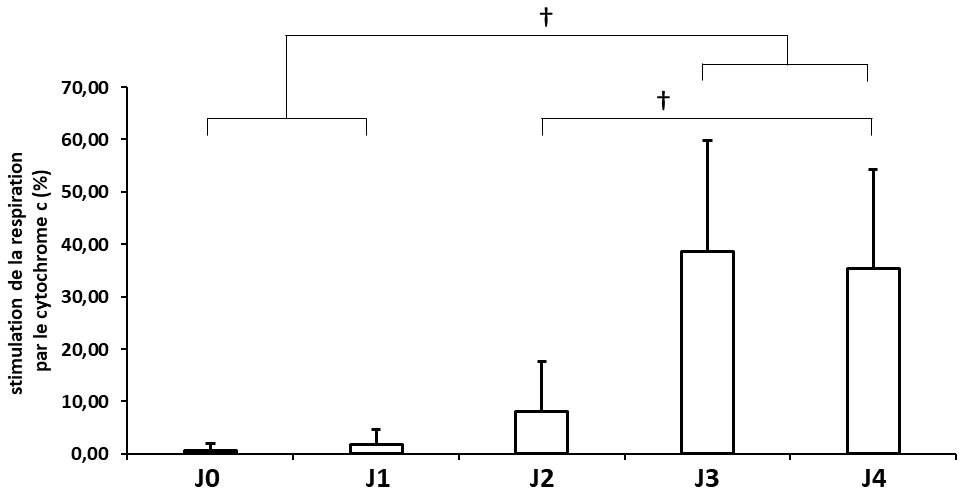


Figure 41 : Stimulation de la respiration de mitochondries isolées de daurade royale par le cytochrome c exogène à différents temps de conservation
Les dagues indiquent les valeurs qui sont significativement différentes : P<0,05; N=4-8.

Pour l'ensemble des cinétiques une légère stimulation de la respiration (entre 0,70 et 8 %) a été observée après l'ajout de cytochrome c exogène entre J0 et J2 en comparaison avec la respiration à l'état basal. Une augmentation comprise entre 5 et 15 % est considérée normale et acceptable (Kuznetsov *et al.*, (2008)). À partir de J3, le taux respiratoire a augmenté de plus

de 30 % après ajout du cytochrome c (38,5 % à J3 et 35 % à J4) démontrant l'altération de la membrane externe mitochondriale et donc de l'intégrité des mitochondries isolées.Les analyses d'oxygraphie ont permis de valider nos protocoles d'extraction de mitochondries. En effet, les graphiques obtenus pour les mitochondries SAF-1 ont démontré la présence d'une activité respiratoire et la conservation de l'intégrité membranaire. De même, pour les mitochondries extraites de filets de daurade royale, la conservation des fonctions et de l'intégrité mitochondriales ont démontré l'efficacité du protocole d'extraction des mitochondries. De plus, l'étude cinétique du $\Delta\Psi_m$ a démontré un maintien de la respiration durant 72 heures *post mortem*. À partir de J4 (96 h PM), la respiration est significativement impactée. Des études menées sur des mitochondries extraites de muscle de cou de bœuf (conservé à 4°C) ont également mis en évidence, par oxygraphie, la conversation des fonctions mitochondriales (respiration) et de l'intégrité structurale *post mortem* (Cheah et Cheah, (1971), Cheah et Cheah, (1974)). Les paramètres ADP/O, RCI et la respiration à l'état 3 sont significativement impactés à partir de 96 h PM. Cheah et Cheah, (1971) concluent que 96 h *post mortem* est un temps de conservation critique. Nos résultats obtenus en oxygraphie chez les mitochondries de filets de daurade royale sont en corrélation avec les observations de MET. Ces dernières avaient en effet démontré des altérations importantes des membranes mitochondriales à partir de J3. Or, une stimulation importante de la respiration par le cytochrome c exogène (>30 %) a été observée à J3 démontrant l'altération des membranes mitochondriales externes. Les importantes altérations au niveau des crêtes mitochondriales (disparition, désorganisation) observées à partir de J4 et davantage accentuées à J6 sont en corrélation avec la forte diminution de la respiration enregistrée à partir de J4 par oxygraphie.

En conclusion de ce chapitre, l'étude d'oxygraphie nous a permis de valider un protocole d'extraction de mitochondries pour le modèle d'étude de référence SAF-1 et pour les filets de daurade royale. En parallèle, une baisse de la respiration et donc des fonctions mitochondriales a été démontrée à partir de J4.

Ces résultats ont fait l'objet d'une partie de la publication soumise à *Food Chemistry* (Annexe 2 page 207).

Une étude du $\Delta\Psi_m$ a ensuite été réalisée dans le chapitre suivant afin de comparer l'évolution *post mortem* du $\Delta\Psi_m$ des mitochondries de filets de daurade royale avec l'évolution de la respiration mitochondriale.

IV. Evaluation du potentiel membranaire (ΔΨ) par fluorimétrie

A. Evaluation du $\Delta\Psi_m$ par fluorimétrie avec l'appareil Safas

1. Lignée cellulaire SAF-1

Dans un premier temps, tout comme pour l'étude oxygraphique, le $\Delta\Psi_m$ a été étudié chez le modèle de référence, la ligné cellulaire SAF-1 : ceci afin de développer une méthodologie et de valider son efficacité. Pour cela, la sonde fluorescente Rhodamine 123 a été utilisée à une concentration de 50 nM en mode « quenching » (Perry *et al.*, (2011)). Nous avons vu précédemment que la sonde Rh123 était peu efficace pour évaluer le $\Delta\Psi_m$ des cellules entières telles que SAF-1. Toutefois, la Rh123 démontre une bonne efficacité sur une population de mitochondries isolées (Barksdale *et al.*, (2010), Emaus *et al.*, (1986), Baracca *et al.*, (2003)). Les interactions non spécifiques de la Rh123 sont limitées et facilement discriminables.

L'intensité de fluorescence de la Rh123 intégrée dans des mitochondries isolées de SAF-1 a été mesurée avec l'appareil Safas Xenius XC (Figure 42.A page 136). La fluorescence de la Rh123 mesurée est directement liée à la valeur du $\Delta\Psi_m$. En mode « quenching », dans le cas où les mitochondries sont intactes, la sonde s'accumule dans la mitochondrie en concentration suffisante pour former des agrégats. Il en résulte une extinction des émissions de fluorescence de la sonde agrégée. C'est le phénomène de « quenching ». Ceci explique la baisse de fluorescence enregistrée par le spectrofluorimètre lorsqu'on ajoute les mitochondries dans un tampon de respiration contenant des substrats respiratoires et la Rh123 (Figure 42.A). Lorsque l'ADP est ajouté, la synthèse d'ATP augmente. Cette dernière est étroitement liée à la force protomotrice essentielle à l'activité ATP synthase. Il en résulte une diminution du potentiel membranaire mitochondrial aboutissant à une baisse de l'agrégation de la sonde et par conséquent une augmentation de l'intensité de fluorescence. L'ajout de CAT supprime l'action de l'ADP et « rétablit» le potentiel membranaire mitochondrial. La sonde s'agrège à nouveau et la fluorescence diminue. L'ajout final de CCCP dépolarise la membrane interne mitochondriale entraînant la chute du potentiel membranaire mitochondrial. Dans ces conditions, la sonde est relarguée de la mitochondrie et l'intensité de fluorescence augmente dû à l' « unquenching » de la sonde. Il est ainsi possible d'évaluer par fluorimétrie le potentiel membranaire de mitochondries isolées de SAF-1 en temps réel sur un délai de 12 minutes d'acquisition. La diminution d'intensité de fluorescence observée après ajout des mitochondries n'est pas uniquement imputable au $\Delta\Psi_m$. En effet, la sonde Rh123 peut

intégrer les membranes d'autres organites contenus dans nos enrichissements mitochondriaux tels que le réticulum endoplasmique.

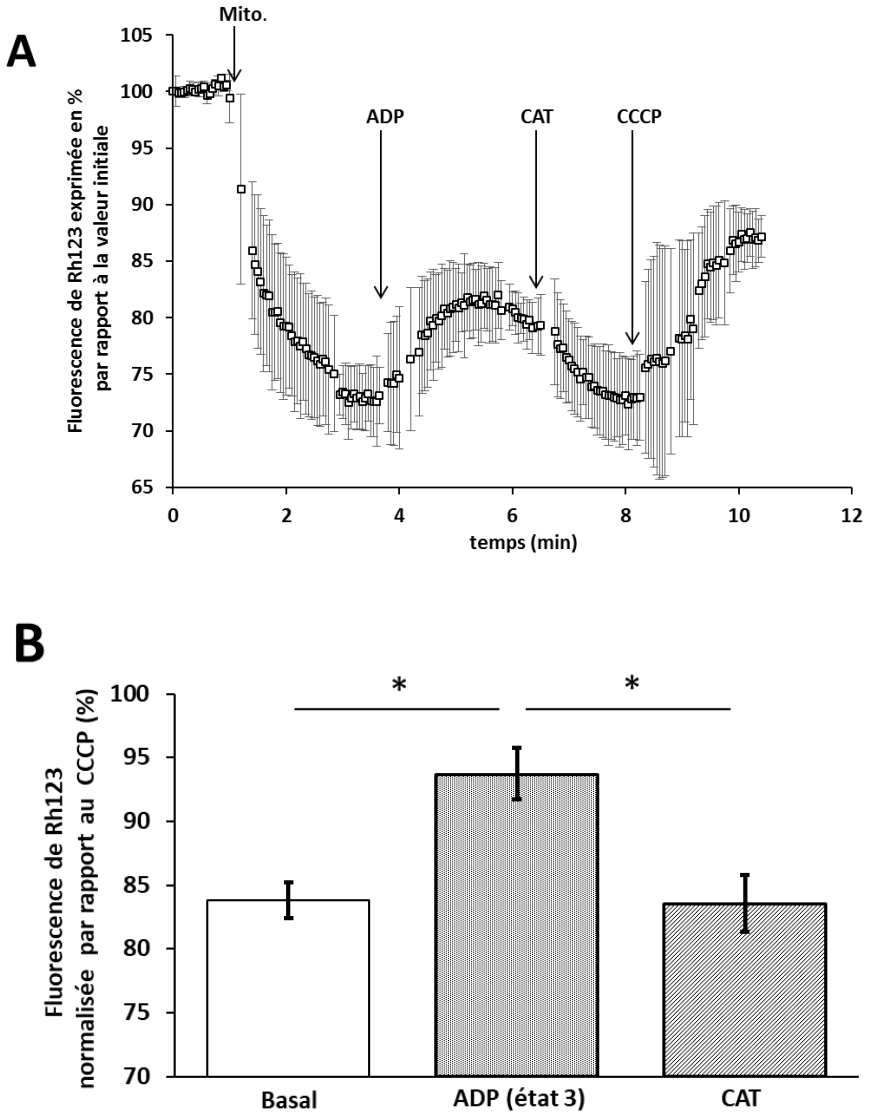


Figure 42 : Evaluation du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) de mitochondries isolées de cellules SAF-1 par fluorimétrie avec l'appareil SAFAS Xenius XC

(A) Représentation graphique de trois expérimentations indépendantes du suivi de la fluorescence de la Rhodamine 123 avec le spectrofluorimètre SAFAS Xenius XC). (B) Représentation sous forme d'histogramme de l'intensité de fluorescence de la Rh123 en fonction de différents états respiratoires. Les intensités de fluorescence mesurées à l'état basal, après ajout de l'ADP ou du CAT sont normalisées par rapport à l'intensité de fluorescence obtenue après ajout du CCCP. Les astérisques indiquent les valeurs significativement différentes. Le T-test pour échantillons indépendants a été appliqué ($P<0,05$; $N=3$).

Ainsi, cette intégration non spécifique provoque une interférence et participe au « quenching » de la sonde. Ceci explique également pourquoi après ajout du CCCP, le signal de fluorescence ne dépasse pas la valeur de la ligne de base. De ce fait, les niveaux de fluorescence enregistrés à différents états respiratoires ont été normalisés par rapport au niveau de fluorescence obtenu après ajout du CCCP (état 3) (Figure 42.B). L'action dépolarisante du CCCP est en effet spécifique des mitochondries.

La rationalisation des niveaux de fluorescence par rapport au CCCP permet d'exprimer des mesures spécifiques du $\Delta\Psi_m$. Les résultats obtenus avec les mitochondries de cellules SAF-1 ont démontré que la sonde Rh123 est très sensible sur mitochondries isolées. Ses propriétés de « quenching » mettent significativement en évidence les variations du $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées. Cette méthodologie a ensuite été appliquée aux mitochondries isolées de filets de daurade royale.

2. Cellules musculaires de filets de daurade royale

Le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées de cellules musculaires de filet de daurade royale a été estimé à différents temps de conservation *post mortem* avec la sonde Rh123. La Figure 43 page 138 présente les résultats obtenus avec le Safas Xenius XC pour une expérimentation. Les profils de fluorescence ont été enregistrés pour chaque jour de conservation de J0 à J4 (Figure 43.a-e). À J0 (Figure 43.a), l'addition de mitochondries isolées dans le tampon de respiration a mené à une forte baisse de l'intensité de fluorescence de la Rh123 suite à l'intégration de la sonde dans les mitochondries. Cette diminution de fluorescence correspond au « quenching ». Après ajout de l'ADP (état 3), la fluorescence a augmenté dû au relargage de la sonde dans le tampon de respiration environnant. En effet, l'ajout d'ADP a augmenté l'activité de l'ATP synthase (complexe V de la chaîne respiratoire) et a en parallèle diminué le $\Delta\Psi_m$. L'addition supplémentaire de CAT a ensuite inhibé les transporteurs de nucléotides adényliques tels que l'ADP et réduit l'activité de l'ATP synthase provoquant par conséquent l'augmentation $\Delta\Psi_m$. L'addition de CAT a ainsi favorisé l'intégration de la Rh123. À la fin de l'expérimentation, l'ajout de CCCP a induit la chute du $\Delta\Psi_m$ menant au relargage de la Rh123 et donc à une rapide et forte augmentation de la fluorescence. De J0 à J3 (Figure 43.a-d), les profils de fluorescence sont équivalents. L'addition des mitochondries a causé une diminution de fluorescence comprise entre 36 et 40 % en moyenne, signe de l'incorporation de la Rh123 dans les mitochondries. Les ajouts d'ADP, de CAT et de CCCP ont des effets nets sur la fluorescence de la Rh123 comme décrit dans la Figure 43. Les variations d'intensité de fluorescence sont similaires de J0 à J3. À partir de J4, le profil de fluorescence change significativement. L'intensité de fluorescence de la Rh123 diminue de 27 % après ajout des mitochondries. Le phénomène de « quenching » et donc d'intégration de la sonde est moins prononcé. Toutefois, comme évoqué précédemment, le « quenching » observable après ajout des mitochondries n'est pas le paramètre le plus pertinent à observer. Les ajouts des molécules ADP, CAT et CCCP impactent très faiblement les niveaux de fluorescence de la Rh123. L'ajout de CCCP à J4 provoque une augmentation de 20 % de la fluorescence contre

35 % en moyenne à J0. Les phénomènes de « quenching » et d'« unquenching » sont ainsi plus faibles à J4 par rapport à J0 ou J3. Les données de cette expérimentation démontrent que le $\Delta\Psi_m$ est impacté à partir de J4.

Les niveaux de fluorescence de Rh123 mesurés après l'ajout des mitochondries (état basal), de l'ADP et CAT ont été normalisés par rapport au niveau de fluorescence enregistré après traitement CCCP (comme décrit dans la partie « matériels et méthodes » page 105). Cette normalisation nous a permis d'analyser des niveaux de fluorescence dont l'intensité est spécifique des fonctions et de l'intégrité mitochondriales étant donné la spécificité de l'action dépolarisante du CCCP sur les mitochondries.

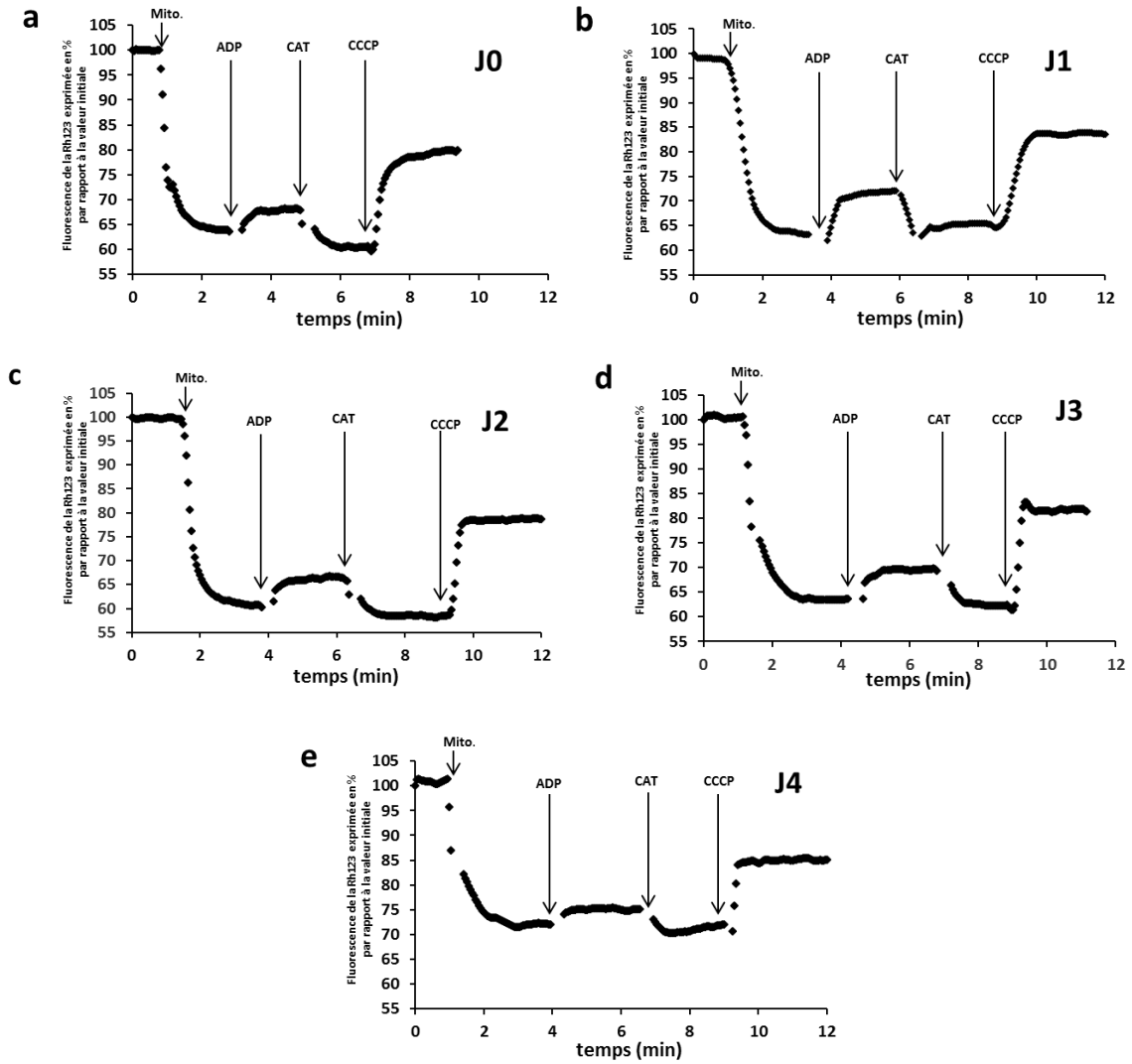


Figure 43 : Evaluation *post mortem* du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) de mitochondries isolées de daurade royale à différents temps de conservation par fluorimétrie (Safas)
Chaque graphique représente un intervalle de temps *post mortem* : a : J0, b : J1, c : J2, d : J3, e : J4. Ces graphiques sont représentatifs d'une expérience.

La Figure 44 ci-dessous présente les niveaux d'intensité de fluorescence de la Rh123 normalisés à différents état respiratoires de J0 à J4 à partir de 4 à 7 expérimentations. D'après les statistiques exposées par la Figure 44, de J0 à J2, les intensités de fluorescence enregistrées à l'état basal (après ajout des mitochondries) sont significativement différentes de celles enregistrées à l'état 3 (après ajout de l'ADP). De même, les intensités de fluorescence enregistrées après ajout du CAT étaient significativement différentes de celles enregistrées à l'état 3 (ADP).

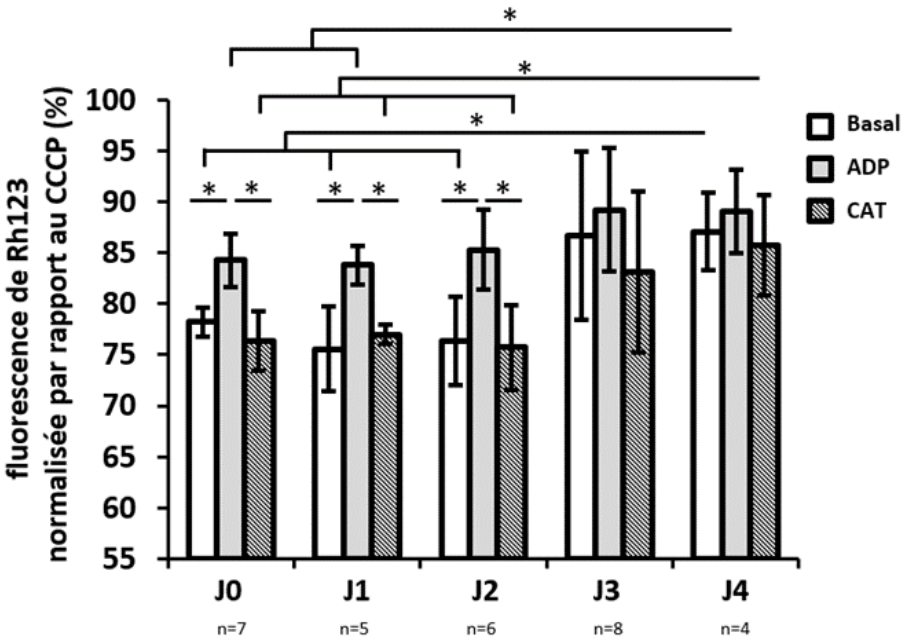


Figure 44 : Histogrammes résumant les niveaux de fluorescence de la Rh123 à différents états respiratoires normalisés par rapport au CCCP à différents temps de conservation (mitochondries isolées de tissu de daurade royale)
Les astérisques indiquent les valeurs qui sont significativement différentes. Le T-test pour échantillons indépendants a été appliqué (P<0,05, N=4-7).

Ces différences significatives illustrent les phénomènes de « quenching » et d'« unquenching » et par conséquent les variations du $\Delta\Psi_m$ à différents états respiratoires. À partir de J3, les différences de niveaux de fluorescence enregistrées à différents états respiratoires ne sont plus significatives. Les effets des molécules ADP et CAT sur l'intégration de la Rh123 et le $\Delta\Psi_m$ ne sont plus significatifs. Ceci démontre le découplage mitochondrial.

Nous pouvons également observé que de J0 à J2, les intensités de fluorescence pour chaque état respiratoire présentent des valeurs très proches. Autrement dit, les profils de fluorescence acquis de J0 à J2 sont équivalents, démontrant la conservation du $\Delta\Psi_m$ entre J0 et J2. À J4, les intensités de fluorescence de la Rh123, pour chaque état respiratoire, sont significativement plus élevées par rapport à J0, J1 et J2. À J4, les phénomènes de « quenching » et

d'« unquenchnig » sont donc plus faibles démontrant la baisse significative du $\Delta\Psi_m$ et par conséquent l'altération des fonctions et de l'intégrité mitochondriales.

Notons que les résultats obtenus à J3 mettent en évidence une grande variabilité de par les valeurs élevés des écart-types représentatifs de 8 expériences indépendantes. Cette hétérogénéité de résultats marque le début du déclin du $\Delta\Psi_m$. Autrement dit, une transition s'établit à J3 entre des mitochondries à haut potentiel et des mitochondries à faible potentiel membranaire.

3. Bilan sur les mesures de fluorescence (Safas)

La mesure de la fluorescence de la Rh123 nous a permis d'estimer le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées de cellules SAF-1 et de filets de daurade royale. La sonde s'est montrée sensible à différents états respiratoires. Les résultats obtenus sur les mitochondries isolées de filets ont démontré une conservation du $\Delta\Psi_m$ *post mortem* durant 72 heures (J3). Des altérations du $\Delta\Psi_m$ sont observables à partir de 72 heures mais elles deviennent significatives à partir de 96 heures (J4). Les résultats obtenus par fluorimétrie sont donc en corrélation avec les mesures d'oxygraphie. À partir de J4, la respiration mitochondriale et le $\Delta\Psi_m$ sont significativement altérés.

L'évaluation du $\Delta\Psi_m$ constitue ainsi un marqueur précoce pour déterminer la fraîcheur de filets de daurade royale. Ces résultats ont fait l'objet d'une partie de la publication soumise à *Food Chemistry* (Annexe 2 page 207).

Dans le but de simplifier notre méthodologie d'étude du $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées avec la Rh123, nous avons étudié les capacités du spectrofluorimètre NanoDrop 3300 à évaluer la fluorescence de colloïdes telles que les mitochondries. Par rapport à un spectrofluorimètre classique comme le Safas Xenius, Le NanoDrop 3300 est un appareil plus compact, plus facile et rapide d'utilisation, moins onéreux à l'achat et à l'utilisation. Ces caractéristiques s'inscrivent dans la logique d'un test de routine d'évaluation de la fraîcheur.

B. Evaluation du ΔΨ par fluorimétrie avec l'appareil NanoDrop 3300

Le NanoDrop 3300 est un spectrofluorimètre conçu initialement pour la quantification des protéines et des acides nucléiques. Toutefois, sa capacité à mesurer l'intensité de fluorescence de bactéries a été démontrée dans la littérature (Zhao *et al.*, (2014), Chung *et al.*, (2015)). D'autre part, la Rh123 fut également utilisée dans l'évaluation du potentiel membranaire bactérien (Matsuyama, (1984)). En partant de ces données de la littérature, nous avons souhaité étudier la capacité du NanoDrop 3300 à évaluer le potentiel membranaire ($\Delta\Psi$) des

bactéries en utilisant comme modèle d'étude *Escherichia coli* et les sondes fluorescentes de potentiel telles que la Rh123 et le JC-10. Les bactéries *E. coli* présentent une taille qui varie en 0,5 et 3 µm selon les conditions de croissance. Cet ordre de grandeur est équivalent à celui des mitochondries des cellules SAF-1 et de filets de daurade royale comme nous l'avons vu dans notre étude microscopique. Ces ressemblances structurales nous ont amenées à utiliser les bactéries comme modèle d'étude idéal pour cette expérimentation préliminaire. Il est utile de préciser ici que les études sur le NanoDrop 3300 ont été effectuées au cours de la thèse avant la mise au point du protocole d'extraction des mitochondries. Une fois les capacités du NanoDrop 3300 démontrées avec les bactéries, nous avons pu appliquer les méthodologies développées sur les mitochondries isolées de cellules SAF-1 et de filets de daurade royale.

1. Optimisation du NanoDrop 3300 avec le modèle *Escherichia coli*

a. Etape préliminaire : microscopie à fluorescence *de bactéries* E. coli

Dans un premier temps, nous avons validé notre protocole de marquage des bactéries *E. coli* à travers une observation de microscopie à fluorescence (Figure 45 page 142) en utilisant les sondes Rh123 et DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole). La sonde DAPI est souvent utilisée dans le cas d'observations microscopiques pour visualiser et quantifier les bactéries (Sherr *et al.*, (2001), Muthukrishnan *et al.*, (2017)). Le CCCP a été utilisé à différentes concentrations comme agent dépolarisant de référence afin de valider la spécificité du marquage par la Rh123 chez *E. coli* (Sekyere et Amoako, (2017), Chimerel *et al.*, (2012)). La totalité des bactéries sont fluorescentes après marquage de façon uniforme (microscopie visible non exposée). Sans traitement des bactéries, les intensités de fluorescence des sondes Rh123 et DAPI sont intenses (Figure 45.A et B). Malgré leur reprise et incubation en solution PBS après marquage, les bactéries conservent leur potentiel membranaire. Apres traitement au CCCP (5µM), le potentiel membranaire est fortement altéré : le pourcentage de cellules marquées a fortement diminué (Figure 45.C). Cependant, la dissipation du $\Delta\Psi$ bactérien par le traitement CCCP n'influence pas l'intensité de fluorescence du DAPI (Figure 45.D). L'absence de filtre spécifique sur notre microscope à fluorescence ne nous a pas permis de réaliser un marquage avec une autre sonde de potentiel membranaire tel que le JC-10 ou le Red CMXRos.

Ces résultats de microscopie valident l'efficacité de notre protocole de marquage des bactéries *E. coli* avec la sonde Rh123. Les effets d'inhibition du marquage par le CCCP ont démontré que la sonde Rh123 est sensible sur des cellules bactériennes telles qu'*E.coli*. La Rh123 est donc une sonde fluorescente sensible dans l'évaluation du $\Delta\Psi$ bactérien. Les interactions non

spécifiques de la Rh123 sont plus limitées chez la bactérie que chez la cellule SAF-1 expliquant ainsi sa meilleure efficacité chez *E. coli*. Le ΔΨ bactérien a ensuite été étudié avec le NanoDrop 3300.

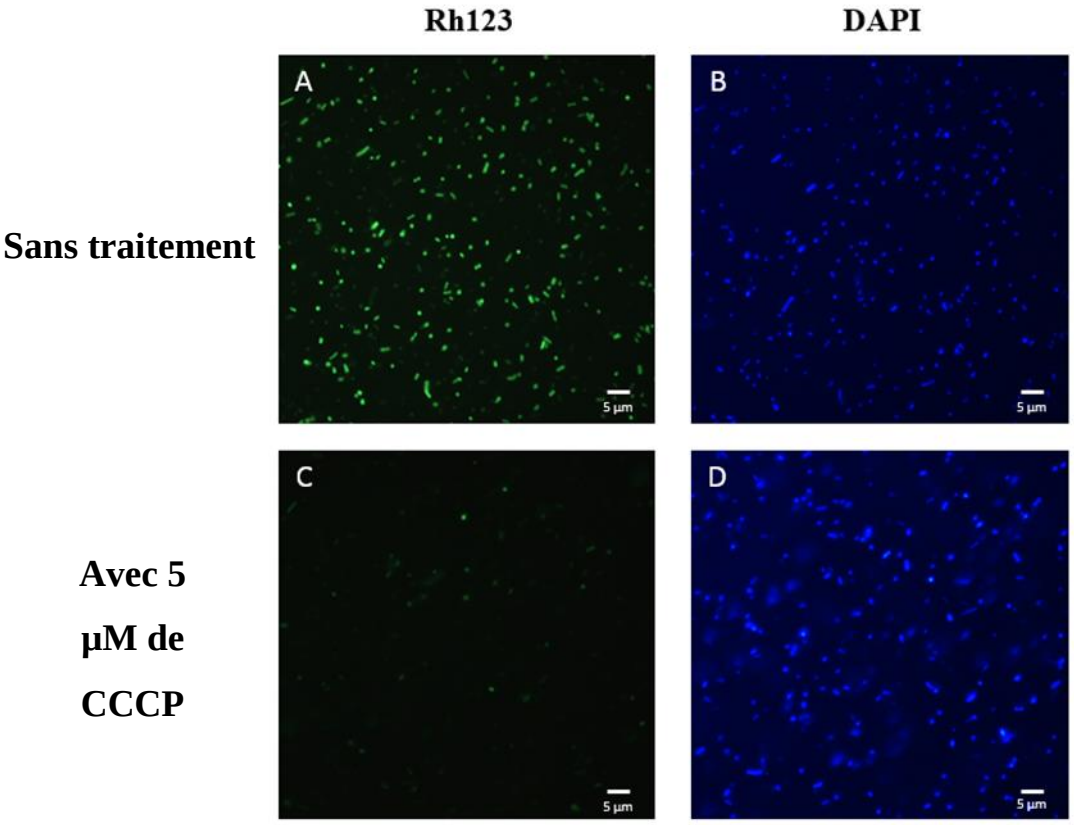


Figure 45 : Microscopie à fluorescence d'*Escherichia coli* marqués avec les sondes Rhodamine 123 (Rh123) et DAPI sans ou avec traitement au CCCP
A et B : sans traitement au CCCP. C et D : avec traitement au CCCP (5 µM). Barre d'échelle : 5 µm.

b. Evaluation du ΔΨ bactérien avec le NanoDrop 3300

La fluorescence de la Rh123 a été associé avec la sonde DAPI afin d'établir un ratio entre une sonde reflétant la viabilité et une sonde utilisée pour le dénombrement bactérien. La notion de ratio entre une sonde indicatrice de la physiologie cellulaire et une sonde de dénombrement pour évaluer la viabilité bactérienne a été amplement décrite dans la littérature avec les approches ratiométriques de type : propidium iodide (PI)/Syto 9 et PI/SYBR green (Xu *et al.*, (2017), Ma *et al.*, (2017), Biggerstaff *et al.*, (2006)). L'efficacité de ces deux approches a été confirmée par diverses techniques : cytométrie en flux, microscopie et fluorimétrie (Kaprelyants et Kell, (1992), Comas et Vives-Rego, (1997), Breeuwer et Abee, (2004)).

c. *Evaluation de la concentration bactérienne avec la sonde DAPI*

Afin de valider l'approche ratiométrique Rh123/DAPI, la capacité du NanoDrop 3300 à évaluer la concentration bactérienne avec la sonde DAPI a été étudiée. Le DAPI interagit fortement avec l'ADN et permet le marquage de cellules comme les bactéries *E. coli*. Ainsi, différentes concentrations de bactéries, correspondant à différentes valeurs d'absorbance à 600 nm (0,15 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,7 et 1) ont été marquées avec le DAPI et la fluorescence correspondante a été mesurée (Figure 46.A ci-dessous).

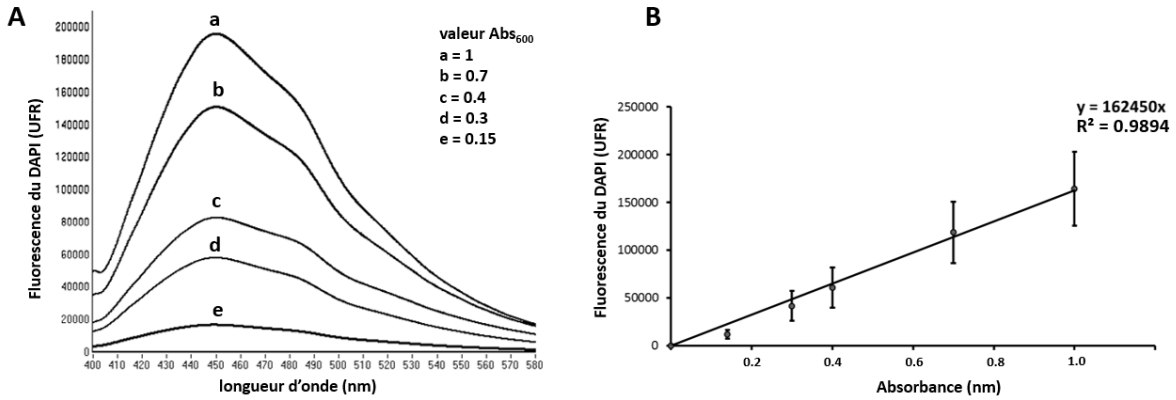


Figure 46 : Mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde DAPI à différentes concentrations d'*Escherichia coli* avec le NanoDrop 3300

- A : profil du spectre de fluorescence de la sonde DAPI à différentes concentrations de *E. coli* : a = 1; b = 0,7; c = 0,4; d = 0.3; e = 0,15.
- B : courbe de régression avec barres d'erreur pour les mesures de l'intensité de fluorescence du DAPI en fonction de différentes concentrations d'*E.coli*.

Les données représentent trois expérimentations indépendantes (n=3).

La sonde DAPI seule, non complexée, émet en solution aqueuse à 488 nm. Lorsque la sonde interagit avec l'ADN, ses propriétés spectrales sont modifiées. En effet, le pic d'émission de fluorescence spécifique du complexe ADN-DAPI est atteint à la longueur d'onde de 450 nm. L'intensité de fluorescence du DAPI est directement proportionnelle à la concentration bactérienne (R^2 = 0,9894) (Figure 46.B). Le protocole de marquage des bactéries inclut différentes étapes de centrifugation suivies de reprises du culot en suspension. En dessous de 0,1 d'absorbance à 600 nm (Abs_{600} < 0,1), le culot de bactéries devient difficile à visualiser. Pour ces raisons, une solution bactérienne d'absorbance à un minimum de 0,1 a été utilisée même si la sensibilité de l'appareil permet de travailler à des concentrations bactériennes plus faibles. A des concentrations bactériennes très élevées (Abs_{600} > 1), les intensités de fluorescence enregistrées sont très élevées et les limites d'acquisition du fluorimètre sont atteintes. A partir de ces observations et afin de conserver une gamme de linéarité, la meilleure plage de concentration bactérienne choisie était située entre 0,1 et 1 (Abs_{600}).

d. *Evaluation du ΔΨ bactérien avec le ratio Rh123/DAPI*

Le fluorimètre NanoDrop 3300 s'est révélé sensible pour quantifier la fluorescence de bactéries après marquage au DAPI à différentes concentrations bactériennes (Figure 47 ci-dessous). Nous avons ainsi pu utiliser l'approche ratiométrique Rh123/DAPI pour estimer le ΔΨ bactérien en partant d'une solution d'*E. coli* à Abs_{600} = 0,3. L'agent ionophore CCCP a été utilisé à différentes concentrations (0,5, 1 et 20 µM) afin de valider le protocole de marquage avec les sondes. Les bactéries ont été incubées après marquage à 37°C dans une solution PBS à pH 7,4 afin d'obtenir des conditions optimales d'évaluation du potentiel membranaire. Les intensités de fluorescence enregistrées après marquage à la Rh123 et au DAPI sont présentées. La Figure 47.A et la Figure 47.B illustrent les résultats d'une expérimentation type.

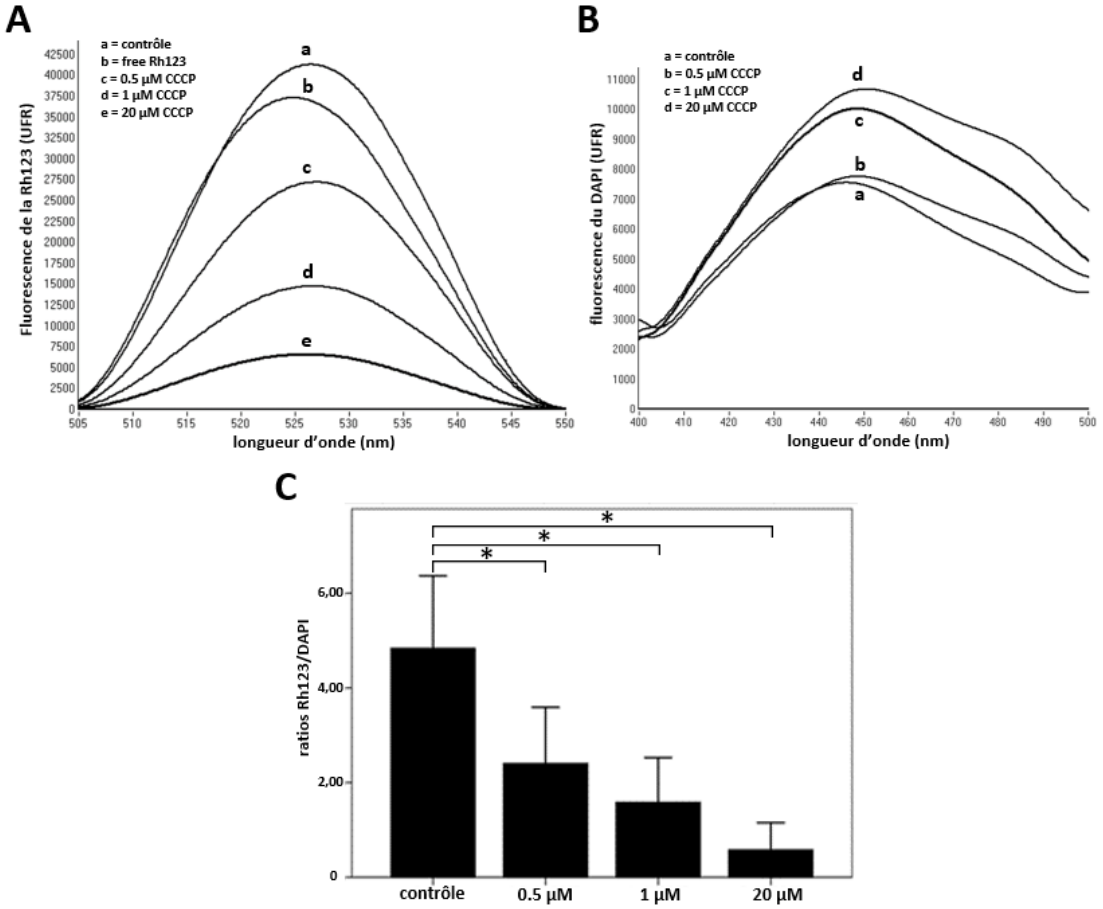


Figure 47 : Evaluation du potentiel membranaire d'*Escherichia coli* par l'approche ratiométrique Rh123/DAPI

- A : fluorescence mesurée avec la sonde Rh123 après traitement des bactéries à différentes concentrations en carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (CCCP) : a = contrôle ; b = Rh123 libre ; c = 0,5 µM CCCP ; d = 1 µM CCCP ; e = 20 µM CCCP.
- B : fluorescence du DAPI mesurée après traitement des bactéries à différentes concentrations en CCCP : a = contrôle ; b = 0,5 µM ; c = 1 µM ; d = 20 µM CCCP.
- C : valeur des ratios Rh123/DAPI après traitement au CCCP (de 0.5 µM à 20 µM).

Le T-test pour échantillons indépendants a été appliqué : $P<0,05$. Les mesures de fluorescence et les écart-types sont représentatifs de trois expérimentations indépendantes (n=3).

Le traitement CCCP diminue l'intensité de fluorescence de la Rh123 de façon dose-dépendante (Figure 47.A). La comparaison du profil spectral de la Rh123 libre en solution (Figure 47.A.a) avec les profils spectraux de la Rh123 intégrée dans les bactéries (Figure 47.A.b, c, d, e) met en évidence un « red shift ». En effet, le pic d'émission de fluorescence de la Rh123 libre se situe à 524 nm contre 527 nm lorsque la Rh123 est intégrée dans les bactéries (traitées ou non au CCCP). Ces modifications spectrales ont été pour la première décrites lors de marquage de mitochondries isolées avec la Rh123 par Emaus *et al.*, (1986). Aucun effet dose du traitement CCCP n'a été constaté pour le marquage DAPI (Figure 47.B). Les intensités de fluorescence DAPI ne sont pas identiques suivant les conditions de traitement CCCP en raison du protocole de marquage. En effet, les multiples étapes de centrifugation et de lavage nécessaires au protocole de marquage peuvent induire une perte de bactéries plus ou moins importante. Les profils des spectres de fluorescence obtenus avec le fluorimètre démontrent qu'aucune interférence n'est possible entre les mesures de fluorescence de la Rh123 et du DAPI. Le rapport entre la fluorescence de la Rh123 et du DAPI a été calculé afin de rationaliser une évaluation du potentiel membranaire bactérien en fonction d'une concentration bactérienne. Le ratio entre Rh123/DAPI diminue significativement de manière dose-dépendante avec le traitement CCCP (0,5 à 20 µM) (Figure 47.C).

e. Evaluation du ΔΨ bactérien avec la sonde JC-10

En complément du ratio Rh123/DAPI, le JC-10, une sonde ratiométrique cationique lipophilique, a été utilisée. Le JC-10 constitue un dérivé de la sonde JC-1 qui représente la première génération de ces sondes (Novo *et al.*, (1999)). Le JC-10 bénéficie d'une meilleure solubilité en solution aqueuse et présente ainsi une meilleure efficacité et fiabilité que le JC-1. L'analyse du profil du spectre d'émission de la sonde JC-10 après marquage des bactéries *E. coli* a mis en évidence la présence de deux pics de fluorescence à 531 nm (Figure 48.A.a',b',c',d' page 146) et à 582 nm (Figure 48.A.a,b,c,d). Le pic à 531 nm correspond à la fluorescence (verte) de la sonde sous forme monomérique. Le pic à 582 nm correspond à la fluorescence (rouge) de la sonde sous forme d'agrégats dans les bactéries (appelés « J-aggregates »). Lorsque les bactéries sont non traitées et par conséquent polarisées (contrôle : Figure 48.A a et a'), la fluorescence enregistrée est majoritairement présente à 582 nm. Le traitement des bactéries à différentes doses de CCCP a dépolarisé les membranes bactériennes, aboutissant à une chute de leur ΔΨ. Ceci est caractérisé, en fluorimétrie, par une augmentation de la fluorescence verte (531 nm) de manière dose dépendante en CCCP

(Figure 48.A.b',c',d').En parallèle, la fluorescence rouge a diminué fortement. Afin d'évaluer le ΔΨ bactérien, le ratio rouge/vert (582/531 nm) a été calculé pour toutes les conditions testées. Ce ratio a diminué de manière dose-dépendante après traitement au CCCP (Figure 48.B). La diminution du ratio rouge/vert est devenue significative à partir de 1 µM de traitement CCCP. Les calculs des ratios Rh123/DAPI et rouge/vert (JC-10) ont permis d'estimer de façon équivalente le potentiel membranaire bactérien en utilisant l'agent dépolarisant CCCP comme témoin.

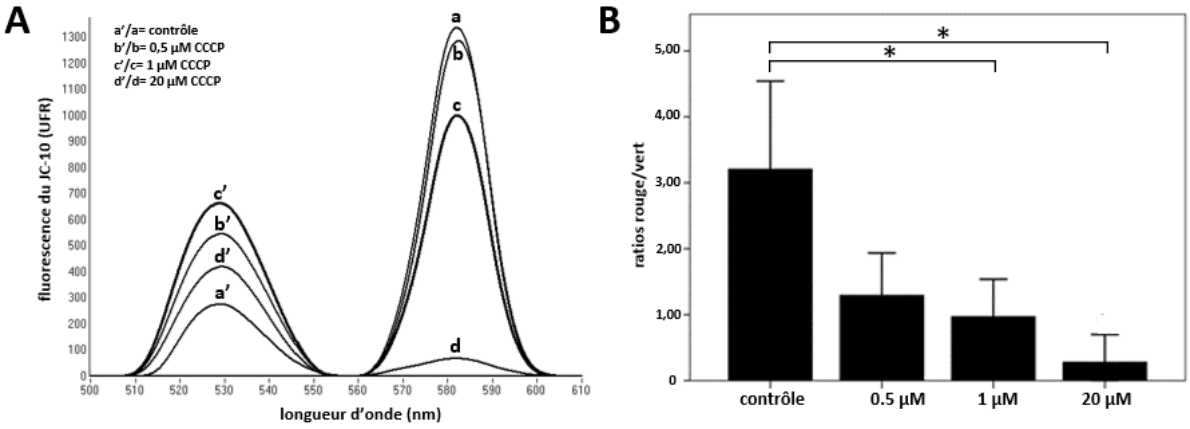


Figure 48 : Evaluation du potentiel membranaire d' *Escherichia coli* avec la sonde JC-10

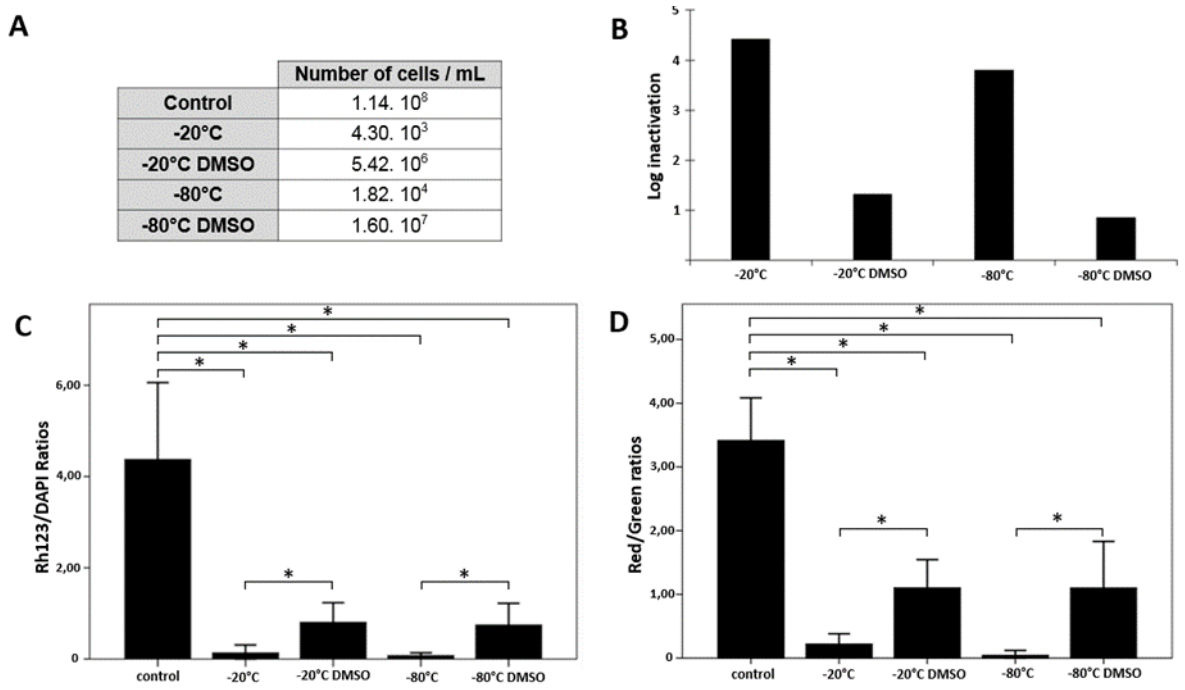
- A : Fluorescence du JC-10 mesurée après traitement CCCP à différentes concentrations : a/a' = contrôle ; b'/b = 0.5 µM CCCP ; c'/c = 1 µM CCCP ; d'/d = 20 µM CCCP.
- B : valeurs de ratios rouge/vert (JC-10) après traitement à différentes concentrations de CCCP (de 0,5 à 20 µM) (n=3).

Le T-test pour échantillons indépendants a été appliqué. P<0,05. Les mesures de fluorescence et les écart-types sont représentatifs de trois expérimentations indépendantes (n=3).

f. Lien entre viabilité bactérienne et ΔΨ bactérien

Le potentiel membranaire bactérien a ensuite été mis en corrélation avec la viabilité. Le ΔΨ est un paramètre important dans l'étude la physiologie bactérienne (Joux et Lebaron, (2000)). Il est impliqué dans la génération de la force protomotrice et il est étroitement lié à la synthèse d'ATP, le transport de substances, la chimiotaxie bactérienne et la survie à pH bas (Sträuber et Müller, (2010)). Par conséquent, le ΔΨ reflète la viabilité cellulaire. Inversement, si la viabilité cellulaire est impactée, alors le ΔΨ l'est également. Afin de mettre en évidence ces notions, l'effet de la congélation (à -20°C et -80°C durant 24 heures) et le rôle protectif du DMSO sur la survie bactérienne ainsi que sur le potentiel membranaire bactérien ont été étudiés avec le ratio Rh123/DAPI et le JC-10 (Figure 49 page 147). La congélation est en effet connue pour impacter la viabilité d'*Escherichia coli* (Gao *et al.*, (2009)). De plus, la problématique du process de congélation/décongélation des filets de poisson est une thématique d'intérêt pour le laboratoire (Ethuin *et al.*, (2015), Diop *et al.*, (2016)). La viabilité

a été suivie en utilisant la technique du dénombrement en milieu solide avec dilutions en série. Le calcul du « log inactivation » décrit dans le paragraphe « Détermination de la viabilité bactérienne » du « matériels et méthodes » page 108 a permis de mettre en évidence l'impact des types de congélation sur la viabilité. Le nombre de bactéries *E. coli* conservées à -20°C était significativement plus faible (environ 4,5 unités log.) que l'échantillon non congelé (Figure 49.A et B). L'effet de la congélation sur la viabilité est moins important à une température de -80°C (4 unités log.). A des températures de congélation de -20°C et -80°C, l'effet cryoprotecteur du DMSO sur la viabilité est nettement plus visible (Figure 49.A et B).



	Number of cells / mL
Control	$1.14.\ 10^{8}$
-20°C	$4.30.\ 10^{3}$
-20°C DMSO	$5.42.\ 10^{6}$
-80°C	$1.82.\ 10^{4}$
-80°C DMSO	$1.60.\ 10^{7}$

Figure 49 : Impact de la congélation sur la viabilité des bactéries *Escherichia coli* et le potentiel membranaire bactérien (ΔΨ)

- A : évaluation de la viabilité d'*Escherichia coli* après 24 heures de culture en boîte de Pétri après différents prétraitements (-20°C ou -80°C avec ou sans diméthylsulfoxide (DMSO)).
- B : Log inactivation après congélation à -20°C ou -80°C avec ou sans DMSO (n=3).
- C : ratios Rh123/DAPI avec différentes conditions de congélation (-20°C ou -80°C avec ou sans DMSO) (n=5).
- D : ratios rouge/vert (JC-10) avec différentes conditions de congélation (-20°C ou -80°C avec ou sans DMSO) (n=5).

Le T-test pour échantillons indépendants a été appliqué. $P<0,05$. n = 3-5.

La congélation à -20°C et -80°C a impacté significativement le ΔΨ bactérien. Une très faible intégration de la sonde Rh123 fut observable. Ceci s'est traduit par un ratio Rh123/DAPI nettement plus faible après congélation à -20°C et -80°C (ratio = 0,1 à 0,2) en comparaison avec le contrôle non congelé (ratio = 4,25). Cependant, lorsque les bactéries sont congelées en présence de DMSO (15 %), le ratio Rh123/DAPI est plus élevé (ratio = 1) que dans le cas des échantillons non incubés avec le DMSO (Figure 49.C). Il est ainsi possible de mettre en

évidence une diminution de la viabilité en se basant sur le ratio Rh123/DAPI dans les différentes conditions de conservation. La corrélation entre viabilité et valeur du ΔΨ bactérien est établie. L'estimation du ΔΨ bactérien avec la sonde JC-10, selon différentes conditions de stockage de congélation, a démontré la même tendance qu'avec le ratio Rh123/DAPI (Figure 49. D). Le ratio rouge/vert diminue fortement après congélation à -20°C (ratio = 0,2) et -80°C (ratio = 0,1) en comparaison avec le contrôle congelé (ratio = 3,45). Le traitement par le DMSO a permis significativement de préserver le ΔΨ aussi bien pour une congélation à -20°C (ratio = 1,1) qu'à -80 °C (ratio = 1,1) (Figure 49.D). Les deux approches ont permis d'aboutir aux mêmes observations en démontrant une réelle fiabilité et sensibilité de par la significativité des résultats obtenus. Ces derniers démontrent également la corrélation entre viabilité cellulaire et le ΔΨ bactérien.

g. Conclusion

Le fluorimètre NanoDrop 3300 a permis avec fiabilité d'estimer le ΔΨ bactérien et *in fine* la viabilité bactérienne. L'ensemble des travaux effectués sur l'évaluation du ΔΨ bactérien avec les sondes Rh123 et JC-10 ont fait l'objet d'une publication présentée en Annexe 1 page 185. D'une part, ces expérimentations sur bactéries ont permis d'ajouter le JC-10 et l'approche ratiométrique Rh123/DAPI dans les listes des méthodes efficaces pour l'évaluation de l'état physiologique bactérien à travers l'étude du ΔΨ bactérien. D'autre part, elles nous ont permis de valider les capacités du NanoDrop 3300 à évaluer la fluorescence de colloïdes de l'ordre du micromètre. Ainsi, le ΔΨ de mitochondries isolées a été déterminé avec le NanoDrop 3300.

2. Optimisation du NanoDrop 3300 sur mitochondries isolées

a. Mitochondries isolées de cellules SAF-1

Le $\Delta\Psi_m$ des mitochondries isolées de cellules SAF-1 a été estimé avec le NanoDrop 3300 en suivant les mêmes conditions expérimentales utilisées avec l'appareil Safas Xenius XC. Les seules différences portent sur le volume analysé et les temps d'acquisition. Le NanoDrop 3300 nécessite seulement 2 µL de solutions mitochondriales à analyser contre 1 mL pour le modèle Safas. De plus, le NanoDrop 3300 ne permet pas une acquisition continue de la fluorescence comme le Safas, mais uniquement une acquisition à des temps précis à différents états respiratoires. Les intensités de fluorescence sont observables sous forme de spectre de fluorescence. La Figure 50.A page 149 est représentative d'une expérience réalisée. Pour chaque spectre de fluorescence, nous pouvons observer que la fluorescence maximale est

atteinte Dans un premier temps, la fluorescence de la Rh123 à l'état basal (mitochondries et substrats respiratoires) a été enregistré (Figure 50.A.courbe c). L'ajout ADP (état 3) diminue le $\Delta\Psi_m$ et par conséquent induit une augmentation de l'intensité de fluorescence (Figure 50.A. courbe b). Le CAT supprime l'action de l'ADP et la fluorescence descend à nouveau (Figure 50.A. courbe d). Enfin, le CCCP dépolarise la membrane interne mitochondriale causant le relargage de la sonde des mitochondries et par conséquent l'augmentation de la fluorescence (Figure 50.A. courbe a). L'intensité de fluorescence de la Rh123 libre dans le tampon de respiration a été mesurée mais n'a pas été représentée sur la Figure 50 afin de faciliter la lecture de cette dernière. Aucun décalage du pic de fluorescence « red shift » (Figure 50.A) n'a été mis en évidence après ajout des mitochondries, contrairement à ce que nous avons pu observer dans le cas des bactéries (voir page 145).

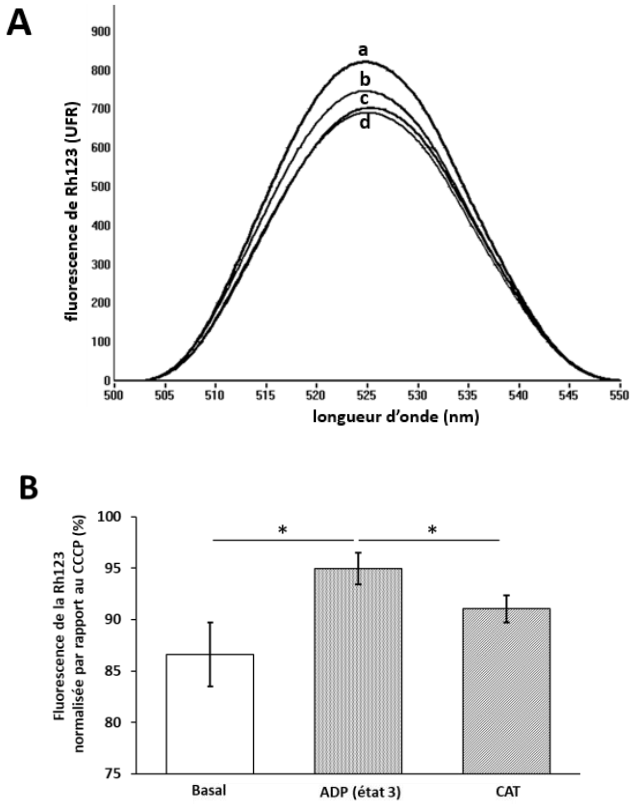


Figure 50 : Evaluation du potentiel membranaire de mitochondries isolées ($\Delta\Psi_m$) de cellules SAF-1 par fluorimétrie (Rh123) avec l'appareil NanoDrop 3300.

- A : Exemple d'acquisition de la fluorescence de la Rhodamine 123 avec le spectrofluorimètre NanoDrop 3300. Chaque courbe est représentative d'un signal de fluorescence enregistré à différents état respiratoire : a = état 3 : CCCP (2 µM) ; b = état 3 : ADP (1 mM); c = état basal : glutamate (5 mM), malate (2 mM), succinate (5 mM) ; d = CAT (5 µM).
- B : Représentation sous forme d'histogramme de l'intensité de fluorescence de la Rh123 en fonction de différents états respiratoires. Les intensités de fluorescence mesurées à l'état basal, après ajout de l'ADP ou du CAT sont normalisées par rapport à l'intensité de fluorescence obtenue après ajout du CCCP (n=3). Les astérisques indiquent les valeurs significativement différentes. Le T-test pour échantillons indépendants a été appliqué. P<0,05. N=3.

Les niveaux de fluorescence mesurés ont été normalisés par rapport à la fluorescence obtenue après ajout du CCCP (Figure 50.B). Ainsi, les niveaux de fluorescence pour chaque état respiratoire, à partir de trois expériences indépendantes, ont été comparés et des différences significatives sont observables. Les résultats obtenus avec les deux spectrofluorimètres sont identiques. Le NanoDrop 3300 permet donc de déterminer, tout comme le Safas, l'intensité de fluorescence de la Rh123 à différents états respiratoires de mitochondries isolées de cellules SAF-1.

Le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées de cellules musculaires de filet de daurade royale a ensuite été évalué.

b. Mitochondries isolées de cellules musculaires de filets de daurade royale

Les mitochondries isolées de filets de daurade royale ont été extraites à différents temps de conservation *post mortem* (J0 à J4) puis le $\Delta\Psi_m$ a été estimé avec le NanoDrop 3300 après marquage à la Rh123. La Figure 51 page 151 illustre les résultats obtenus à chaque jour de conservation pour une expérimentation type (Figure 51.a-e). Pour chaque acquisition, la fluorescence de la Rh123 libre a été mesurée (Figure 51. a.1 ; b.1 ; c.1 ; d.1 ; e.1). L'intensité de fluorescence maximale (pic de fluorescence) de la Rh123 est atteinte à une longueur d'onde de 524 nm. À J0 (Figure 51.a), après ajout des mitochondries, l'intensité de fluorescence diminue dû à l'intégration de la sonde dans les mitochondries. Cette diminution correspond au phénomène de « quenching » suite à l'accumulation de la sonde dans la matrice mitochondriale. Un décalage du pic de fluorescence a été observé à 531 nm après ajout des mitochondries. Cette modification de propriétés spectrales de la Rh123 dénommé « red shift » intégrée dans des mitochondries énergisées a également été observée par Emaus *et al.*, (1986). Nous l'avons également observé sur les expérimentations sur *E. coli* avec le NanoDrop 3300 (Figure 47.A page 144 et paragraphe page 145).

L'ajout d'ADP (état 3) a provoqué une augmentation de la fluorescence due à la baisse du $\Delta\Psi_m$. L'ajout de CAT a annulé l'effet de l'ADP et a participé à une baisse de fluorescence de la Rh123. Enfin, l'addition de CCCP a provoqué l'effondrement du $\Delta\Psi_m$ et a induit une forte augmentation de la fluorescence de la Rh123. Sous l'effet du CCCP, les propriétés spectrales de la Rh123 sont modifiées : le pic de fluorescence est atteint à 526 nm. Ce phénomène illustre la baisse brutale du $\Delta\Psi_m$ après ajout du CCCP (Emaus *et al.*, (1986)).

Ainsi, les résultats obtenus avec le NanoDrop 3300 à J0 à différents états respiratoires sont équivalents à ceux observées avec le Safas.

De J0 à J2 (Figure 51.a-c), les profils de fluorescence enregistrés présentent les mêmes variations de fluorescence en fonction des états respiratoires. À partir de J3 (Figure 51.d), les variations d'intensité de fluorescence sont moins importantes. À J4 (Figure 51.e), les profils des spectres de fluorescence acquis sont très proches. L'effet « quenching » est toujours présent mais moins intense par rapport aux données de J0. Les ajouts d'ADP, de CAT et de CCCP ont provoqué de faibles effets sur l'intégration et la sortie de la Rh123.

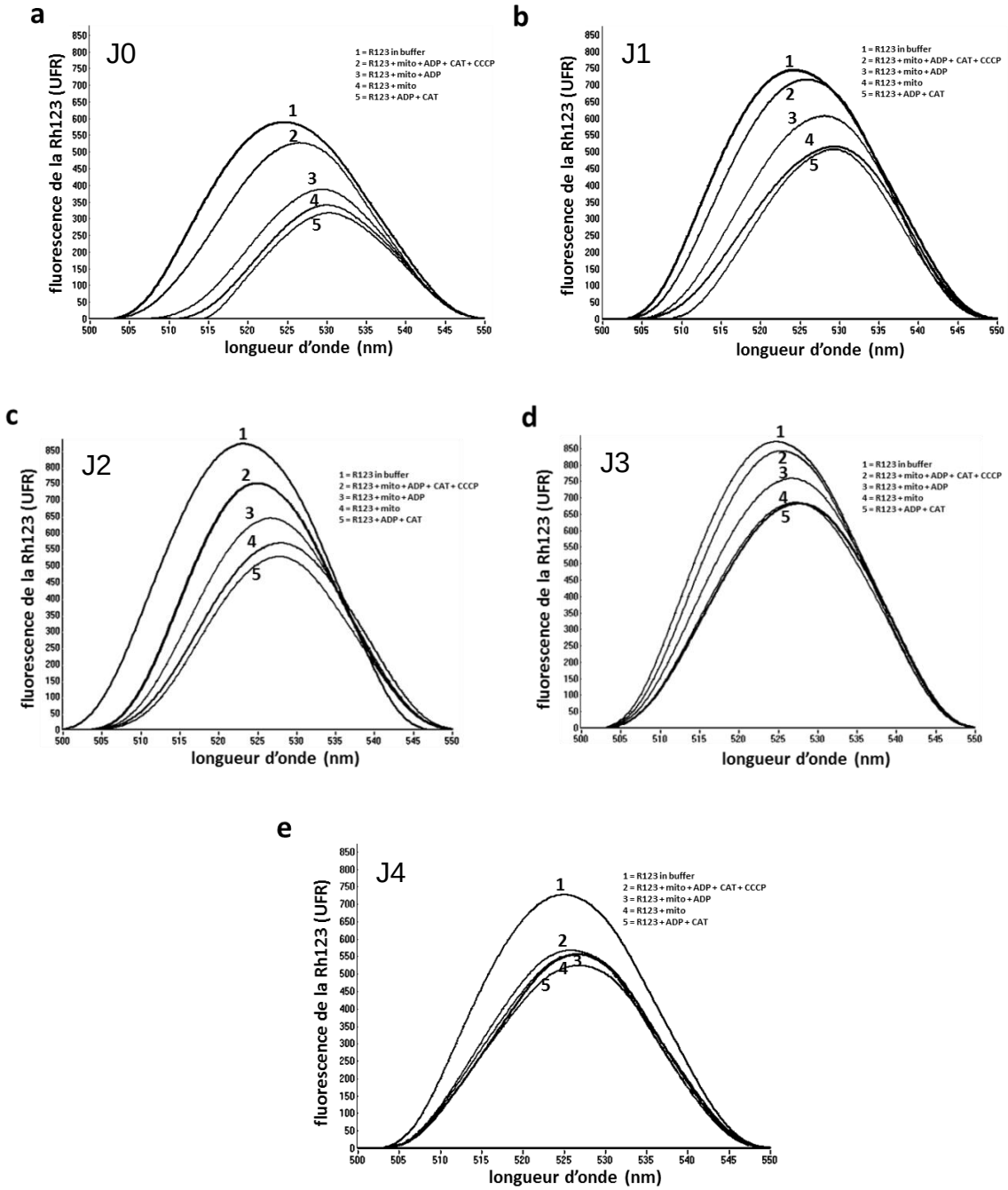


Figure 51 : Evaluation *post mortem* du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) de mitochondries isolées de daurade royale à différents temps de conservation par le fluorimètre NanoDrop 3300
Chaque graphique représente un intervalle de temps *post mortem* : a : J0, b : J1, c : J2, d : J3, e : J4. Ces graphiques sont représentatifs d'une expérience.

Le phénomène de « red shift », après ajout des mitochondries, est très faible avec un décalage de 524 à 527 nm. Ces résultats obtenus à J4 démontrent que les mitochondries ne sont pas autant énergisées qu'à J0, J1, J2 et J3. Le potentiel membranaire mitochondrial est fortement impacté à J4 (96 h). Tout comme pour les analyses effectuées avec le Safas, les niveaux de fluorescence enregistrés à différents états respiratoires par le NanoDrop 3300 ont été normalisés par rapport aux niveaux de fluorescence obtenus après ajout du CCCP. La Figure 52 ci-dessous présente l'approche statistique réalisée à partir de 3 à 6 expérimentations suivant les conditions. De J0 à J2, les niveaux de florescence mesurés après ajout d'ADP ou de CAT sont significativement différents des niveaux de fluorescence enregistrés après ajout de l'ADP (état 3). Ceci démontre que les mitochondries sont énergisées et couplées entre J0 à J2 avec un $\Delta\Psi_m$ conservé. À partir de J3, ces différences ne sont plus significatives, démontrant ainsi le découplage mitochondrial et la perte du $\Delta\Psi_m$. Les niveaux de fluorescence enregistrés à l'état basal ou après ajout de CAT à J0 et J1 sont significativement plus faibles qu'à J4. Cette observation démontre l'évolution du $\Delta\Psi_m$ entre J0/J1 et J4. Cependant, les niveaux de fluorescence acquis à l'état 3 (ADP) ne sont pas significativement différents entre J0 et J4.

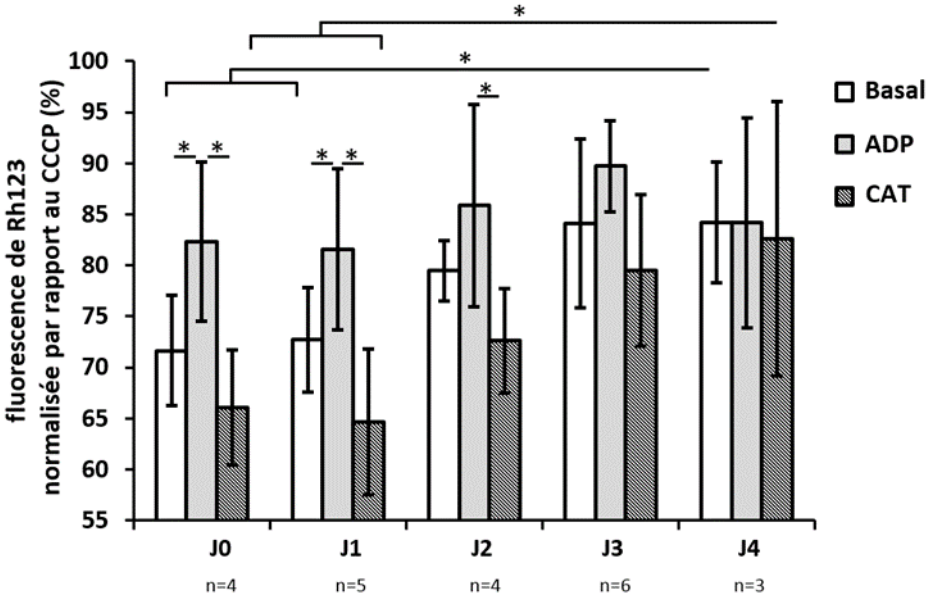


Figure 52 : Histogrammes résumant les niveaux de fluorescence de la Rh123 à différents états respiratoires normalisés par rapport au CCCP à différents temps de conservation (NanoDrop 3300)
Les astérisques indiquent les valeurs qui sont significativement différentes. Le T-test pour échantillons indépendants a été appliqué (P<0,05, n=3-6).

c. *Comparaison du Safas et du NanoDrop 3300*

Avec le spectrofluorimètre classique Safas, les intensités de fluorescence de la Rh123 à l'état 3, à l'état basal et l'état sous action CAT, de J0 à J2, sont significativement différentes de celles mesurées à J4. La baisse du $\Delta\Psi_m$ est significativement mise en évidence.

Avec le NanoDrop 3300, seules les intensités de fluorescence enregistrées à l'état basal et l'état sous l'action du CAT à J0 et J1 sont significativement différentes de celles mesurées à J4. La comparaison des résultats obtenus avec le Safas (Figure 44 page 139) et le NanoDrop 3300 (Figure 52 page 152), démontre que le NanoDrop 3300 est un appareil moins fiable pour déterminer le $\Delta\Psi_m$ de mitochondries isolées de cellules musculaires de filet de daurade royale. Outre les capacités propres aux deux appareils à évaluer la fluorescence de la Rh123 intégrée dans les mitochondries, les différences de résultats entre le NanoDrop 3300 et le Safas peuvent s'expliquer par le volume d'échantillon analysé. Dans notre protocole, les mitochondries sont marquées à la Rh123 dans un volume final de tampon de respiration de 1 mL. La mesure de la fluorescence avec le Safas s'effectue en cuve de 3 mL. La fluorescence totale de la solution est ainsi mesurée. À l'inverse, la méthodologie utilisée avec le NanoDrop 3300 requiert 2 µL de solution.

5 mesures sont effectuées par condition. Ainsi, 2 % de la solution de mitochondries sont analysés (2 µL sur 1 mL). Cette différence de méthodologies entre les deux fluorimétres peut ainsi expliquer la divergence des résultats obtenus. L'élaboration d'un protocole de marquage des mitochondries isolées plus adapté au NanoDrop 3300 pourrait permettre d'améliorer la fiabilité de la méthode afin de mieux estimer le $\Delta\Psi_m$. Des modifications du protocole de marquage telles que la réduction du volume du tampon de respiration ou encore une répétition plus importante du nombre de mesures sont à envisager.

Conclusion générale et perspectives

Le but de ces travaux de thèse était de rechercher et d'étudier des marqueurs précoces permettant de déterminer l'état de fraîcheur des filets de poisson. Ces travaux se sont axés sur les fonctions et l'intégrité mitochondriales comme potentiels marqueurs de fraîcheur du poisson. Ils ont permis d'une part, d'apporter davantage de connaissances fondamentales sur l'évolution biochimique *post mortem* des filets de poisson et d'autre part d'exposer les fonctions et l'intégrité mitochondriales comme nouveaux indicateurs de fraîcheur de filets de poisson. L'ensemble de ces travaux a été réalisé avec la daurade royale (*Sparus aurata*) d'aquaculture comme modèle d'étude. En parallèle, la lignée cellulaire de fibroblastes de daurade royale (SAF-1) nous a servi de modèle de référence pour développer nos méthodologies et étudier les caractéristiques mitochondriales des cellules de poisson.

I. Etude de la structure de mitochondries de poisson par microscopie électronique à transmission

Dans un premier temps, une étude microscopique a été réalisée sur la lignée SAF-1 et les cellules musculaires de filets de daurade royale. Cette approche a permis d'étudier les caractéristiques morphologiques et structurales des mitochondries de daurade royale. L'évolution de ces caractéristiques *post mortem* a également été observée à différents temps de conservation à 4°C. À J0, soit 6 heures *post mortem*, les mitochondries des cellules musculaires de filets de daurade royale étaient en majorité intactes et présentaient des structures très bien conservées. À partir de J3 (72 h PM), des altérations structurales importantes des mitochondries ont pu être mises en évidence telles que l'altération des crêtes et des membranes ainsi que le gonflement et l'accumulation de granules de calcium. Ces altérations étaient davantage accentuées à J4 (96 h PM) et J6 (144 h PM). Ces observations nous ont permis d'apporter plus de connaissances sur l'évolution structurale *post mortem* des mitochondries de poisson. En effet, les études antérieures sur l'évolution structurale des tissus musculaires de poisson étaient peu axées sur les mitochondries, mais essentiellement sur les myofibrilles. L'étude microscopique nous a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'évolution structurale des mitochondries et l'évolution des fonctions et de l'intégrité mitochondriales *post mortem*.

II. Microscopie à fluorescence et cytométrie en flux

Le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) joue un rôle essentiel et nécessaire dans les fonctions et l'intégrité mitochondriales. Ainsi, l'évaluation du $\Delta\Psi_m$ constitue un indicateur de

la « santé » mitochondriale. Le $\Delta\Psi m$ a été estimé chez les cellules SAF-1 avec la sonde Rh123 par microscopie à fluorescence et cytométrie en flux. La Rh123 ne s'est pas montrée efficace pour évaluer efficacement le $\Delta\Psi_m$ de la cellule entière SAF-1. Pour ces raisons, la sonde Red CMXRos a été utilisée et a démontré une efficacité significative dans l'évaluation du $\Delta\Psi_m$ par cytométrie en flux. Ces études préliminaires de l'évaluation du $\Delta\Psi_m$ chez le modèle SAF-1 devaient constituer une méthodologie afin d'étudier les fonctions et l'intégrité mitochondriales d'adipocytes extraits de cellules musculaires de daurade royale à différents intervalles de temps *post mortem*. Des problèmes techniques et logistiques ne nous ont pas permis d'étudier le $\Delta\Psi_m$ d'adipocytes extraits. Ces travaux de thèse se sont ainsi dirigés vers l'étude de l'activité de mitochondries isolées.

III. Etude des fonctions et de l'intégrité de mitochondries isolées

Après mise au point de protocoles d'extraction de mitochondries, la respiration et le $\Delta\Psi_m$ des mitochondries ont été évalués chez les cellules SAF-1 et les cellules musculaires de filets de daurade royale à différents intervalles de temps *post mortem*. À partir de J4 (96 h *post mortem*), des changements significatifs des fonctions et de l'intégrité mitochondriales ont été mis en évidence : diminution de la respiration mitochondriale et altération du $\Delta\Psi_m$. Ainsi, nous avons estimé que le J4 (96 h *post mortem*) constituait un temps de conservation critique chez la daurade royale. Nous pouvons ainsi distinguer 2 paliers d'état de fraîcheur pour les filets de daurade royale stockés à 4°C : un produit ultra frais entre J0 et J3 et un produit frais à J4.

D'autres études ont rapporté des altérations significatives *post mortem* à J4 chez la daurade royale dans des conditions de stockage à 4°C : la disparition du collagène insoluble, (Suárez *et al.*, (2005)), de la dystrophine (qui assure un lien entre l'actine du cytosquelette et la matrice extracellulaire), le détachement des fibres musculaires et du myocommata, la réduction de la dureté de la chair (Caballero *et al.*, (2009)), la forte libération de la lactate déshydrogénase (LDH) indiquant une lyse cellulaire (Diop *et al.*, (2016)). La littérature confirme ainsi que le J4 est un temps de conservation crucial chez le muscle de daurade royale qui constitue le point de départ d'importantes altérations cellulaires à tous niveaux.

L'ensemble de nos résultats ont permis d'établir une corrélation entre les importantes altérations structurales mitochondriales et la diminution des fonctions et de l'intégrité mitochondriales à J4.

IV. Evolution *post mortem* du muscle de daurade royale

Après la mort du poisson, les cellules musculaires sont privées d'oxygène et de nutriments aboutissant à des conditions anaérobies. Dans ces conditions, la production d'ATP diminue fortement. Les cellules, pour « survivre », vont maintenir un niveau d'ATP par différents moyens : dégradation de la phosphocréatine et glycolyse anaérobie du glycogène (Huss, (1999), Ahmed *et al.*, (2015), Delbarre-Ladrat *et al.*, (2006)). Cependant, ces voies ne sont pas suffisantes pour maintenir le niveau d'ATP. En conséquence, le niveau d'activité des pompes calciques va fortement diminuer aboutissant à la perturbation de l'homéostasie du calcium et à l'augmentation cytosolique de calcium. La libération massive de calcium dans le sarcoplasme, suite à l'altération mitochondriale, est responsable de l'activation de protéases endogènes du muscle telles que les calpaïnes et les cathepsines responsables de l'altération des myofibrilles et des myofilaments (Ahmed *et al.*, (2015)). Il en résulte des modifications texturales du filet (dureté, élasticité…). Le calcium en excès dans le sarcoplasme va ainsi s'intégrer et s'accumuler dans les organites tels que les mitochondries et former des agrégats grâce à la présence du $\Delta\Psi_m$ (Dong *et al.*, (2006), Szabadkai et Duchen, (2008)). À J4, les agrégats de calcium sont nombreux. Les fonctions mitochondriales sont très faibles et la structure fortement dégradée. Dong *et al.*, (2006) supposent que l'accumulation de calcium dans les mitochondries en condition de stress cellulaire entraîne la formation de pores de transition de perméabilité mitochondriale ou « mitochondrial permeability transition pore » (mPTP) responsable de la chute du $\Delta\Psi_m$ et de la perméabilisation des membranes mitochondriales. Nous pouvons supposer que la perméabilisation des membranes mitochondriales à J4 contribue à la libération, dans le sarcoplasme, d'« espèces réactives de l'oxygène » (ERO), de cytochrome c, de calcium et de multiples facteurs induisant de nombreuses altérations cellulaires (Cabon *et al.*, (2013). L'ensemble du scénario possible *post mortem* dans les cellules musculaires de filets de poisson évoqué ci-dessus a été schématisé par la Figure 53 page 160.

Ces travaux ont ainsi permis d'apporter des connaissances fondamentales sur l'évolution *post mortem* du muscle de poisson. Ils ont également permis d'identifier les fonctions et l'intégrité mitochondriales comme marqueurs fiables et efficaces de « l'ultra fraîcheur » de filets de poisson. Cette étude pourrait ainsi être le point de départ pour le développement d'une méthodologie ou d'un kit d'analyse pour déterminer la fraîcheur du poisson à des stades précoces. Etant donné les compétences techniques requises et la durée de la méthodologie, le

test serait applicable non pas lors de contrôles de routine mais en cas de doutes sur la fraîcheur d'un poisson.

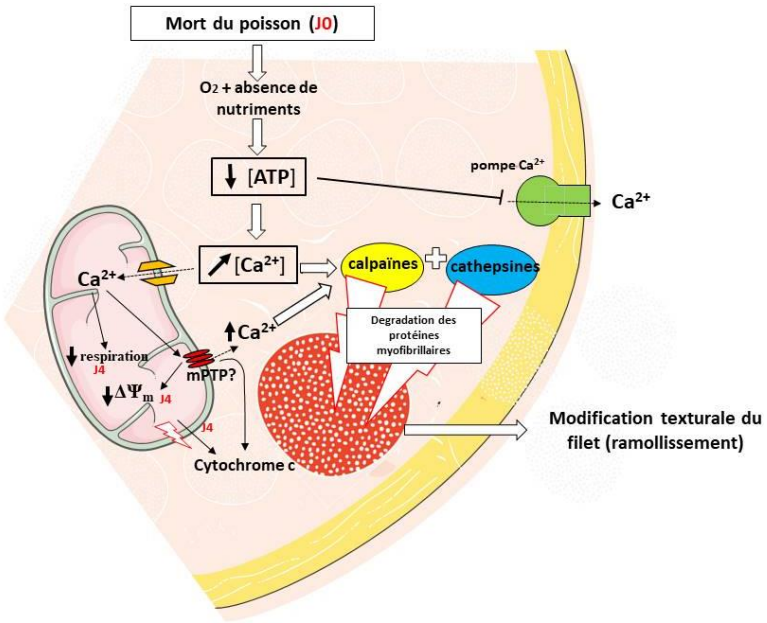


Figure 53 : Scénario hypothétique de l'évolution physiologique *post mortem* d'une cellule musculaire de filet de daurade royale de J0 à J4

V. Perspectives

Ces travaux ont ouvert la voie à de multiples perspectives.

A. Optimisation de l'utilisation du NanoDrop 3300

Les résultats obtenus avec le NanoDrop 3300 vont dans le sens d'une simplification de la méthodologie. Ces derniers se sont révélés intéressants et prometteurs malgré une fiabilité moindre par rapport à un spectrofluorimètre classique. Des modifications du protocole de marquage des mitochondries permettront d'améliorer la fiabilité des mesures effectuées avec le NanoDrop 3300.

B. Utilisation de nouvelles sondes avec le cytomètre en flux

L'acquisition récente d'un cytomètre en flux nous a amené à étudier les mitochondries isolées de filet de daurade royale avec cet appareil. Des résultats encourageants ont été obtenus. Nous avons observé par microscopie à partir de J3 un gonflement des mitochondries. Un marquage des mitochondries isolées avec une sonde spécifique de la morphologie et de la masse mitochondriale telle que le MitoTracker Green (MTG) couplée à une analyse de cytométrie en flux pourrait permettre de mettre en évidence l'évolution morphologique des mitochondries de poisson à différents intervalles de temps *post mortem*. Des sondes plus sensibles telles que le TMRE ou le TMRM nous permettront d'évaluer le $\Delta\Psi_m$ sur des adipocytes extraits de filets

de poisson. De plus, des sondes calciques pourraient être des candidates appropriées pour étudier l'accumulation de calcium au sein des mitochondries.

C. Etude de la concentration en calcium

Sylvain Marlard, (2013), précédent étudiant en thèse, avait commencé à prospecter le dosage du calcium libre en lien avec la libération de parvalbumine dans l'exsudat de filet de bar frais ou décongelé (Ethuin *et al.*, (2015)). Durant mes travaux de thèse, j'ai mis en évidence l'accumulation croissante de calcium dans les mitochondries sous forme d'agrégats. Il serait judicieux d'étudier l'évolution de cette concentration en calcium dans le cadre d'une évaluation de la fraîcheur de filet de poisson. Ainsi, il serait possible d'évaluer les concentrations calciques dans les mitochondries isolées de filets de poisson à différents de temps de conservation à l'aide de sondes fluorescentes. Les sondes CTC (Caswell, (1972), Ichas *et al.*, (1997)) ou Rhod-2AM (Minta *et al.*, (1989)) ont démontré de bonnes aptitudes sur mitochondries isolées pour ce type d'étude.

D. De la mitochondrie au tissu dans l'optique d'apporter des réponses rapides aux industriels

Les industriels sont demandeurs de méthodes fiables, peu onéreuses, non destructives et surtout rapides. La méthodologie développée dans ces travaux de thèse a démontré la pertinence d'étudier les fonctions et l'intégrité mitochondriales comme marqueurs précoces de fraîcheur de filets de poisson. Toutefois, notre méthodologie nécessite des compétences spécifiques, l'utilisation complète du filet analysé et un temps de manipulation de 3 heures. Ainsi, cette méthodologie serait plus appropriée dans le cadre d'un doute sur un produit qui demanderait une analyse approfondie et non pas une analyse de routine. Il conviendrait, en perspective, de se soustraire de l'étape d'extraction des mitochondries et d'estimer la respiration mitochondriale directement à partir de tissus de poisson (fibres musculaires) à différents temps de conservation. Une perspective visant à simplifier l'étude des fonctions et de l'intégrité mitochondriales de cellules de muscles de daurade royale serait d'estimer directement la respiration ou le $\Delta\Psi_m$ à partir de tissus ou de cellules extraites telles que les adipocytes de filets de daurade royale à différents intervalles *post mortem*. Le cytomètre de flux acquis récemment (décembre 2017) et la future acquisition d'un oxygraphe Oroboros (décembre 2018) nous permettront de développer cet axe de recherche.

Sur ce principe d'étude de la physiologie cellulaire directement à partir de tissu, une méthodologie a été développée au laboratoire en collaboration avec le Dr. Philippe PASDOIS et a fait l'objet du dépôt d'une enveloppe Soleau.

E. Etude de l'intégrité mitochondriale avec de nouveaux paramètres physiques et chimiques

Les fonctions et l'intégrité mitochondriales peuvent être maintenues durant un temps plus long en utilisant différentes conditions expérimentales. Il serait notamment intéressant d'étudier une température de stockage de 0°C à 2°C couplée ou non à l'utilisation d'additifs naturels, voire d'un conditionnement sous atmosphère modifié. Ces conditions ont en effet été décrites comme efficaces pour allonger la durée de conservation de la daurade royale (Mendes, (2018)). Notre méthodologie permettrait ainsi de valider ou non certains « process » visant à augmenter la durée de conservation du poisson.

F. Etudes à mener sur d'autres espèces d'intérêt commercial

La daurade royale représente la troisième espèce la plus élevée en Europe. Il serait intéressant d'évaluer les fonctions et l'intégrité mitochondriales sur d'autres espèces de poisson d'élevage telles que la truite, le saumon ou le bar. Des variabilités des fonctions et de l'intégrité mitochondriales *post mortem* entre espèces de poisson pourraient ainsi être mises en évidence. Chaque espèce de poisson possède son « profil » des fonctions et de l'intégrité mitochondriales *post mortem* et donc un palier d'ultra fraîcheur et de fraîcheur spécifique.

G. Etude de marqueurs mitochondriaux pour différencier les filets frais de filets décongelés

En plus de la recherche de marqueurs précoces de la fraîcheur, la filière pêche est également très demandeuse de marqueurs de congélation/décongélation. Il est difficile d'évaluer si un filet de poisson a subi ou non une congélation/décongélation. Un filet de poisson frais peut en effet être confondu facilement avec un filet décongelé. De nombreuses fraudes ont été constatées dans le milieu de la pêche, dont la vente de poisson décongelé au prix du frais. Les marqueurs de congélation/décongélation constituent donc une forte demande de la part des professionnels de la pêche. Le processus de congélation altère la structure des cellules musculaires de filets de poisson. La congélation est à l'origine de cristaux de glace qui produisent des espaces entre les fibres musculaires et des altérations des structures membranaires. Des cavités inter-myofibrillaires se forment également suite à la congélation.

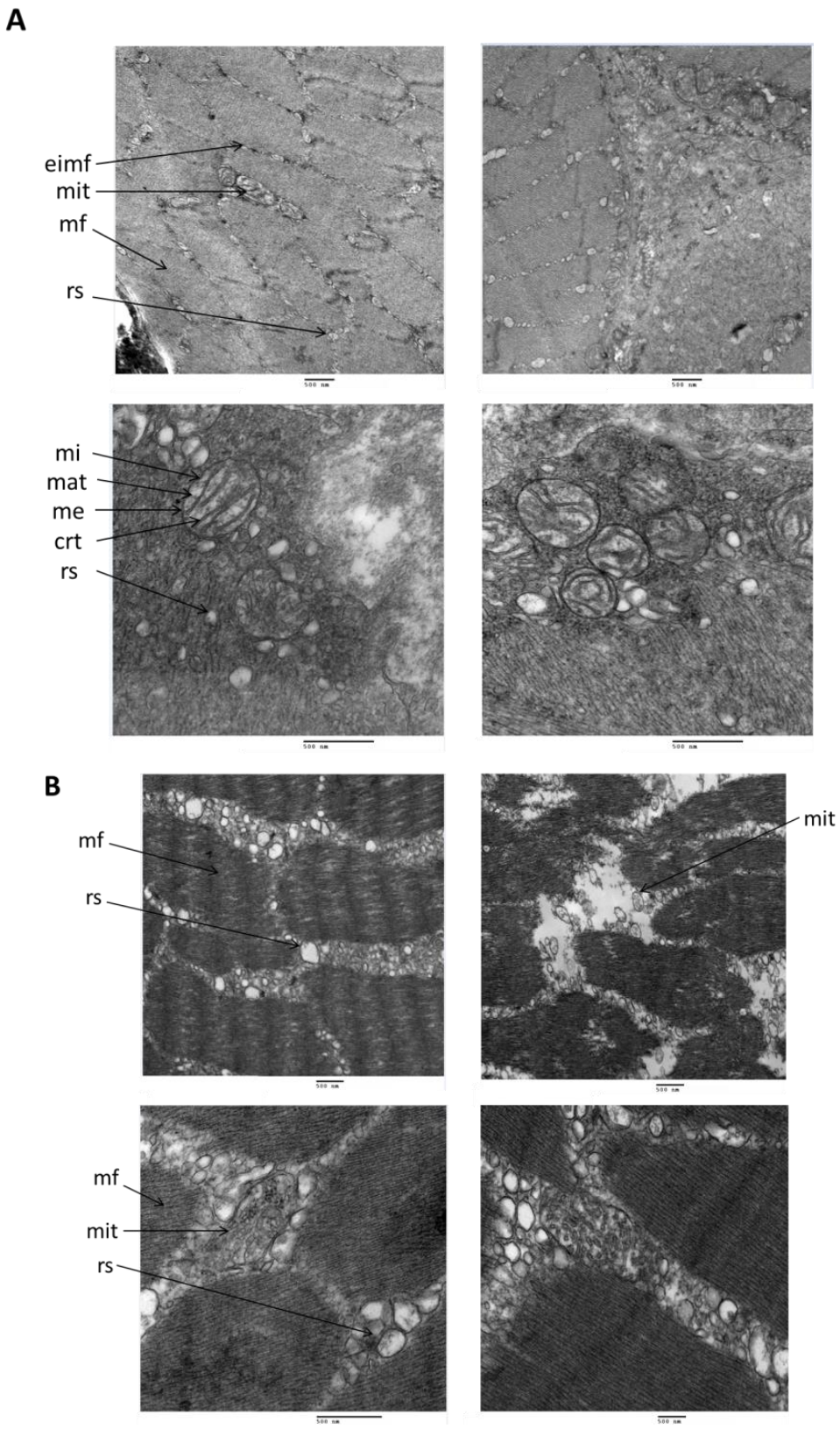


Figure 54 : Sections transversales de muscles de daurade royale observées par microscopie électronique à transmission (MET)

A : filets frais à 6 h *post mortem*
B : filets congelés à 6 h post mortem pendant 24 h puis décongelés
crt : crête ; **eimf** : espace inter-myofibrillaire ; **mat** : matrice ; **me** : membrane externe ; **mf** : myofibrilles ; **mi** : membrane interne ; **mit** : mitochondries; **rs** : réticulum sarcoplasmique.
Barre d'échelle : 500 nm.

Le réticulum sarcoplasmique est altéré et gonflé causant une augmentation significative des espaces inter-myofibrillaires. Toutefois, Les fibres de collagène et le tissu conjonctif sont encore présents (Ayala *et al.*, (2005), Bello *et al.*, (1982)). Des études préliminaires menées au sein du laboratoire ont été réalisées afin de déterminer si la mitochondrie pouvait également constituer un marqueur de congélation/décongélation. Une étude de microscopie électronique à transmission nous a permis de mettre en évidence les importants dommages structuraux dans des cellules musculaires de filet de daurade royale après une congélation de 24 heures suivie d'une décongélation (Figure 54 page 163).

Les structures de cellules musculaires de filets de daurade (6 heures *post mortem*) à l'état frais et décongelé ont été comparées.

Cette étude a mis en évidence des altérations telles que l'apparition d'un espace inter-myofibrillaire ou le gonflement du réticulum sarcoplasmique. Une attention particulière a été portée aux mitochondries. Ces dernières sont apparues gonflées avec des membranes très altérées. Les crêtes ne sont également plus visibles. Les altérations des organites rendent difficiles la discrimination entre réticulum sarcoplasmique et mitochondries. Ces résultats constituent les prémices d'une future étude sur l'utilisation des mitochondries comme marqueurs de différenciation entre les filets de poisson frais et les filets de poisson congelés/décongelés.

Références bibliographiques

Abbas, K., Saleh, A., Mohamed, A. et Lasekan, O. (2009) The relationship between water activity and fish spoilage during cold storage: A review. *J. Food Agric. Environ* 7, pp 86-90.

Abbas, K. A., Mohamed, A., Jamilah, B. et Ebrahimian, M. (2008) A review on correlations between fish freshness and pH during cold storage. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 4, 4, pp 416-421.

Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V. et Real, F. (2009) Invasion and survival of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.* 32, 6, pp 535-41.

Adachi, M., Higuchi, H., Miura, S., Azuma, T., Inokuchi, S., Saito, H., Kato, S. et Ishii, H. (2004) Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, 3, pp G695-G705.

Adamopoulos, K. G. et Goula, A. M. (2004) Application of near-infrared reflectance spectroscopy in the determination of major components in taramosalata. *J. Food Eng.* 63, 2, pp 199-207.

Adelstein, R. S. et Eisenberg, E. (1980) Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 1, pp 921-956.

Ahmed, Z., Donkor, O., Street, W. A. et Vasiljevic, T. (2015) Calpains- and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. *Trends Food Sci. Technol.*

Alasalvar, C., Taylor, K., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M. et Grigorakis, K. (2001) Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chem.* 72, 1, pp 33-40.

Antonacopoulos, N. et Vyncke, W. (1989) Determination of volatile basic nitrogen in fish: a third collaborative study by the West European Fish Technologists' Association (WEFTA) Bestimmung des flüchtigen Basenstickstoffs in Fisch: 3. Ringversuch der WEFTA (Vereinigung westeuropäischer Fischtechnologen). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 189, 4, pp 309-316.

Arnold, S. et Kadenbach, B. (1997) Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur. J. Biochem.* 249, 1, pp 350-354.

Aubourg, S. P., Quitral, V., Angélica Larraín, M., Rodríguez, A., Gómez, J., Maier, L. et Vinagre, J. (2007) Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. *Food Chem.* 104, 1, pp 369-375.

Aursand, M., Veliyulin, E., Standal, I. B., Falch, E., Aursand, I. G. et Erikson, U. (2009) Chapter 11: Nuclear magnetic resonance dans *Fishery Products: Quality, safety and authenticity* (Rehbein, H., & Oehlenschägler, J., Ed.) pp 252-272, Wiley & Sons. I.S.B.N.: 978-1-4051-4162-8

Ayala, M., Gil, F., Ramírez-Zarzosa, G., Abellán, E. et Moreno, F. (1999) Red muscle development of gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.): structural and ultrastructural morphometry. *Anat., Histol., Embryol.* 28, 1, pp 17-22.

Ayala, M. D., Abdel, I., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M. J., Gil, F., Blanco, A. et Albors, O. L. (2010) Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. *LWT-Food Sci. Technol.* 43, 3, pp 465-475.

Ayala, M. D., Albors, O. L., Blanco, A., Alcázar, A. G., Abellán, E., Zarzosa, G. R. et Gil, F. (2005) Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture* 250, 1-2, pp 215-231.

Ayala, M. D., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M. J., Blanco, A., Vázquez, J. M. et Albors, O. L. (2011) Muscle tissue structure and flesh texture in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., fillets preserved by refrigeration and by vacuum packaging. *LWT-Food Sci. Technol.* 44, 4, pp 1098-1106.

Azzone, G., Zoratti, M., Petronilli, V. et Pietrobon, D. (1985) The stoichiometry of H^+ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. *J. Inorg. Biochem.* 23, 3-4, pp 349-356.

Ballantyne, J. S. (1994) Chapter 41 - Fish mitochondria dans *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Hochachka, P. W., & Mommsen, T. P., Ed.) pp 487-502, Elsevier. I.S.B.N.: 1873-0140

Bandín, I., Olveira, J., Borrego, J., Dopazo, C. et Barja, J. (2006) Susceptibility of the fish cell line SAF-1 to betanodavirus. *J. Fish Dis.* 29, 10, pp 633-636.

Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G. et Lenaz, G. (2003) Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F0 during ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1606, 1-3, pp 137-146.

Barksdale, K. A., Perez-Costas, E., Gandy, J. C., Melendez-Ferro, M., Roberts, R. C. et Bijur, G. N. (2010) Mitochondrial viability in mouse and human postmortem brain. *FASEB J.* 24, 9, pp 3590-3599.

Becila, S., Herrera-Mendez, C. H., Coulis, G., Labas, R., Astruc, T., Picard, B., Boudjellal, A., Pelissier, P., Bremaud, L. et Ouali, A. (2010) Postmortem muscle cells die through apoptosis. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 3, pp 485-493.

Bejar, J., Borrego, J. J. et Alvarez, M. C. (1997) A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 150, 1-2, pp 143-153.

Bejar, J., Porta, J., Borrego, J. J. et Alvarez, M. C. (2005) The piscine SAF-1 cell line: genetic stability and labeling. *Marine Biotechnology* 7, 4, pp 389-395.

Bello, R. A., Luft, J. H. et Pigott, G. M. (1982) Ultrastructural study of skeletal fish muscle after freezing at different rates. *J. Food Sci.* 47, 5, pp 1389-1394.

Bender, E. et Kadenbach, B. (2000) The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS lett.* 466, 1, pp 130-134.

Bernardi, P. (1992) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* 267, 13, pp 8834-8839.

Bernardi, P. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* 79, 4, pp 1127-1155.

Bernardi, P. et Lippe, G. (2018) Channel formation by F-ATP synthase and the permeability transition pore: an update. *Current Opinion in Physiology* 3, pp 1-5.

Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M. et Lippe, G. (2015) The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiological reviews* 95, 4, pp 1111-1155.

Biggerstaff, J., Le Puil, M., Weidow, B., Prater, J., Glass, K., Radosevich, M. et White, D. (2006) New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol. Cell. Probes* 20, 2, pp 141-146.

Blier, P. U. et Guderley, H. E. (1993) Mitochondrial activity in rainbow trout red muscle: the effect of temperature on the ADP-dependence of ATP synthesis. *J. Exp. Biol.* 176, 1, pp 145-158.

Boudida, Y., Becila, S., Gagaoua, M., Boudjellal, A., Sentandreu, M. et Ouali, A. (2015) Muscle to meat conversion in common carp (*cyprinus carpio*): new insights involving apoptosis. 61th. International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST). 2015; 61. International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), Clermont-Ferrand, FRA, 2015-08-23-2015-08-28, 162-162

Bourne, M. (2002) dans *Food texture and viscosity: concept and measurement*, ed., Academic Press, London. I.S.B.N.: 0080491332

Boyer, P. D. (1987) The unusual enzymology of ATP synthase. *Biochemistry* 26, 26, pp 8503-8507.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 1-2, pp 248-254.

Brand, M. D., Chien, L. et Diolez, P. (1994) Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport. *Biochem. J.* 297, 1, pp 27-29.

Brand, M. D. et Nicholls, D. G. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435, 2, pp 297-312.

Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S. et Cornwall, E. J. (2005) The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem. J.* 392, 2, pp 353-362.

Breeuwer, P. et Abee, T. (2004) Assessment of the membrane potential, intracellular pH and respiration of bacteria employing fluorescence techniques. *Mol. Microb. Ecol. Man.* 8, pp 1563-1580.

Bremner, H. (1985) A convenient, easy to use system for estimating the quality of chilled seafoods. *Fish Processing Bulletin*, pp 59-70.

Bremner, H. A. et Hallett, I. C. (1985) Muscle fiber–connective tissue junctions in the fish Blue Grenadier (*Macruronus novaezelandiae*). A scanning electron microscope study. *J. Food Sci.* 50, 4, pp 975-980.

Brunelle, J. et Chandel, N. (2002) Oxygen deprivation induced cell death: an update. *Apoptosis* 7, 6, pp 475-482.

Brunelle, J. K. et Letai, A. (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J. Cell Sci.* 122, 4, pp 437-441.

Busconi, L., Folco, E. J., Martone, C. B. et Sanchez, J. J. (1989) Postmortem changes in cytoskeletal elements of fish muscle. *J. Food Biochem.* 13, 6, pp 443-451.

Caballero, M., Betancor, M., Escrig, J., Montero, D., De Los Monteros, A. E., Castro, P., Ginés, R. et Izquierdo, M. (2009) Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 291, 3-4, pp 210-216.

Cabon, L., Martinez-Torres, A.-C. et Susin, S. A. (2013) La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *médecine/sciences* 29, 12, pp 1117-1124.

Cambier, S., Benard, G., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Rossignol, R., Brethes, D. et Bourdineaud, J.-P. (2009) At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 4, pp 791-799.

Cao, J., Sun, W., Zhou, G., Xu, X., Peng, Z. et Hu, Z. (2010) Morphological and biochemical assessment of apoptosis in different skeletal muscles of bulls during conditioning. *J Anim Sci* 88, 10, pp 3439-44.

Careche, M. et Barroso, M. (2009) dans *Instrumental texture measurement*, Luten, JB. Oehlenschläger, J. Olafsdotttir ed., Wageningen Academic Publishers, Netherlands. I.S.B.N.: 9781444322668

Castro, P., Padrón, J. C. P., Cansino, M. J. C., Velázquez, E. S. et 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, pp 245-248.

Caswell, A. (1972) The migration of divalent cations in mitochondria visualized by a fluorescent chelate probe. *J. Membrane Biol.* 7, 1, pp 345-364.

Chance, B. et Williams, G. (1955) A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature* 175, 4469, p 1120.

Chazotte, B. (2011) Labeling mitochondria with rhodamine 123. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011, 7, pp 892-4.

Cheah, K. et Cheah, A. (1971) Post-mortem changes in structure and function of ox muscle mitochondria. 1. Electron microscopic and polarographic investigations. *J. Bioenerg.* 2, 2, pp 85-92.

Cheah, K. et Cheah, A. (1974) Properties of mitochondria from ox neck muscle after storage in situ. *Int. J. Biochem.* 5, 9-10, pp 753-760.

Chen, L. B. (1988) Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 1, pp 155-181.

Cheng, J. H., Sun, D. W., Han, Z. et Zeng, X. A. (2014) Texture and structure measurements and analyses for evaluation of fish and fillet freshness quality: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 1, pp 52-61.

Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton, M. et Verrez-Bagnis, V. (2007) Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chem.* 101, 4, pp 1474-1479.

Chimerel, C., Field, C. M., Piñero-Fernandez, S., Keyser, U. F. et Summers, D. K. (2012) Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1818, 7, pp 1590-1594.

Chinopoulos, C. (2011) Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast. *FEBS Lett.* 585, 9, pp 1255-9.

Christensen, J., Nørgaard, L., Bro, R. et Engelsen, S. B. (2006) Multivariate autofluorescence of intact food systems. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* 106, 6, pp 1979-1994.

Chung, J., Kang, J. S., Jurng, J. S., Jung, J. H. et Kim, B. C. (2015) Fast and continuous microorganism detection using aptamer-conjugated fluorescent nanoparticles on an optofluidic platform. *Biosens. Bioelectron.* 67, pp 303-308.

Comas, J. et Vives-Rego, J. (1997) Assessment of the effects of gramicidin, formaldehyde, and surfactants on *Escherichia coli* by flow cytometry using nucleic acid and membrane potential dyes. *Cytometry* 29, 1, pp 58-64.

Conley, K. E., Christian, K. A., Hoppeler, H. et Weibel, E. R. (1995) Heart mitochondrial properties and aerobic capacity are similarly related in a mammal and a reptile. *J. Exp. Biol.* 198, 3, pp 739-746.

Conway, E. J. et Byrne, A. (1933) An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances: The micro-determination of ammonia. *Biochem. J.* 27, 2, p 419.

Cottet-Rousselle, C., Ronot, X., Leverve, X. et Mayol, J. F. (2011) Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A* 79, 6, pp 405-25.

Couzinet, A., Hérincs, Z. et Hueber, A.-O. (2002) Régulation de la mort cellulaire programmée: vers une conception plus dynamique. *médecine/sciences* 18, 8-9, pp 841-852.

Crockett, E. L. et Sidell, B. D. (1990) Some pathways of energy metabolism are cold adapted in Antarctic fishes. *Physiol. Zool.* 63, 3, pp 472-488.

Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341, 2, pp 233-249.

Cuesta, A., Meseguer, J. et Esteban, M. A. (2008) The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. *Mol. Immunol.* 45, 8, pp 2333-42.

Dalgaard, P., Buch, P. et Silberg, S. (2002) Seafood spoilage predictor—development and distribution of a product specific application software. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 2, pp 343-349.

Dalgaard, P., Mejlholm, O., Christiansen, T. et Huss, H. H. (1997a) Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere-packed fish products. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 5, pp 373-378.

Dalgaard, P., Mejlholm, O. et Huss, H. H. (1997b) Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 2-3, pp 169-179.

De Marchi, U., Basso, E., Szabò, I. et Zoratti, M. (2006) Electrophysiological characterization of the Cyclophilin D-deleted mitochondrial permeability transition pore. *Mol. Membr. Biol.* 23, 6, pp 521-530.

Dehaut, A. (2014) Evaluation de la qualité-fraîcheur du poisson par des approches biochimiques (SPME-GC/MS) et moléculaires (qPCR). Thèse de l'université de Lille 1.

Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R. et Verrez-Bagnis, V. (2006) Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 5, pp 409-421.

Desagher, S. et Martinou, J.-C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology* 10, 9, pp 369-377.

Devin, A. et Rigoulet, M. (2007) Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am. J. Physiol. : Cell Physiol.* 292, 1, pp C52-8.

Dewson, G. et Kluck, R. (2010) Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health Cytoskeleton* 2, pp 9-22.

Dewson, G., Kratina, T., Sim, H. W., Puthalakath, H., Adams, J. M., Colman, P. M. et Kluck, R. M. (2008) To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3: groove interactions. *Molecular Cell* 30, 3, pp 369-380.

Di Lisa, F. et Bernardi, P. (2009) A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 6, pp 775-780.

Di Natale, C., Olafsdottir, G., Einarsson, S., Martinelli, E., Paolesse, R. et D'Amico, A. (2001) Comparison and integration of different electronic noses for freshness evaluation of cod-fish fillets. *Sens. Actuators, B* 77, 1-2, pp 572-578.

Diop, M., Watier, D., Masson, P.-Y., Diouf, A., Amara, R., Grard, T. et Lencel, P. (2016) Assessment of freshness and freeze-thawing of sea bream fillets (*Sparus aurata*) by a cytosolic enzyme: Lactate dehydrogenase. *Food Chem.* 210, pp 428-434.

Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M. et Venkatachalam, M. A. (2006) Calcium in cell injury and death. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1, pp 405-434.

Duchen, M. R. (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J. Physiol.* 529, 1, pp 57-68.

Duflos, G., Coin, V. M., Cornu, M., Antinelli, J.-F. et Malle, P. (2006) Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 86, 4, pp 600-611.

Dufour, É., Frencia, J. P. et Kane, E. (2003) Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness. *Food Res. Int.* 36, 5, pp 415-423.

Dunajski, E. (1980) Texture of fish muscle. *J. Texture Stud.* 10, 4, pp 301-318.

Dutson, T. R. (1983) Relationship of pH and temperature to disruption of specific muscle proteins and activity of lysosomal proteases. *J. Food Biochem.* 7, 4, pp 223-245.

Emaus, R. K., Grunwald, R. et Lemasters, J. J. (1986) Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 850, 3, pp 436-448.

Erikson, U., Standal, I. B., Aursand, I. G., Veliyulin, E. et Aursand, M. (2012) Use of NMR in fish processing optimization: a review of recent progress. *Magn. Reson. Chem.* 50, 7, pp 471-480.

Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L. et Mignotte, B. (2012) The mitochondrial pathways of apoptosis dans *Advances in Mitochondrial Medicine. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Scatena R., B. P., Giardina B., Ed.) pp 157-183, Springer, Dordrecht. I.S.B.N.: 978-94-007-2869-1

Ethuin, P., Marlard, S., Delosière, M., Carapito, C., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Dehaut, A., Lencel, V., Duflos, G. et Grard, T. (2015) Differentiation between fresh and frozen–thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets using two-dimensional gel electrophoresis. *Food Chem.* 176, pp 294-301.

FAO (2016) dans *The state of world fisheries and aquaculture*, ed., Food & Agriculture Org. I.S.B.N.: 978-92-5-209185-1

Federation of European Aquaculture Producers. (2017) European aquaculture production report 2008-2016.

Feldhusen, F. (2000) The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect.* 2, 13, pp 1651-1660.

Finucane, D. M., Waterhouse, N. J., Amarante-Mendes, G. P., Cotter, T. G. et Green, D. R. (1999) Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Exp. Cell Res.* 251, 1, pp 166-174.

Florenciano, M. A., Cal, R., Hernández-Urcera, J., Blanco, A. et López-Albors, O. (2013) Post-mortem degradation of the muscle tissue in diploid and triploid turbots (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquacult. Int.* 21, 5, pp 1077-1090.

FranceAgrimer. (2017) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2016.

Frey, T. G. et Mannella, C. A. (2000) The internal structure of mitochondria. *TIBS* 25, pp 319-324.

Frezza, C., Cipolat, S. et Scorrano, L. (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured filroblasts. *Nat. Protoc.* 2, 2, p 287.

Friedman, H. H., Whitney, J. E. et Szczesniak, A. S. (1963) The texturometer—a new instrument for objective texture measurement. *J. Food Sci.* 28, 4, pp 390-396.

Gao, W., Leung, K. et Hawdon, N. (2009) Freezing inactivation of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in water: response of different strains. *Water Environ. Res.* 81, 8, pp 824-830.

Garceau, N., Pichaud, N. et Couture, P. (2010) Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by *in vitro* exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquat. Toxicol.* 98, 2, pp 107-112.

Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M. L., Pitter, K., Bird, G. H., Katz, S. G., Tu, H. C., Kim, H., Cheng, E. H., Tjandra, N. et Walensky, L. D. (2008) BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455, 7216, pp 1076-81.

George, N. M., Evans, J. J. et Luo, X. (2007) A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev.* 21, 15, pp 1937-48.

Ghaly, A. E., Dave, D., Budge, S. et Brooks, M. (2010) Fish spoilage mechanisms and preservation techniques. *Am. J. Appl. Sci.* 7, 7, p 859.

Gibson, D. et Ogden, I. (1997) Total viable counts. Methods to determine the freshness of fish in research and industry. Proceedings of the final meeting of the concerted action" Evaluation of fish freshness" AIRCT94 2283 (Nantes).

Gill, T., Keith, R. et Lall, B. S. (1979) Textural deterioration of red hake and haddock muscle in frozen storage as related to chemical parameters and changes in the myofibrillar proteins. *J. Food Sci.* 44, 3, pp 661-667.

Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J. M., Wieckowski, M. R. et Pinton, P. (2012) Mitochondrial Ca^{2+} and apoptosis. *Cell Calcium* 52, 1, pp 36-43.

Glancy, B. et Balaban, R. S. (2011) Protein composition and function of red and white skeletal muscle mitochondria. *Am. J. Physiol. : Cell Physiol.* 300, 6, pp C1280-90.

Goglia, F., Moreno, M. et Lanni, A. (1999) Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS lett.* 452, 3, pp 115-120.

Gram, L. et Dalgaard, P. (2002) Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 3, pp 262-266.

Gram, L. et Huss, H. H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 1, pp 121-137.

Gray, M. W. (2012) Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 9, p a011403.

Green, D. R. et Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, pp 1309-1312.

Griparic, L. et van der Bliek, A. M. (2001) The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic* 2, 4, pp 235-244.

Guderley, H. (2004) Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biol. Rev. Biol. Proc. Cambridge Philos. Soc.* 79, 2, pp 409-427.

Guderley, H. et Johnston, I. (1996) Plasticity of fish muscle mitochondria with thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 199, 6, pp 1311-1317.

Gunter, T. E. et Pfeiffer, D. R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol. : Cell Physiol.* 258, 5, pp C755-C786.

Hamada-Sato, N., Usui, K., Kobayashi, T., Imada, C. et Watanabe, E. (2005) Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. *Food Control* 16, 4, pp 301-307.

Hansford, R. G. et Zorov, D. (1998) Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 1-2, pp 359-369.

Hart, P. J. et Reynolds, J. D. (2008) dans *Handbook of Fish Biology and Fisheries: Fisheries*, ed., John Wiley & Sons. I.S.B.N.: 0470693134

Hartmann, N., Reichwald, K., Wittig, I., Dröse, S., Schmeisser, S., Lück, C., Hahn, C., Graf, M., Gausmann, U. et Terzibasi, E. (2011) Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging cell* 10, 5, pp 824-831.

Hassoun, A. et Karoui, R. (2015) Front-face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring fish freshness stored under different refrigerated conditions. *Food Control* 54, pp 240-249.

Hassoun, A. et Karoui, R. (2017) Quality evaluation of fish and other seafood by traditional and nondestructive instrumental methods: Advantages and limitations. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 9, pp 1976-1998.

Haworth, R. A. et Hunter, D. R. (2000) Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 1, pp 91-96.

Heeres, J. T. et Hergenrother, P. J. (2007) Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 6, pp 644-53.

Henehan, G., Proctor, M., Abu-Ghannan, N., Wills, C. et McLoughlin, J. (1997) Adenine nucleotides and their metabolites as determinants of fish freshness. Methods to determine the freshness of fish in research and industry. Proceedings of the final meeting of the concerted action" Evaluation of fish freshness" AIRCT94 2283 (Nantes).

Hernández-Herrero, M. M., Duflos, G., Malle, P. et Bouquelet, S. (2003) Collagenase activity and protein hydrolysis as related to spoilage of iced cod (*Gadus morhua*). *Food Res. Int.* 36, 2, pp 141-147.

Hilton, Z., Clements, K. D. et Hickey, A. J. (2010) Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *J. Comp. Physiol., B* 180, 7, pp 979-990.

Hoek, J., Nicholls, D. et Williamson, J. (1980) Determination of the mitochondrial protonmotive force in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 255, 4, pp 1458-1464.

Hollenbeck, P., Bray, D. et Adams, R. (1985) Effects of the uncoupling agents FCCP and CCCP on the saltatory movements of cytoplasmic organelles. *Cell Biol. Int. Rep.* 9, 2, pp 193-199.

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Seed, B. et Tschopp, J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8–independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1, 6, p 489.

Hostiuc, S., Rusu, M. C., MĂNOIU, V. S., Vrapciu, A. D., Negoi, I. et Popescu, M. V. (2017) Usefulness of ultrastructure studies for the estimation of the postmortem interval. A systematic review. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 58, 2, pp 377-84.

Howgate, P. (2006) A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 4, pp 341-353.

Huang, F., Huang, M., Zhang, H., Zhang, C., Zhang, D. et Zhou, G. (2016) Changes in apoptotic factors and caspase activation pathways during the postmortem aging of beef muscle. *Food Chem.* 190, pp 110-114.

Huidobro, A., Pastor, A. et Tejada, M. (2000) Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J. Food Sci.* 65, 7, pp 1202-1205.

Huss, H. et Asenjo, I. (1976) Storage life of gutted and ungutted white fish. *Årsberetning, Fiskerministeriets Forsørgslaboratorium, Lyngby, Denmark*, pp 32-48.

Huss, H. H. (1994) dans *Assurance of seafood quality*, ed., Food & Agriculture Org. I.S.B.N.: 925103446X

Huss, H. H. (1995) dans *Quality and quality changes in fresh fish*, ed., Food & Agriculture Org. I.S.B.N.: 9251035075

Huss, H. H. (1999) dans *La qualité et son évolution dans le poisson frais*, ed., Food & Agriculture Org. I.S.B.N.: 9252035079

Ichas, F., Jouaville, L. S. et Mazat, J.-P. (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89, 7, pp 1145-1153.

Ifremer et Pôle Aquimer. (2008) ABVT. *Fiche Bibliomer*, (Octobre 2008), pp 1-4.

Iwamato, M., Yamanaka, H., Abe, H., Ushio, H., Watabe, S. et Hashimoto, K. (1988) ATP and creatine phosphate breakdown in spiked plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved. *J. Food Sci.* 53, 6, pp 1662-1665.

Jablonski, A. (1933) Efficiency of anti-stockes fluorescence in dyes. *Nature* 10, pp 839-840.

Jason, A. C. et Richards, J. (1975) The development of an electronic fish freshness meter. *J. Phys. E: Sci. Instrum.* 8, 10, p 826.

Jiao, N., Yang, Y. et Luo, T. (2004) Membrane potential based characterization by flow cytometry of physiological states in an aerobic anoxygenic phototrophic bacterium. *Aquat. Microb. Ecol.* 37, pp 149-158.

Johnson, L. V., Walsh, M. L. et Chen, L. B. (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2, pp 990-994.

Johnston, I., Calvo, J., Guderley, H., Fernandez, D. et Palmer, L. (1998) Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *J. Exp. Biol.* 201, 1, pp 1-12.

Joux, F. et Lebaron, P. (2000) Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.* 2, 12, pp 1523-1535.

Juin, P. et Vallette, F. (2000) Modifications de la perméabilité membranaire mitochondriale au cours de l'apoptose : ouverture ou rupture ? *Médecine/sciences* 16, 2, pp 261-264.

Jürss, K. et Bastrop, R. (1995) The function of mitochondria-rich cells (chloride cells) in teleost gills. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5, 2, pp 235-255.

Kadenbach, B. (2003) Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1604, 2, pp 77-94.

Kaprelyants, A. et Kell, D. (1992) Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 72, 5, pp 410-422.

Karoui, R. (2004) Contribution à l'étude des propriétés rhéologiques et à la détermination de l'origine géographique des fromages aux moyens des méthodes spectroscopiques et chimiométriques. Thèse de l'université de Clermont-Ferrand 2.

Karoui, R., Thomas, E. et Dufour, E. (2006) Utilisation of a rapid technique based on front-face fluorescence spectroscopy for differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets. *Food Res. Int.* 39, 3, pp 349-355.

Kemp, C. M., Bardsley, R. G. et Parr, T. (2006) Changes in caspase activity during the postmortem conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 84, 10, pp 2841-6.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. et Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 4, p 239.

Krebs, H. (1970) The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14, 1, pp 154-172.

Kroemer, G., Dallaporta, B. et Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 1, pp 619-642.

Kuuliala, L., Al Hage, Y., Ioannidis, A. G., Sader, M., Kerckhof, F. M., Vanderroost, M., Boon, N., De Baets, B., De Meulenaer, B., Ragaert, P. et Devlieghere, F. (2018) Microbiological, chemical and sensory spoilage analysis of raw Atlantic cod (*Gadus morhua*) stored under modified atmospheres. *Food Microbiol.* 70, pp 232-244.

Kuypers, G. A. et Roomans, G. M. (1980) Post-mortem elemental redistribution in rat studied by X-ray microanalysis and electron microscopy. *Histochemistry* 69, 2, pp 145-156.

Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R. et Kunz, W. S. (2008) Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* 3, 6, pp 965-76.

Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. et Fleurence, J. (2003) In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chem.* 81, 4, pp 517-525.

Lanari, M. et Cassens, R. (1991) Mitochondrial activity and beef muscle color stability. *J. Food Sci.* 56, 6, pp 1476-1479.

Lardy, H. A. et Wellman, H. (1952) Oxidative phosphorylations: role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J. Biol. Chem.* 195, 1, pp 215-224.

Lin, H.-C. et Sung, W.-T. (2003) The distribution of mitochondria-rich cells in the gills of air-breathing fishes. *Physiol. Biochem. Zool.* 76, 2, pp 215-228.

Lionetti, L., Mollica, M. P., Donizzetti, I., Gifuni, G., Sica, R., Pignalosa, A., Cavaliere, G., Gaita, M., De Filippo, C. et Zorzano, A. (2014) High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. *PLoS One* 9, 3, p e92753.

Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., Picard, B. et Bugeon, J. (2016) How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *Sci. World J.* 2016, p 3182746.

Liu, D., Zeng, X.-A. et Sun, D.-W. (2013) NIR spectroscopy and imaging techniques for evaluation of fish quality—a review. *Appl. Spectrosc. Rev.* 48, 8, pp 609-628.

Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. et Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 1, pp 147-157.

Loomis, W. F. et Lipmann, F. (1948) Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. *J. Biol. Chem.* 173, 2, pp 807-808.

Luciani, S., Martini, N. et Santi, R. (1971) Effects of carboxyatractyloside a structural analogue of atractyloside on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Life Sci.* 10, 17, pp 961-968.

Lum, M.-G. et Nagley, P. (2003) Two phases of signalling between mitochondria during apoptosis leading to early depolarisation and delayed cytochrome c release. *J. Cell Sci.* 116, 8, pp 1437-1447.

Ly, J. D., Grubb, D. et Lawen, A. (2003) The mitochondrial membrane potential (Δψm) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8, 2, pp 115-128.

Ma, J., Kang, M., Zhang, Y., Guo, X., Tian, Z., Ding, C. et Wang, H. (2017) Self-defense of *Escherichia coli* against damages caused by nanoalumina. *Environ.Toxicol. Pharmacol.* 55, Supplement C, pp 110-117.

Majka, S. M., Miller, H. L., Helm, K. M., Acosta, A. S., Childs, C. R., Kong, R. et Klemm, D. J. (2014) Analysis and isolation of adipocytes by flow cytometry. *Methods Enzymol.* 537, pp 281-96.

Mannella, C. A. (2008) Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, pp 171-9.

Marchetti, P. (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J. Exp. Med.* 184, 3, pp 1155-1160.

Marlard, S. (2013) Différenciation de filets de poisson frais de filets congelés/décongelés sur le modèle du bar (*Dicentrarchus labrax*). Thèse de l'université du Littoral Côte d'Opale.

Martinez, I., Olsen, R. L., Nilsen, H. et SØRensen, N. K. (1997) Seafood: fulfilling market demands. *Outlook Agric.* 26, 2, pp 107-114.

Matsuyama, T. (1984) Staining of living bacteria with rhodamine 123. *FEMS Microbiol. Lett.* 21, 2, pp 153-157.

Mendes, R. (2018) Technological processing of fresh gilthead seabream (*Sparus aurata*): A review of quality changes. *Food Rev. Int.*, pp 1-34.

Minamikawa, T., Williams, D. A., Bowser, D. N. et Nagley, P. (1999) Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells. *Exp. Cell Res.* 246, 1, pp 26-37.

Minta, A., Kao, J. et Tsien, R. Y. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264, 14, pp 8171-8178.

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, pp 144-148.

Mitchell, P. (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206, 4423, pp 1148-1159.

Mnatsakanyan, N., Park, H.-A., Wu, J., Miranda, P. et Jonas, E. A. (2018) Molecular composition, structure and regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Biophys. J.* 114, 3, p 658a.

Modica-Napolitano, J. S. et Aprille, J. R. (1987) Basis for the selective cytotoxicity of rhodamine 123. *Cancer research* 47, 16, pp 4361-4365.

Modica-Napolitano, J. S., Weiss, M. J., Chen, L. B. et Aprille, J. R. (1984) Rhodamine 123 inhibits bioenergetic function in isolated rat liver mitochondria. *B.B.R.C.* 118, 3, pp 717-723.

Monfort, P. et Baleux, B. (1996) Cell cycle characteristics and changes in membrane potential during growth of *Escherichia coli* as determined by a cyanine fluorescent dye and flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 25, 1, pp 79-86.

Monin, G. (1988) Evolution post-mortem du tissu musculaire et conséquences sur les qualités de la viande de porc. Journées Rech. porcine en France

Morcillo, P., Esteban, M. Á. et Cuesta, A. (2016) Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere* 144, pp 225-233.

Morganti, C., Bonora, M., Sbano, L., Morciano, G., Aquila, G., Campo, G., Wieckowski, M. R., Giorgi, C. et Pinton, P. (2018) The mitochondrial permeability transition pore dans *Mitochondrial biology and experimental therapeutics* (P., O., Ed.) pp 47-73, Springer. I.S.B.N.: 978-3-319-73344-9

Mousdis, G. et Mellou, F. (2017) Vibrational and fluorescence spectroscopy dans *Food authentication: management, analysis and regulation* (Constantinos, Ed.) pp 298-324, John Wiley & Sons. I.S.B.N.: 1118810244

Moyes, C. D., Battersby, B. J. et Leary, S. C. (1998) Regulation of muscle mitochondrial design. *J. Exp. Biol.* 201, 3, pp 299-307.

Moyes, C. D. et Hood, D. A. (2003) Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 65, pp 177-201.

Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B. et Wong, S.-L. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 6580, p 335.

Muthukrishnan, T., Govender, A., Dobretsov, S. et Abed, R. M. (2017) Evaluating the reliability of counting bacteria using epifluorescence microscopy. *Journal of Marine Science and Engineering* 5, 1, p 4.

Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T. et Tsujimoto, Y. (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 7033, pp 652-8.

Nass, S., Nass, M. M. et Hennix, U. (1965) Deoxyribonucleic acid in isolated rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Protein Synth.* 95, 3, pp 426-435.

Nedergaard, J. et Cannon, B. (1992) Chapter 17 The uncoupling protein thermogenin and mitochondrial thermogenesis dans *New comprehensive biochemistry* (Lars, E., Ed.) pp 385-420, Elsevier. I.S.B.N.: 0167-7306

Neupert, W. et Herrmann, J. M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, pp 723-49.

Nicholls, D. G. et Ferguson, S. J. (2002) dans *Bioenergetics*, ed., Elsevier. I.S.B.N.: 0080527930

Nicholls, D. G. et Ward, M. W. (2000) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.* 23, 4, pp 166-174.

Novo, D., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H. et Shapiro, H. M. (1999) Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxacarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry, Part A* 35, 1, pp 55-63.

Ocaño-Higuera, V. M., Maeda-Martínez, A. N., Marquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D. F., Castillo-Yáñez, F. J., Ruíz-Bustos, E., Graciano-Verdugo, A. Z. et Plascencia-Jatomea, M. (2011) Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chem.* 125, 1, pp 49-54.

Oehlenschläger, J. et Sörensen, N. (1997) Criteria of fish freshness and quality aspects. The Final Meeting of the Concerted Action-Evaluation of Fish Freshness-1997

Olafsdottir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I., Henehan, G., Nielsen, J. et Nilsen, H. (1997) Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 8, pp 258-265.

Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A. et Jørgensen, B. (2004) Multisensor for fish quality determination. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 2, pp 86-93.

Palade, G. E. (1952) The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* 114, 3, pp 427-451.

Parlapani, F. F., Mallouchos, A., Haroutounian, S. A. et Boziaris, I. S. (2014) Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 189, pp 153-63.

Parsons, M. J. et Green, D. R. (2010) Mitochondria in cell death. *Essays Biochem.* 47, pp 99-114.

Pasdois, P., Parker, J. E., Griffiths, E. J. et Halestrap, A. P. (2011) The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia. *Biochemical Journal* 436, 2, pp 493-505.

Pastorino, J. G., Chen, S.-T., Tafani, M., Snyder, J. W. et Farber, J. L. (1998) The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 273, 13, pp 7770-7775.

Pawar, S. et Magar, N. (1965) Biochemical changes in catfish, tilapia, and mrigal fish during rigor mortis. *J. Food Sci.* 30, 1, pp 121-125.

Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M. et Brandolin, G. (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426, 6962, p 39.

Pedersen, P. L. et Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. *Trends in Biochemical Sciences* 12, pp 186-189.

Pedersen, P. L., Williams, N. et Hullihen, J. (1987) Mitochondrial ATP synthase: dramatic magnesium-induced alterations in the structure and function of the F1-ATPase moiety. *Biochemistry* 26, 26, pp 8631-8637.

Penttilä, A. et Ahonen, A. (1976) Electron microscopical and enzyme histochemical changes in the rat myocardium during prolonged autolysis. *Beiträge zur Pathologie* 157, 2, pp 126-141.

Perez-Prieto, S., Rodriguez-Saint-Jean, S., Garcia-Rosado, E., Castro, D., Alvarez, M. et Borrego, J. (1999) Virus susceptibility of the fish cell line SAF-1 derived from gilt-head seabream. *Dis. Aquat. Org.* 35, 2, pp 149-153.

Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B. et Gelbard, H. A. (2011) Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50, 2, pp 98-115.

Persaud, K. et Dodd, G. (1982) Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature* 299, 5881, p 352.

Petit, P. X., Susin, S.-A., Zamzami, N., Mignotte, B. et Kroemer, G. (1996) Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS lett.* 396, 1, pp 7-13.

Picard, M., Wallace, D. C. et Burelle, Y. (2016) The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion* 30, pp 105-16.

Pietrobon, D., Zoratti, M. et Azzone, G. F. (1983) Molecular slipping in redox and ATPase H^+ pumps. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 723, 2, pp 317-321.

Poot, M., Gibson, L. L. et Singer, V. L. (1997) Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker™ Red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry* 27, 4, pp 358-364.

Pornrat, S., Sumate, T., Rommanee, S., Sumolaya, K. et Kerr, W. L. (2007) Changes in the ultrastructure and texture of prawn muscle (*Macrobrachuim rosenbergii*) during cold storage. *LWT-Food Sci. Technol.* 40, 10, pp 1747-1754.

Puleston, D. (2015) Detection of mitochondrial mass, damage, and reactive oxygen species by flow cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015, 9, p pdb prot086298.

Règlement CE 2406. (1996) Réglement CE n°2406/96 du conseil du 26 novembre 1996 fixant des normes communes de commercialisation pour certains produits de la pêche.

Règlement UE 1379. (2013) Règlement (UE) n°1379/2013 du 11 décembre 2013 portant organisation commune des marchés dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture, modifiant les règlements (CE) n°1184/2006 et (CE) n°1224/2009.

Rezaeinejad, S. et Ivanov, V. (2011) Heterogeneity of *Escherichia coli* population by respiratory activity and membrane potential of cells during growth and long-term starvation. *Microbiol. Res.* 166, 2, pp 129-135.

Richardson, T. et Tappel, A. (1962) Swelling of fish mitochondria. *J. Cell Biol.* 13, 1, pp 43-53.

Rigoulet, M., Leverve, X., Fontaine, E., Ouhabi, R. et Guérin, B. (1998) Quantitative analysis of some mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: dependence upon both fluxes and forces. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 1-2, pp 35-52.

Rizzuto, R., Duchen, M. R. et Pozzan, T. (2004) Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca^{2+} liaison. *Sci. STKE* 2004, 215, pp re1-re1.

Roy, B. C., Ando, M., Itoh, T. et Tsukamasa, Y. (2012) Structural and ultrastructural changes of full-cycle cultured Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) muscle slices during chilled storage. *J. Sci. Food Agric.* 92, 8, pp 1755-1764.

Ruiz-Rico, M., Fuentes, A., Masot, R., Alcañiz, M., Fernández-Segovia, I. et Barat, J. M. (2013) Use of the voltammetric tongue in fresh cod (*Gadus morhua*) quality assessment. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 18, pp 256-263.

Saito, T. (1959) A new method for estimating the freshness of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 24, pp 749-750.

Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C. et Cossarizza, A. (1997) JC-1, but not DiOC6 (3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess ΔΨ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS lett.* 411, 1, pp 77-82.

Sänger, A. (1992) Effects of training on axial muscle of two cyprinid species: *Chondrostoma nasus* (L.) and *Leuciscus cephalus* (L.). *J. Fish Biol.* 40, 4, pp 637-646.

Sanoudou, D., Kang, P. B., Haslett, J. N., Han, M., Kunkel, L. M. et Beggs, A. H. (2004) Transcriptional profile of postmortem skeletal muscle. *Physiol. Genomics* 16, 2, pp 222-228.

Santos, M. S. (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 2-3, pp 213-231.

Scacco, S., Vergari, R., Scarpulla, R. C., Technikova-Dobrova, Z., Sardanelli, A., Lambo, R., Lorusso, V. et Papa, S. (2000) cAMP-dependent phosphorylation of the nuclear encoded 18-kDa (IP) subunit of respiratory complex I and activation of the complex in serum-starved mouse fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.* 275, 23, pp 17578-82.

Scheffler, I. E. (2007) dans *Mitochondria. Second edition*, ed. I.S.B.N.: 978-0-470-04073-7

Scheffler, T. L., Matarneh, S. K., England, E. M. et Gerrard, D. E. (2015) Mitochondria influence postmortem metabolism and pH in an in vitro model. *Meat Sci.* 110, pp 118-25.

Schneider, A. (2011) Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation. *Annu. Rev. Biochem.* 80, pp 1033-53.

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C. et De Murcia, G. (2006) Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 7, p 517.

Sekyere, J. O. et Amoako, D. G. (2017) Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Frontiers in microbiology* 8, 228, pp 1-9.

Shanmughapriya, S., Rajan, S., Hoffman, N. E., Higgins, A. M., Tomar, D., Nemani, N., Hines, K. J., Smith, D. J., Eguchi, A. et Vallem, S. (2015) SPG7 is an essential and conserved component of the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular Cell* 60, 1, pp 47-62.

Sherr, B., Sherr, E. et del Giorgio, P. (2001) Enumeration of total and highly active bacteria. *Methods Microbiol.* 30, pp 129-159.

Shewan, J. M. (1977) The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action.

Sigernes, F., Esaiassen, M., Heia, K., Wold, J., Eilertsen, G. et Sørensen, N. (1998) Assessment of fish (cod) freshness by VIS/NIR spectroscopy. Methods to evaluate fish freshness in research and industry, Proceedings of the final meeting of the concerted action AIR CT94-2283, Nantes

Sjöstrand, F. S. (1956) The ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope. *Int. Rev. Cytol.* 5, pp 455-533.

Skulachev, V. P., Hinkle, P. C. et Mitchell, P. (1981) dans *Chemiosmotic proton circuits in biological membranes*, ed., Addison-Wesley. I.S.B.N.: 0201073986

Smith, M. A. et Schnellmann, R. G. (2012) Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 96, 1, pp 32-7.

Soares, S. S., Gutierrez-Merino, C. et Aureliano, M. (2007) Mitochondria as a target for decavanadate toxicity in *Sparus aurata* heart. *Aquat. Toxicol.* 83, 1, pp 1-9.

Solberg, C. et Fredriksen, G. (2001) Analysis of fat and dry matter in capelin by near infrared transmission spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* 9, 3, pp 221-228.

Sparagna, G. C., Gunter, K. K., Sheu, S.-S. et Gunter, T. E. (1995) Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J. Biol. Chem.* 270, 46, pp 27510-27515.

St-Pierre, J., Brand, M. D. et Boutilier, R. G. (2000) Mitochondria as ATP consumers: cellular treason in anoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 15, pp 8670-8674.

Sträuber, H. et Müller, S. (2010) Viability states of bacteria—specific mechanisms of selected probes. *Cytometry, Part A* 77, 7, pp 623-634.

Strobel, A., Graeve, M., Poertner, H. O. et Mark, F. C. (2013) Mitochondrial acclimation capacities to ocean warming and acidification are limited in the Antarctic nototheniid fish, *Notothenia rossii* and *Lepidonotothen squamifrons*. *PLoS One* 8, 7, p e68865.

Suárez, M. D., Abad, M., Ruiz-Cara, T., Estrada, J. D. et García-Gallego, M. (2005) Changes in muscle collagen content during *post mortem* storage of farmed sea bream (*Sparus aurata*): influence on textural properties. *Aquacult. Int.* 13, 4, pp 315-325.

Surette, M. E., Gill, T. A. et LeBlanc, P. J. (1988) Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *J. Agric. Food Chem.* 36, 1, pp 19-22.

Suzuki, M., Youle, R. J. et Tjandra, N. (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 4, pp 645-654.

Szabadkai, G. et Duchen, M. R. (2008) Mitochondria: the hub of cellular Ca^{2+} signaling. *Physiology* 23, 2, pp 84-94.

Szczesniak, A. S. (1963) Classification of Textural Characteristics a. *J. Food Sci.* 28, 4, pp 385-389.

Tait, S. W. et Green, D. R. (2013) Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, 9.

Tang, J., Faustman, C., Hoagland, T. A., Mancini, R. A., Seyfert, M. et Hunt, M. C. (2005) Postmortem oxygen consumption by mitochondria and its effects on myoglobin form and stability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4, pp 1223-1230.

Tarassov, I., Entelis, N. et Martin, R. P. (1995) An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *J. Mol. Biol.* 245, 4, pp 315-323.

Taylor, R., Fjaera, S. et Skjervold, P. (2002) Salmon fillet texture is determined by myofiber-myofiber and myofiber-myocommata attachment. *J. Food Sci.* 67, 6, pp 2067-2071.

Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M. et Goll, D. E. (1995) Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J. Anim. Sci.* 73, 5, pp 1351-1367.

Tejada, M. (2009) Chapter 4: ATP-derived products and K-value determination dans *Fishery products: quality, safety and authenticity* (Rehbein, H., & Oehlenschägler, J., Ed.) pp 68-88, Wiley & Sons. I.S.B.N.: 978-1-4051-4162-8

Terada, H. (1990) Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* 87, p 213.

Tomita, Y., Nihira, M., Ohno, Y. et Sato, S. (2004) Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. *Leg. Med.* 6, 1, pp 25-31.

Tzagoloff, A. (1982) Oxidative phosphorylation dans *Mitochondria* (Siekevitz, P., Ed.) pp 131-156, Springer, New York. I.S.B.N.: 978-1-4613-3294-7

Uchiyama, H. et Ehira, S. (1974) Relation between freshness and acid-soluble nucleotides in aseptic cod and yellowtail muscles during ice storage. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 78, p 23.

Uddin, M. et Okazaki, E. (2004) Classification of fresh and frozen-thawed fish by near-infrared spectroscopy. *J. Food Sci.* 69, 8, pp C665-C668.

Van den Thillart, G. et Modderkolk, J. (1978) The effect of acclimation temperature on the activation energies of state III respiration and on the unsaturation of membrane lipids of goldfish mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 510, 1, pp 38-51.

Vercesi, A. E., Moreno, S., Bernardes, C., Meinicke, A., Fernandes, E. et Docampo, R. (1993) Thapsigargin causes Ca^{2+} release and collapse of the membrane potential of *Trypanosoma brucei* mitochondria in situ and of isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 268, 12, pp 8564-8568.

Verrez-Bagnis, V. (1997) Post mortem denaturation of fish muscle proteins - changes in some myofibrillar, intermediate filament and costameric proteins. Methods to determine the freshness of fish in research and industry. Proceedings of the final meeting of the concerted action" Evaluation of fish freshness" AIRCT94 2283 (Nantes).

Verrez-Bagnis, V., Noel, J., Sautereau, C. et Fleurence, J. (1999) Desmin degradation in postmortem fish muscle. *J. Food Sci.* 64, 2, pp 240-242.

Vock, R., Hoppeler, H., Claassen, H., Wu, D., Billeter, R., Weber, J.-M., Taylor, C. R. et Weibel, E. R. (1996) Design of the oxygen and substrate pathways. VI. structural basis of intracellular substrate supply to mitochondria in muscle cells. *J. Exp. Biol.* 199, 8, pp 1689-1697.

Walker, J. E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1, pp 1-16.

Wallin, I. E. (1926) Bacteria and the origin of species. *Science* 64, 1651, pp 173-175.

Watanabe, E., Tamada, Y. et Hamada-Sato, N. (2005) Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on K_I value. *Biosens. Bioelectron.* 21, 3, pp 534-538.

Weidemann, M. J., Erdelt, H. et Klingenberg, M. (1970) Adenine nucleotide translocation of mitochondria: identification of carrier sites. *Eur. J. Biochem.* 16, 2, pp 313-335.

Westermann, B. (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 12, pp 872-84.

Wolf, S. G., Mutsafi, Y., Dadosh, T., Ilani, T., Lansky, Z., Horowitz, B., Rubin, S., Elbaum, M. et Fass, D. (2017) 3D visualization of mitochondrial solid-phase calcium stores in whole cells. *eLife* 6.

Xu, L., Zhang, C., Xu, P. et Wang, X. C. (2017) Mechanisms of ultraviolet disinfection and chlorination of *Escherichia coli*: Culturability, membrane permeability, metabolism, and genetic damage. *J. Environ. Sci.* 65, pp 356-366.

Yang, D. (1985) Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, pp 4443-4447.

Youle, R. J. et van der Bliek, A. M. (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 6098, pp 1062-5.

Yousif, L. F., Stewart, K. M. et Kelley, S. O. (2009) Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications. *Chembiochem* 10, 12, pp 1939-50.

Zhang, M., Wang, D., Huang, W., Liu, F., Zhu, Y., Xu, W. et Cao, J. (2013) Apoptosis during postmortem conditioning and its relationship to duck meat quality. *Food Chem.* 138, 1, pp 96-100.

Zhao, J.-Y., Jia, L.-M., Song, W.-Q., Zhang, W.-L., Fu, Y.-M., Zhang, Y., Cao, W.-W., Sun, Y., Zheng, J.-H. et Zhang, F.-M. (2014) Labeling efficiency and toxicity evaluation of CdSe/ZnS quantum dots on *Escherichia coli*. *J. Nanopart. Res.* 16, 6, p 2424.

Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J. et Zorov, D. B. (2018) Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* 552, pp 50-59.

Annexe 1 : Article “Use of ratiometric probes with a spectrofluorometer for bacterial viability measurement”

Use of ratiometric probes with a spectrofluorometer for bacterial viability measurement

Jérôme Cléach[1,2,3,4,5], Denis Watier[1], Bruno Le Fur[6], Thomas Brauge[7], Guillaume Duflos[7], Thierry Grard[1§*] and Philippe Lencel[1§]

[1]Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV – Institut Charles Viollette, USC ANSES – ULCO, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

[2]Univ. Lille, F-59000 Lille, France

[3]Univ. Artois, F-62000 Arras, France

[4]INRA, France

[5]ISA, F-59000 Lille, France

[6]PFINV, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

[7]ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne sur mer, France

[*]Corresponding author: Tel: +33 3 21 99 45 08; Fax: +33 3 21 99 45 17.

E-mail address: thierry.grard@univ-littoral.fr (T. Grard).

[§]T. Grard and P. Lencel share co-authorship of this article.

Email addresses:

Jérôme Cléach: jerome.cleach@univ-littoral.fr

Denis Watier: denis.watier@univ-littoral.fr

Bruno Le Fur: bruno.lefur@pfinouvellesvagues.com

Thomas Brauge: thomas.brauge@anses.fr

Guillaume Duflos: guillaume.duflos@anses.fr

Philippe Lencel: philippe.lencel@univ-littoral.fr

*Corresponding author: Thierry Grard

Tel: +33 3 21 99 45 20; fax: +33 3 21 99 45 08. Email address: thierry.grard@univ-littoral.fr

Running title: Fluorescence techniques / bacterial viability

Abstract

Assessment of micro-organism viability is useful in many industrial fields. A large number of methods associated with the use of fluorescent probes have been developed including fluorimetry, fluorescence microscopy, and cytometry. In this study, a microvolume spectrofluorometer was used to measure the membrane potential variations of *Escherichia coli*. In order to estimate the sensitivity of the device, the membrane potential of *E. coli* was artificially disrupted using an ionophore agent: carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP). Membrane potential was evaluated using two ratiometric methods: a Rhodamine 123/4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) combination and a JC-10 ratiometric probe. These methods were used to study the impact of freezing on *E. coli*, and were compared with the conventional enumeration method. The results showed that it is beneficial to use this compact, easy-to-use and inexpensive spectrofluorometer to assess the viability of bacterial cells via their membrane potential.

Keywords:

Bacterial viability, *Escherichia coli*, fluorescence techniques, membrane potential

1. Introduction

To determine the effect of physical or chemical antimicrobial agents, there is a need to develop rapid methods that are able to evaluate cell viability. Bacterial strain viability depends on a number of characteristics: membrane integrity, enzyme activity, membrane potential (ΔΨ) and nucleic acid integrity. There are many fluorescent probes that make it possible to quantify and measure these cellular characteristics [1]. A large number of methods for viability assessment are related to loss of membrane integrity and increases in membrane permeabilization [2]. These techniques use double labeling: probes able to cross bacterial membranes or probes able to cross only damaged membranes. The combination of the two staining techniques is used to evaluate the integrity and therefore the viability of bacterial cells. This study focused on another parameter: the membrane potential (MP) ΔΨ involved in cell energy production. MP is closely correlated with membrane integrity and the physiological state of bacteria [3]. Rhodamine 123 (Rh123), oxonol and carbocyanine dyes are the main fluorescent compounds used to evaluate MP. Their level of penetration into the cell is strongly correlated with membrane potential value. Many studies ([1], [4], [5], [6]) have used the fluorescence technique to assess bacterial viability and its correlation with MP. The emergence of new techniques, instruments and specific probes has enabled researchers to evaluate bacterial strain viability. In a number of studies, flow cytometry has been used to determine bacterial MP ([7], [8], [9]). However, this method presents multiple drawbacks: relative elevated cost of purchase and maintenance, and the need for specialized skills to operate the instrument.

The aim of this study was to carry out a comparison of two methods to determine the bacterial physiological state by MP evaluation in *Escherichia coli* (*E. coli*), used as a model for the microvolume spectrofluorometer. This fluorometer allows us to measure the fluorescence of molecules in solution, such as DNA and proteins, and small colloid particles such as bacteria

([10], [11]). The reliability of this instrument using double labeling and ratiometric probes was evaluated. For this study, two cationic fluorescent dyes were used for MP evaluation: Rh123 and JC-10. These two probes have been used widely in the context of mitochondrial membrane potential studies ([12]). Rh123 has been described as a relatively effective probe on isolated mitochondria and is a good marker of membrane potential in bacteria ([7], [8], [13]). Here, Rh123 staining was associated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining in order to establish a ratio between a vitality stain and a counter stain ([14]). This ratiometric approach is also used in the LIVE/DEAD BacLight™ bacterial viability kit ([15], [16], [17]). The second probe used, JC-10, is a more recent compound and is a ratiometric probe. JC-10 reacts like 3,3′-diethyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_2$) [4]. When the membrane potential is disrupted, the probe essentially takes a monomeric form and yields a green fluorescence. When the membrane potential is optimal, the probe aggregates and yields a red fluorescence. The ratio of the red to green fluorescence correlates with the level of MP. Only JC-1, an older version of JC-10 with weaker water solubility, has previously been tested for MP evaluation in *E.coli* cells ([18]). To validate the method developed in this study, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) was used as a conventional MP depolarizer ([19]) at various concentrations. The effect of freezing at -20°C and -80°C was also tested to validate the reliability of this method and correlate MP with viability.

2. Materials and methods

2.1 Strains and medium

The gram-negative strain of *E. coli* (UN 3373) used in this study was sourced from the collection of the Institut Pasteur in Paris, France. Cells were grown in LB (Luria-Bertani) medium at 37°C. *E. coli* in the stationary phase were inoculated in a fresh LB medium and grown for 4 hours in order to obtain bacteria in the exponential phase.

2.2 Chemical substances

Rhodamine 123 (Rh123), JC-10, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) were purchased from Sigma-Aldrich. Phosphate-buffered saline (PBS) was purchased from PAN-Biotech and dimethyl sulfoxide (DMSO) from ThermoFisher Scientific. Rh123 (2.6 µM and 1 mg/mL) and DAPI (10 mg/mL) stock solutions were prepared in ultra-pure water and CCCP was dissolved in DMSO.

2.3 DAPI staining

A NanoDrop™ 3300 microvolume spectrofluorometer (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) was used to estimate bacterial concentration in suspension. A protocol for DAPI staining of *E. coli* was designed. DAPI fluorescence intensity was correlated to the number of cells analyzed. Five concentrations of bacteria in the exponential phase (corresponding to different absorbance values at 600 nm: 0.15, 0.3, 0.4, 0.7, 1) were stained in 1 mL PBS at a final concentration of 5 µg/mL at 37°C for 10 minutes in the dark. Cells were centrifuged at 9000 *g* for 3 minutes and the supernatant containing free DAPI was removed. The pellet was suspended in PBS and DAPI fluorescence was analyzed with the microvolume spectrofluorometer.

2.4 Membrane potential evaluation

Rh123 and JC-10 were used to evaluate bacterial membrane potential following the method of Matsuyama (1984) [20], with modifications. *E. coli* in the stationary phase were inoculated in a fresh LB medium and grown for 4 hours in order to obtain bacteria in the exponential phase. During the exponential phase, the membrane potential value is high ([21], [22], [23]; [24]). Bacteria were harvested by centrifugation at 9000 *g* for 3 minutes then suspended in PBS (1 mL) (pH = 7.4). The absorbance at 600 nm was adjusted to 0.3 corresponding to approximately 10^8 cells/mL. 1 mL of the preparation was treated with the depolarizer CCCP

(0.5, 1, 20 µM) or DMSO (1 µL) (negative control) and incubated for 30 minutes at 37°C. DAPI (final concentration = 5 µg/mL) was added to the suspension 10 minutes before the end of the incubation only for Rh123 staining. After incubation, cells were centrifuged at 9000 *g* for 3 minutes and the supernatant was eliminated. The pellet was resuspended in PBS with Rh123 at a final concentration of 10 µg/l or with JC-10 (according to the mitochondrial membrane potential kit instructions: MAK160, Sigma, France) for 30 minutes at 37°C in the dark. After incubation and only for Rh123 staining, bacteria were centrifuged and the supernatant containing excess free Rh123 was eliminated. The pellet was resuspended in 1 mL of PBS and centrifuged at 9000 *g* for 3 minutes. The pellet was resuspended in 50 µL of PBS and Rhodamine fluorescence was analyzed with the microvolume spectrofluorometer and by microscopy.

To measure the impact of freezing on membrane potential, a centrifugation step was added (9000 g, 3 minutes) in the cases of frozen bacteria samples (stored at -20°C or -80°C with or without 15% DMSO during 24 hours) and the corresponding unfrozen control. This centrifugation step was realized just after thawing the samples in order to remove any trace of DMSO before JC-10 labeling due to DMSO toxicity for cells and to avoid possible effects of DMSO on the JC-10 probe dispersion.

2.5 Epifluorescence microscopy

Microscopic analysis was performed with a Zeiss HBO-50 microscope (Microvision Instruments, Evry, France). 5 µL of each sample was observed on glass slides under cover slips with an X40 oil immersion objective lens. For Rh123 staining observation, the microscope settings were: 90 ms of excitation, fineness 4, luminosity -15. For DAPI staining observation, the microscope settings were: 90 ms of excitation, fineness 4, luminosity -10.

2.6 Microvolume spectrofluorometer settings

The NanoDrop™ 3300 spectrofluorometer was initially designed for nucleic acid and protein quantitation. However, it is possible to create methods to configure new analyses for different fluorophores. Thus, a method for DAPI and Rh123 probes was created. The software proposes a fluorescence profiler in order to select the best excitation source for each fluorophore. The UV LED was chosen as the excitation source (excitation maximum = 365 nm) for the DAPI probe, and the white LED (excitation range = 460 - 650 nm) for Rh123, even though blue LED can also be effective. 2 µL of sample were used for each measurement and a blank was generated with PBS. For each sample, five measurements were acquired.

2.7 Viability determination

In order to correlate bacterial mortality with disruption of membrane potential, bacterial counts were performed using the spread plate technique with 1 mL of sample in the plate count agar (PCA) medium. 5 samples were tested: untreated, freezing at -20°C, freezing at -20°C with 15% DMSO, freezing at -80°C, and freezing at -80°C with 15% DMSO. Enumeration was carried out after 24 hours of incubation in 37°C. The freezing inactivation level was reported as log inactivation, according to Gao *et al.*, (2009) [25]:

Log inactivation = $(\log_{10}N - \log_{10}N_0)$

Where: N_0 = cell concentration before freezing treatment

N = cell concentration after freezing treatment

2.8 Statistical analysis

The statistical analysis and graphs were generated with SPSS 17 software. Each experiment was performed at least in triplicate. The data were expressed as the mean ± standard deviation. Unpaired two-sample *t*-tests were used to express the significance of difference ($p < 0.05$) between means, and Levene's test to determine the homogeneity of variance.

3. Results

3.1 E. coli permeabilization analysis by epifluorescence microscopy

E. coli labeling and its control by epifluorescence microscopy made it possible to validate the cell staining protocol. The DAPI and Rh123 concentrations yielded uniform cell staining (visible microscopy not shown). Without CCCP treatment, the Rh123 (Fig. 1A) and DAPI staining (Fig. 1B) were highly intense. Bacterial incubation in PBS enabled maintenance of significant MP. In the absence of nutrients in the medium, the CCCP led to the loss of MP and a significant drop in Rh123 fluorescence (Fig. 1C). After treatment with CCCP (5 µM), the MP was disrupted and the percentage of stained cells decreased strongly. However, bacterial membrane permeabilization by CCCP did not appear to affect DAPI staining (Fig. 1D).

3.2 Bacterial concentration assessment after DAPI staining

The DAPI probe strongly interacts with DNA and allows staining of cells like bacteria. The ability of the NanoDrop™ 3300 to measure particle fluorescence in the range of 1 µm (suitable for bacteria) was first studied to evaluate bacterial concentrations after DAPI staining. Different concentrations of bacteria, corresponding to different values of absorbance at 600 nm (0.15, 0.3, 0.4, 0.7 and 1) were stained with DAPI, and the corresponding fluorescence profiles were obtained with NanoDrop™ software (Fig. 2.A). Maximum wavelength emission was obtained at 450 nm, corresponding to DNA-DAPI complex spectral data. The DAPI fluorescence intensity was directly proportional to the bacterial concentration ($R^2 = 0.9894$) (Fig. 2B).

The protocol included different centrifugation steps of bacteria, followed by pellet resuspension. For these reasons, minimum absorbance of 0.1 was used even though the sensitivity of the method enabled us to work at much lower concentrations of bacteria. At very high concentrations ($Abs_{600}>1$), fluorescence levels were very high but remained linear.

Based on these observations, the best bacterial concentration range was chosen to be 0.1 to 1 Abs_{600}.

3.3 Membrane potential evaluation

The bacterial MP was evaluated by two fluorescent probes: Rh123 and JC-10 with bacterial suspension at Abs_{600} = 0.3. The ionophore agent CCCP at different concentrations: 0.5, 1 and 20 µM was used to validate the staining protocol. In order to set up the best conditions for MP evaluation, the staining was carried out at 37°C and pH 7.4 ([23]). Fluorescence signals obtained after Rh123 and DAPI staining are shown in Fig. 3. The Rh123 fluorescence decreased in a dose-dependent manner with CCCP concentrations (Fig. 3A). In the presence of the bacteria with or without CCCP treatment, a red shift to 527 nm was observed (Fig. 3A.a). This Rh123 spectral property was described for the first time by Emaus *et al.*, (1986) [12]. Free Rh123 in aqueous solution had an emission maximum at 524 nm (Fig. 3A.b). The dose effect was not found for DAPI staining (Fig. 3B). There was no interference between the two emission spectra of DAPI and Rh123. In order to correlate the MP-related fluorescence with a number of bacteria, a ratio between the Rh123 fluorescence and the DAPI fluorescence was used. The ratios (Rh123 fluorescence/DAPI fluorescence) decreased in a dose-dependent manner with CCCP concentrations (Fig. 3C). In the presence of CCCP, Rh123/DAPI ratio values decreased significantly from 0.5 µM to 20 µM (Fig. 3C).

JC-10 is a lipophilic cationic probe. On the emission spectrum (Fig. 3D), we observed a peak at 582 nm, which corresponded to the red fluorescence and therefore to the J aggregates form of JC-10 (polarized bacteria) (Fig. 3D a,b,c,d), and a peak at 531 nm, which corresponded to the green fluorescence and the monomer form of JC10 (depolarized bacteria) (Fig. 3D.a’,b’,c’,d’). On untreated bacteria (control: Fig. 3Da and a’), the high membrane potential was characterized by significant fluorescence in the red. CCCP treatment disrupted the MP, which was characterized by an increase in green fluorescence in a dose-dependent manner

(Fig. 3D b',c',d'). For JC-10 staining, the 582 (red)/531 (green) ratio was observed to evaluate bacterial MP. This ratio (red/green) decreased in a dose-dependent manner with CCCP concentration (Fig. 3E). The measurement of the CCCP action by the ratiometric calculation Rh123/DAPI (Fig. 3C), and the use of the ratiometric probe JC-10 (Fig. 3D), gave identical results.

3.4 E. coli membrane potential and viability assessments

The effect of freezing (at -20°C and -80°C) and the protective role of DMSO were examined on bacterial MP and bacterial survival (Fig. 4). Viability was followed using the serial dilutions agar plating method and the MP was estimated by the use of both methods (Rh123/DAPI and JC-10). The number of *E. coli* in samples stored at -20°C was significantly lower (about 4.5 log units) than the fresh sample (Fig. 4A and B). The effect of freezing on *E. coli* cell death was less marked at -80°C (4 log units abatement). Under both these conditions (-20°C and -80°C), a cryoprotective effect was observed in the presence of DMSO (Fig. 4A and B). For the Rh123/DAPI ratios, after freezing of 24 hours at -20°C or -80°C, very weak Rh123 uptake was observed in bacteria compared to the control (Fig. 4C). However, when cells were frozen with DMSO, Rh123/DAPI ratios were higher than those in cells without DMSO pretreatment (Fig. 4C). Measuring the Rh123/DAPI ratio makes it possible to differentiate the loss of viability in the different conditions of conservation. Concerning JC-10 staining, the results showed that the red/green ratios strongly decreased after freezing at -20°C and -80°C and the cryoprotective DMSO effect was once again significant (Fig. 4D). These results obtained with JC-10 probe were in correlation with those obtained with Rh123/DAPI ratios. Moreover, the results obtained with the JC-10 and Rh123/DAPI ratio using the fluorometer showed identical trends to those for the bacterial count. For both probes, MP values were correlated with the loss of bacterial viability. Viability and fluorescence losses

were particularly high for freezing at -20°C and -80°C. The log inactivation level was clearly higher when cells were not frozen with DMSO.

4. Discussion

In this research, two methods of measuring cell viability based on the evaluation of MP by fluorescence were studied. This study also showed the reliability of the NanoDrop™ 3300 in evaluating the number and MP of bacteria. The NanoDrop™ 3300 can be configured for three excitation sources: UV LED (max = 365 nm +/- 10nm), blue LED (max = 470 nm +/- 10 nm), and white LED (range = 460 nm - 650 nm). A wide range of fluorophores can be used to quantify bacteria and measure their viability. The thinness of the bandwidth of the UV LED and the blue LED ensures excitation specificity (useful for the double stains).

DAPI is widely used to stain DNA for quantification and fluorescent microscopy observation [26], [27]. Firstly, the limit of detection of the microvolume spectrofluorometer was determined by bacterial enumeration with DAPI. Different concentrations of *E. coli* corresponding to different values of absorbance at 600 nm (between 0.1 and 1) were stained and quantified with DAPI. The results showed a correlation between the amount of bacteria and the fluorescence intensity. The level of fluorescence increased proportionally with the increased concentration of bacteria. Our protocol required centrifugation and washing. For this reason, a minimum of 10^7 bacteria/mL (approximately Abs_{600} = 0.05) was necessary to collect an apparent pellet. Conversely, high levels of bacteria (Abs_{600} > 1) are not recommended due to the sample pedestal contamination and a loss of linearity. DAPI is also widely used for total bacterial enumeration stains in environmental samples, according to Williams *et al.*, (1998) [14]. Other probes such as Hoechst 33342 and Vibrant DyeCycle Violet can also be used [21], [28]. They interact specifically with DNA and have an excitation

wavelength in the UV. The use of a UV excitable probe for counting will make it possible to use other probes to measure cell viability with double labeling.

In a second experiment, the ability of the NanoDrop™ to evaluate bacterial MP using double labeling was established. One of the originalities of the pair of probes (Rh123 and DAPI) is to combine them because they have very different excitation and emission properties: Rh123: ex/em: 507/524 nm (in water); DAPI: ex/em: 358/450 (when coupled with DNA). Any interaction between their excitation and emission wavelength is impossible. The wavelength emission of DAPI was 488 nm versus 450 nm for the DNA-DAPI complex. In the same way, a light red shift when bacteria were labelled with Rh123 (524 nm to 527 nm) was observed. This phenomenon was described by Emaus *et al*. in 1986 [12] when isolated energized mitochondria were labelled with Rh123.

The notion of ratio has already been widely commented in the literature and more particularly the PI/Syto 9 and PI/SYBR green ratios [29], [30], [31]. They have been used extensively in multiple studies and their efficiency has been confirmed by various techniques: flow cytometry, microscopy and fluorimeter [32], [22], [7]. Therefore, we chose to use a ratiometric approach by coupling a membrane potential probe (Rh123) with a counter stain (DAPI). Results showed that the Rh123/DAPI pair makes it possible to highlight the loss of MP under the action of the CCCP in a dose-dependent manner [33], [34]. Loss of MP may be associated with membrane permeabilization and loss of viability. Bacteria in the exponential phase of growth were used to overcome the variations in MP associated with the growth stage [23]. Fluorescence microscopy showed relative homogeneity of the bacterial MP (homogeneity of fluorescence) under standard conditions (energizing), and the action of CCCP on bacteria also was homogeneous.

Similar results were obtained with the JC-10 ratiometric probe. The action of CCCP on bacteria resulted in a decrease in MP in a dose-dependent manner, with a decrease in red

fluorescence (at 585 nm), and an increase in green fluorescence (530 nm). The technical characteristics of the NanoDrop™ 3300 make it possible to clearly visualize the transition from red to green fluorescence. Like other ratiometric probes, such as $DiOC_2$ [35], [36], the JC-10 probe seems well adapted to the measurement of bacterial MP and to the loss of viability. This microvolume spectrofluorometer can therefore be used for the fluorescence measurement of colloids such as bacteria. The improved solubility of the JC-10 probe has made it possible to increase performance compared to first-generation probes such as JC-1 [37].

Finally, these two methods were applied by measuring the effect of freezing at -20°C and -80°C on the viability of bacteria [25]. Freezing led to a fall in bacterial MP, which has been correlated with loss of cell viability. These two ratiometric methods indicated the proportion of viable bacteria in a sample. The results obtained with the two methods have been correlated with the viability measurement by box count [35].

Our study showed a proportion of viable bacteria among a population of permeabilized bacteria. Various authors have observed viable bacteria among a positive propidium iodide-stained bacteria population [15], [16], [31], [38]. However, measuring bacterial permeabilization remains a simple approach to determine cell viability to measure the effectiveness of a treatment control [39], [40].

The Rh123/DAPI probe pair was particularly effective in measuring the loss of MP associated with physical or chemical treatments. The interest of this ratio was to compare the fluorescence (associated with a metabolic activity) to a bacterial concentration. This study showed that the JC-10 probe can be added to the list of fluorescent probes able to measure cell viability.

Continual progress in the development of probes and fluorescence techniques has provided improved approaches to the study of bacterial physiology. Due to the technical characteristics

of the microvolume spectrofluorometer (three excitation sources), it is possible the use of a large number of probes for the measurement of cell viability. Many similar approaches could be considered for use on other biological colloids, such as mitochondria in suspension.

Acknowledgements

Jérôme Cléach is grateful to the *Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale* council and *PFI Nouvelles Vagues* for their financial support of his PhD studies. The authors wish to thank Isabelle Cos from *PFI Nouvelles Vagues* and Irina Sadovskaya for her technical assistance.

Fundings

This study was funded by the French government and the Hauts-de-France region in the framework of the CPER 2014-2020 MARCO project. This research was also funded by FranceAgrimer in the framework of the Altfish project.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

1. Joux F, Lebaron P. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.* **2:** 1523-1535.
2. Xu L, Zhang C, Xu P, Wang XC. 2017. Mechanisms of ultraviolet disinfection and chlorination of *Escherichia coli*: Culturability, membrane permeability, metabolism, and genetic damage. *J. Environ. Sci.*
3. Strahl H, Hamoen LW. 2010. Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107:** 12281-12286.
4. McFeters GA, Feipeng PY, Pyle BH, Stewart PS. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J. Microbiol. Methods.* **21:** 1-13.
5. Breeuwer P, Abee T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **55:** 193-200.
6. Sträuber H, Müller S. 2010. Viability states of bacteria—specific mechanisms of selected probes. *Cytometry, Part A.* **77:** 623-634.

7. Kaprelyants A, Kell D. 1992. Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* **72:** 410-422.
8. Diaper J, Tither K, Edwards C. 1992. Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38:** 268-272.
9. Novo DJ, Perlmutter NG, Hunt RH, Shapiro HM. 2000. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44:** 827-834.
10. Zhao J-Y, Jia L-M, Song W-Q, Zhang W-L, Fu Y-M, Zhang Y*, et al.* 2014. Labeling efficiency and toxicity evaluation of CdSe/ZnS quantum dots on *Escherichia coli*. *J. Nanopart. Res.* **16:** 2424.
11. Chung J, Kang JS, Jurng JS, Jung JH, Kim BC. 2015. Fast and continuous microorganism detection using aptamer-conjugated fluorescent nanoparticles on an optofluidic platform. *Biosens. Bioelectron.* **67:** 303-308.
12. Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. 1986. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **850:** 436-448.
13. Porter J, Pickup R, Edwards C. 1995. Membrane hyperpolarisation by valinomycin and its limitations for bacterial viability assessment using rhodamine 123 and flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **132:** 259-262.
14. Williams S, Hong Y, Danavall D, Howard-Jones M, Gibson D, Frischer M*, et al.* 1998. Distinguishing between living and nonliving bacteria: evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *J. Microbiol. Methods.* **32:** 225-236.
15. Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. 1999. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods.* **37:** 77-86.
16. Nescerecka A, Hammes F, Juhna T. 2016. A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. *J. Microbiol. Methods.* **131:** 172-180.
17. Bunthof CJ, van Schalkwijk S, Meijer W, Abee T, Hugenholtz J. 2001. Fluorescent method for monitoring cheese Starter permeabilization and lysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67:** 4264-4271.
18. Kumar A, Pandey AK, Singh SS, Shanker R, Dhawan A. 2011. Engineered ZnO and TiO 2 nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. *Free Radical Biol. Med.* **51:** 1872-1881.
19. Kralj JM, Hochbaum DR, Douglass AD, Cohen AE. 2011. Electrical spiking in *Escherichia coli* probed with a fluorescent voltage-indicating protein. *Science.* **333:** 345-348.
20. Matsuyama T. 1984. Staining of living bacteria with rhodamine 123. *FEMS Microbiol. Lett.* **21:** 153-157.
21. Monfort P, Baleux B. 1996. Cell cycle characteristics and changes in membrane potential during growth of *Escherichia coli* as determined by a cyanine fluorescent dye and flow cytometry. *J. Microbiol. Methods.* **25:** 79-86.

22. Comas J, Vives-Rego J. 1997. Assessment of the effects of gramicidin, formaldehyde, and surfactants on *Escherichia coli* by flow cytometry using nucleic acid and membrane potential dyes. *Cytometry.* **29:** 58-64.
23. Jiao N, Yang Y, Luo T. 2004. Membrane potential based characterization by flow cytometry of physiological states in an aerobic anoxygenic phototrophic bacterium. *Aquat. Microb. Ecol.* **37:** 149-158.
24. Rezaeinejad S, Ivanov V. 2011. Heterogeneity of *Escherichia coli* population by respiratory activity and membrane potential of cells during growth and long-term starvation. *Microbiol. Res.* **166:** 129-135.
25. Gao W, Leung K, Hawdon N. 2009. Freezing inactivation of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in water: response of different strains. *Water Environ. Res.* **81:** 824-830.
26. Sherr B, Sherr E, del Giorgio P. 2001. Enumeration of total and highly active bacteria. *Methods Microbiol.* **30:** 129-159.
27. Muthukrishnan T, Govender A, Dobretsov S, Abed RM. 2017. Evaluating the reliability of counting bacteria using epifluorescence microscopy. *Journal of Marine Science and Engineering.* **5:** 4.
28. Silva F, Lourenço O, Queiroz JA, Domingues FC. 2011. Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in Escherichia coli assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. *The Journal of antibiotics.* **64:** 321-325.
29. Xu C, Li J, Yang L, Shi F, Yang L, Ye M. 2017. Antibacterial activity and a membrane damage mechanism of *Lachnum* YM30 melanin against *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control.* **73:** 1445-1451.
30. Ma J, Kang M, Zhang Y, Guo X, Tian Z, Ding C*, et al.* 2017. Self-defense of *Escherichia coli* against damages caused by nanoalumina. *Environ.Toxicol. Pharmacol.* **55:** 110-117.
31. Biggerstaff J, Le Puil M, Weidow B, Prater J, Glass K, Radosevich M*, et al.* 2006. New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol. Cell. Probes.* **20:** 141-146.
32. Breeuwer P, Abee T. 2004. Assessment of the membrane potential, intracellular pH and respiration of bacteria employing fluorescence techniques. *Mol. Microb. Ecol. Man.* **8:** 1563-1580.
33. Sekyere JO, Amoako DG. 2017. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Frontiers in microbiology.* **8**.
34. Chimerel C, Field CM, Piñero-Fernandez S, Keyser UF, Summers DK. 2012. Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1818:** 1590-1594.
35. Kennedy D, Cronin UP, Wilkinson MG. 2011. Responses of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* to simulated food processing treatments, determined using fluorescence-activated cell sorting and plate counting. *Appl. Environ. Microbiol.* **77:** 4657-4668.
36. Guo N, Zang Y-P, Cui Q, Gai Q-Y, Jiao J, Wang W*, et al.* 2017. The preservative potential of *Amomum tsaoko* essential oil against *E. coli*, its antibacterial property and mode of action. *Food Control.* **75:** 236-245.
37. Novo D, Perlmutter NG, Hunt RH, Shapiro HM. 1999. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxacarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry, Part A.* **35:** 55-63.

38. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **73:** 3283-3290.
39. Miyanaga K, Takano S, Morono Y, Hori K, Unno H, Tanji Y. 2007. Optimization of distinction between viable and dead cells by fluorescent staining method and its application to bacterial consortia. *Biochem. Eng. J.* **37:** 56-61.
40. Lopez-Amoros R, Comas J, Vives-Rego J. 1995. Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:** 2521-2526.

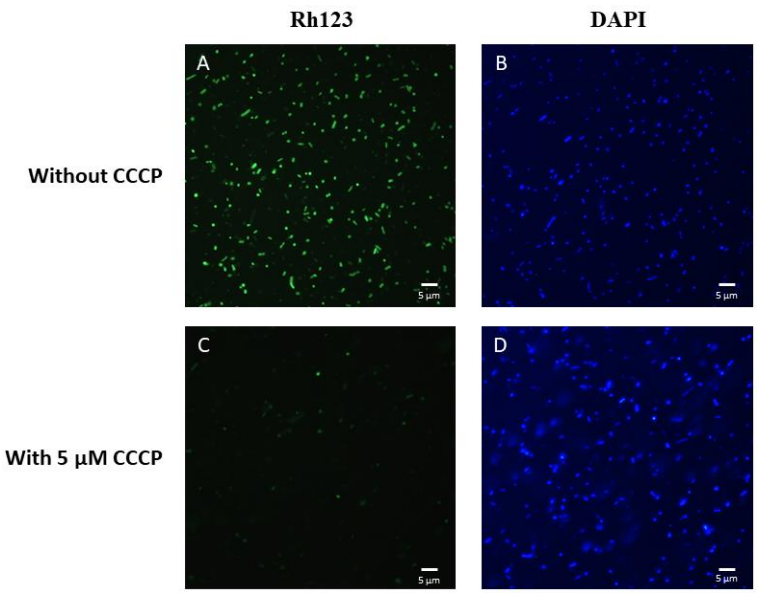


Figure 1: Epifluorescence microscopy of *Escherichia Coli* stained with Rhodamine 123 (Rh123) and DAPI without carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) (A and B) or with 5 µM CCCP treatment (C and D)

5 µL of each sample were observed on glass slides under cover slips with an X40 oil immersion objective lens. For Rh123 staining observation, the microscope settings were: 90 ms of excitation, fineness 4, luminosity -15. For DAPI staining observation, the microscope settings were: 90 ms of excitation, fineness 4, luminosity -10.

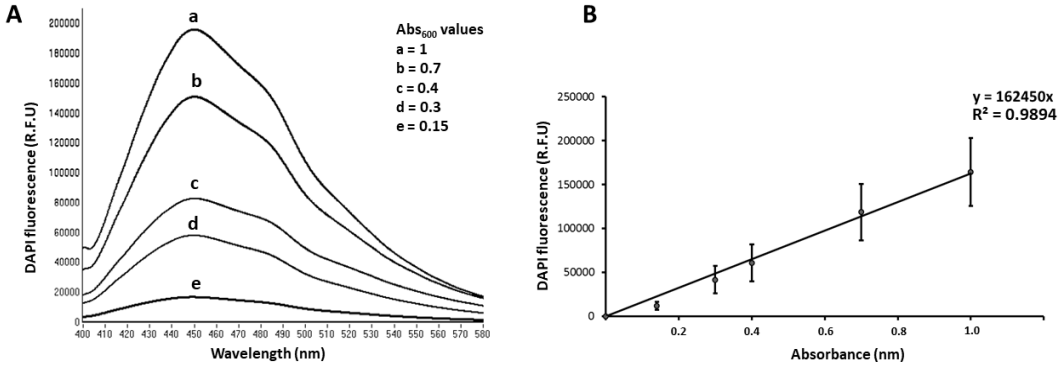


Figure 2: Effects of *Escherichia coli* concentration on fluorescence measurements obtained with NanoDrop™ software

A. DAPI fluorescence spectra for different concentrations of *E. coli*. Abs_{600} values are respectively: a = 1; b = 0.7; c = 0.4; d = 0.3; e = 0.15.

B. Regression line with error bars for DAPI fluorescence measurements versus concentration of *E. coli*.

Data represent three independent experiments (n = 3).

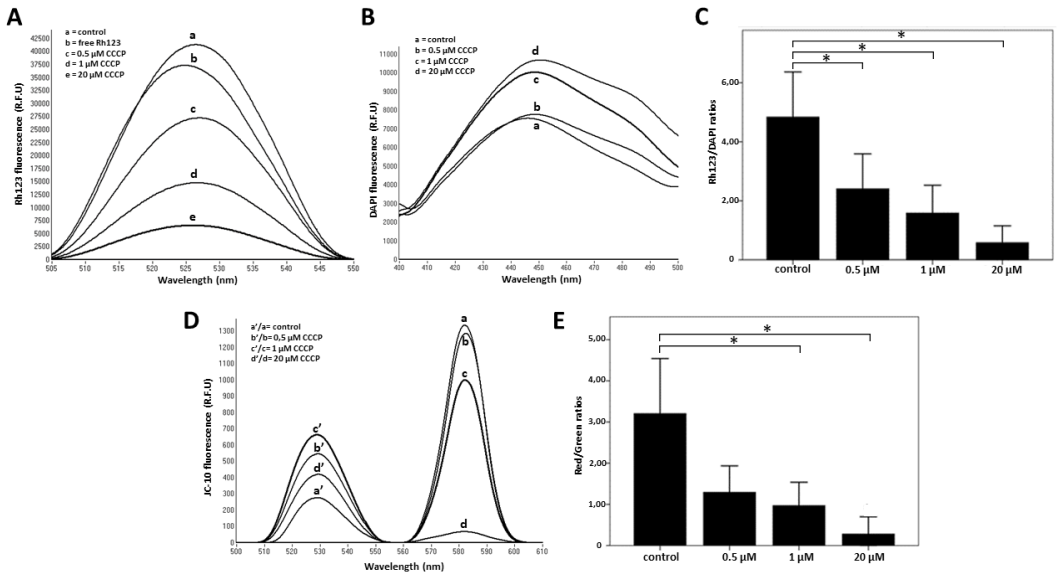


Figure 3: CCCP effect on *Escherichia coli* membrane potential

A. Fluorescence measured with Rh123 and different concentrations of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP): a = control; b = free Rh123; c = 0.5 µM CCCP; d = 1 µM CCCP; e = 20 µM CCCP

B. Fluorescence measured with DAPI and different concentrations of CCCP: a = control; b = 0.5 µM CCCP; c = 1 µM CCCP; d = 20 µM CCCP

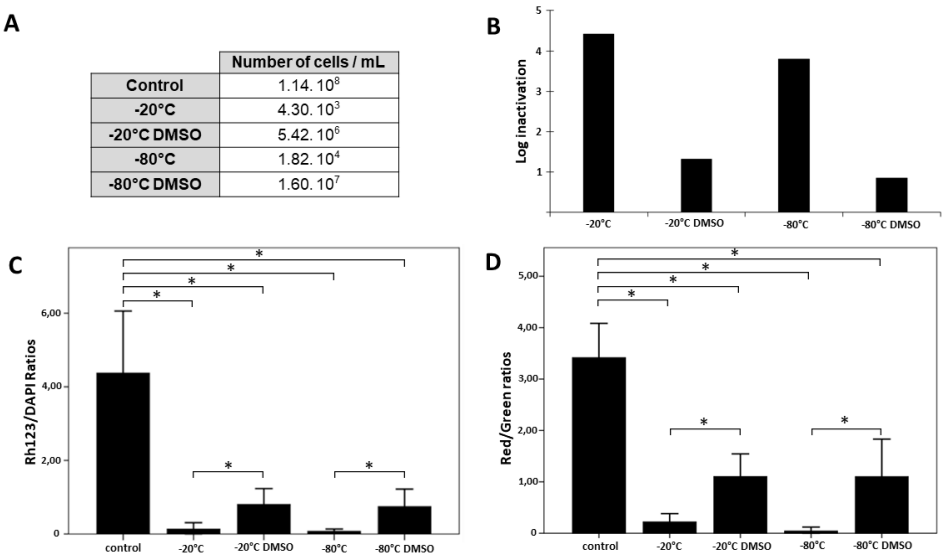
C. Rh123/DAPI ratios with different concentrations of CCCP (from 0.5 to 20 µM)

D. Fluorescence measured with JC-10 and different concentrations of CCCP: a'/a = control; b'/b = 0.5 µM CCCP; c'/c = 1 µM CCCP; d'/d = 20 µM CCCP

E. Red/green ratios (JC-10) with different concentrations of CCCP (from 0.5 to 20 µM)

Significance for between-comparisons: * $p < 0.05$.

Fluorescence measurements and standard deviations represent three independent experiments (n = 3).



	Number of cells / mL
Control	$1.14.10^8$
-20°C	$4.30.10^3$
-20°C DMSO	$5.42.10^6$
-80°C	$1.82.10^4$
-80°C DMSO	$1.60.10^7$

Figure 4: Impact of freezing on *Escherichia coli* viability and membrane potential

A. Viability assessment of *E. coli* after 24h culture plate and various cell pretreatments (-20°C or -80°C with or without dimethyl sulfoxide (DMSO)).

B. Log inactivation after freezing at -20°C or -80°C with or without DMSO.

C. Rh123/DAPI ratios with different freezing conditions (-20°C or -80°C with or without DMSO) (n = 5).

D. Red/green ratios (JC-10) with different freezing conditions (-20°C or -80°C with or without DMSO) (n = 5).

Significance for between-comparisons: * $p < 0.05$.

Annexe 2 : Article “Mitochondrial activity as indicator of fish freshness”

Mitochondrial activity as indicator of fish freshness

Short title: **Mitochondrial activity as indicator of fish freshness**

Jérôme Cléach[a,b,c,d,e], Philippe Pasdois[f], Philippe Marchetti[g], Denis Watier[a], Guillaume Duflos[h], Emmanuelle Goffier[i], Anne-Sophie Lacoste[j], Christian Slomianny[k], Thierry Grard[a§*] and Philippe Lencel[a§]

[a]*Univ. Littoral Côte d'Opale, USC ANSES, EA 7394 – ICV – Institut Charles Viollette, F-62200 Boulogne sur Mer, France*

[b]*Univ. Lille, F-59000 Lille, France*

[c]*Univ. Artois, F-62000 Arras, France*

[d]*INRA*

[e]*ISA, F-59000 Lille, France*

[f]*Univ. Bordeaux, INSERM U1045, IHU-LIRYC, 33600 Pessac, France*

[g]*Univ. Lille, INSERM UMR S1172, Jean Pierre Aubert Research Centre, 59045 Lille, France*

[h]*ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne sur mer, France*

[i]*PFINV, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France*

[j]*Univ. Lille, Bio Imaging Center Lille, Lille, F 59000, France*

[k]*Univ. Lille, INSERM U.1003, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Villeneuve d'Ascq, France*

[§]T. Grard and P. Lencel share co-authorship of this article.

[*]Corresponding author: Tel: +33 3 21 99 25 08

E-mail address: thierry.grard@univ-littoral.fr (T. Grard).

En cours de soumission

Abstract

Actual traditional methods to assess freshness in routine in fishing industry give significant results which reflect more a state of spoilage rather than a state of freshness. Mitochondria, the seat of cellular respiration, undergo profound changes in post-mortem tissues. The evolution of mitochondrial activity was studied on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fillets stored at +4°C for 6 days. The structure of muscle tissue was examined over time by transmission electron microscopy demonstrating swollen appearance, changes in mitochondrial cristae structure, and presence of dense granules. Mitochondrial respiration isolated from sea bream fillets was assessed by oxygraphy and membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was followed by fluorescence (Rhodamine 123). Several mitochondrial structural damages in sea bream muscle appeared from day 3. $\Delta\Psi_m$ and mitochondrial activity were strongly disrupted in sea bream fillets after 96 hours (day 4) of storage at +4°C. Mitochondrial activity constituted a reliable and early indicator of fish freshness. This study could be a starting point for the development of assays kit to determine fish freshness alteration at early stages.

Keywords:

Fish freshness, Rhodamine 123 (Rh123), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), mitochondrial respiration, oxygraphy, gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

Highlights:

- Several ultrastructural damages are visible in fish fillets (*Sparus aurata*) from 72 hours (Day 3) *post mortem* after storage at +4°C.
- Mitochondrial structure and function are strongly altered in fish fillets, (*Sparus aurata*) from 96 hours (Day 4) *post mortem* after storage at +4°C.
- Mitochondrial integrity is preserved 72 hours *post mortem*.
- Mitochondrial structure and function assessment could be reliable indicators of fish freshness and the starting point for the development of a fish freshness assays kit.

<u>Chemical compounds used in this article</u>:

- Rhodamine 123 (PubChem CID 9929799)
- Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (PubChem CID 2603)
- Tris (hydroxymethyl)aminomethane (PubChem CID 6503)
- Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid (PubChem CID 6207)

En cours de soumission

- 4-Morpholinepropanesulfonic acid (PubChem CID 70807)
- Malate (PubChem CID 525)
- Succinate (PubChem CID 160419)
- Glutamate (PubChem CID 33032)
- Adenosine 5′-diphosphate (PubChem CID 128882)
- Carboxyatractyloside (PubChem CID 20055804)
- cytochrome c (PubChem CID 16057918)
- Potassium chloride (PubChem CID 4873)
- Sucrose (PubChem CID 5988)
- Magnesium chloride (PubChem CID 5360315)
- Potassium dihydrogen phosphate (PubChem CID 516951)
- Dimethyl sulfoxide (PubChem CID 679)

1. Introduction

Quality of aquatic products is defined by objective criteria such as food safety, nutritional quality, origin and traceability of the products Olafsdottir *et al.*, (1997); Olafsdottir *et al.*, (2004). It also depends on less objective criteria such as the organoleptic properties and the freshness of the products. The freshness that could be assimilated to the only interval between capture and consumption of the product is actually related to the time and the conditions of storage and processing of the product. Fish freshness is "dependent on different biological and processing factors" according to Olafsdottir *et al.*, (1997). To meet these expectations the industry is trying to improve the information on the date of capture of the product. However, treatments and storage conditions can greatly, affecting strongly quality and fish freshness. Seafood products are very perishable and the processing factors determine the quality of the product Cheng *et al.*, (2014); Mendes, (2018).

Consumers are becoming more attentive and demanding about the quality of food like seafood. By definition, a fish can be considered fresh when its organoleptic, physics and chemicals characteristics are very close to a living fish Oehlenschläger et Sörensen, (1997)). Savvy consumers or experts are able to discriminate fresh products by a sensory approach. Sensory evaluation grids have been developed to train a less experienced audience. These grids make it possible to evaluate evolutions and degradations on many species. However, these approaches remain highly dependent on the consumer's level of perception and knowledge of the product.

En cours de soumission

The research and the development of methods to evaluate fish freshness are necessary and still a current challenge. Over the last twenty years, many studies have been done to better understand the physical, chemical, biochemical and microbiological evolutions of post-mortem aquatic products Alasalvar *et al.*, (2001); Delbarre-Ladrat *et al.*, (2006); Ayala *et al.*, (2010); Ocaño-Higuera *et al.*, (2011). Methods and instruments have been developed to measure these different evolutions Hassoun et Karoui, (2017) such as sensory (Quality Index Method (QIM), Torry freshness score), chemical (volatile compounds determination, K value or pH) or microbiological methods and most recently spectroscopic methods and electronic sensors Watanabe *et al.*, (2005); Aubourg *et al.*, (2007); Hassoun et Karoui, (2015). Microbiological, organoleptic and chemical methods are used in routine in fishing industry to evaluate the fish freshness. Indeed, total volatile base nitrogen (TVB-N) level significantly increases during the late stage of storage (10-20 days of storage) and consequently constitutes a limited freshness indicator Castro *et al.*, (2006); Parlapani *et al.*, (2014); but rather an advanced spoilage indicator. Moreover TVB-N/TBA analyses are not applicable for all fish species. Thereby, the research and the development of new fish freshness indicators is still a challenge in research and in industry.

Many studies showed the post-mortem structural evolution of myofibrillar proteins Delbarre-Ladrat *et al.*, (2006). This evolution of the muscular tissue has often been correlated with the mechanical properties of the tissues (texture, elasticity, suppleness, hardness, cohesion, etc.) Pornrat *et al.*, (2007); Taylor *et al.*, (2002). The level of myofibrillar proteins degradation can be correlated with fish alteration. In some of these studies, the structural evolution of myofibrillar proteins has often underlined the structural evolution of post-mortem mitochondria Ayala *et al.*, (2010); Ayala *et al.*, (2011); Parsons et Green, (2010); Tomita *et al.*, (2004). Studies using electron microscopy have reported *post mortem* morphological mitochondrial changes such as swelling, disrupted cristae in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Ayala *et al.*, (2010) and Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) Roy *et al.*, (2012) muscles in cold storages. We focused on mitochondria to study their structural and functional evolutions in sea bream fillets stored at +4°C.

Mitochondria plays a central role in cell death mechanisms such as apoptosis and necrosis Parsons et Green, (2010). Several studies showed mitochondrial activity was still present *post mortem* in storage conditions of +4°C in bovine, murine and human models Barksdale *et al.*, (2010); Cheah et Cheah, (1971); Cheah et Cheah, (1974); Lanari et Cassens, (1991); Tang *et al.*, (2005).

En cours de soumission

Fish mitochondria activities have been studied in the context of eco-physiological Blier et Guderley, (1993); Hilton *et al.*, (2010); Lionetti *et al.*, (2014) and eco-toxicological Cambier *et al.*, (2009); Garceau *et al.*, (2010); Van den Thillart et Modderkolk, (1978); Soares *et al.*, (2007) studies. However, to our knowledge, currently, there are no studies on the impact of storage at +4°C on the *post mortem* evolution of fish mitochondrial structure and function.

To determine the *post mortem* evolution of mitochondrial structure and function, two approaches were used: firstly, the post-mortem morphological evolution of mitochondria was analyzed by transmission electron microscopy. Secondly, a functional analysis was performed to assess oxygen consumption and membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of mitochondria isolated from gilthead sea bream fillets stored at +4°C.

Thus, the purpose of this study was to evaluate if mitochondrial structure and function could be considered like reliable and early markers of fish freshness.

2. Materials and methods

2.1 Reagents and material

Rhodamine 123 (Rh123), Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), Tris (hydroxymethyl)aminomethane (Trizma® base), Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid (EGTA), proteinase type XXIV, BSA, 4-Morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), malate, succinate, Adenosine 5′-diphosphate (ADP), Carboxyatractyloside (CAT) and cytochrome c from equine heart were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Potassium chloride (KCl) and glutamate were bought from Fisher Labosi (France). Sucrose, magnesium chloride ($MgCl_2$), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) were purchased from Acros Organics (New Jersey, USA). Rh123 and CCCP were prepared in Dimethyl sulfoxide (DMSO) purchased from Thermo Scientific (San Diego, USA).

2.2 Fish muscle

The gilthead sea bream (300-400 g) were supplied from Aquanord sea farm (Gravelines, France). This farmed fish model was chosen in order to obtain a perfect knowledge of storage, slaughter and life conditions, which influence the study of freshness. Breeding conditions were: temperature 18 ± 6°C, pH 8.2, total ammonia < 30 pmol.L^{-1}, dissolved oxygen 99 % (v/v) to saturation (7 ppm). The fishes were killed by asphyxiation/hypothermia and kept on ice (0 to 2°C) in expanded polystyrene boxes during 4 hours for transport. Upon arrival at the laboratory, the fishes were immediately skinned and filleted. The fillets were stored on ice in a cold room (+4°C) for 5 days and used for experiments every 24 hours during 5 days: Day 0,

En cours de soumission

Day 1, Day 2, Day 3 and Day 4. The ice was renewed every day. A plastic wrap was used for avoiding the contact between the fillets and the ice or the accumulated water.

2.2. Transmission electron microscopy

3 mm^3 pieces of muscle were cut from fillets and fixed in 2.5 % glutaraldehyde buffered with 0.1M sodium cacodylate, postfixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer and "en bloc" stained with 2% uranyl acetate. After acetonitrile dehydration, samples were embedded in epon-like resin (Embed-812). Ultrathin sections (90 nm) were cut using a Leica UC7 ultra-microtome and collected on 150 mesh hexagonal barred copper grids. After staining with 2% uranyl acetate prepared in 50% ethanol and incubation with a lead citrate solution, sections were observed on a Hitachi H-600 transmission electron microscope equipped with a W electron source (operated at 75kV) and a side mounted Hamamatsu C4742-95 digital camera.

2.3. Mitochondria isolation

The Method for this isolation was adapted from Pasdois *et al.*, (2011). All the steps of the isolation of mitochondria were performed in cold room at +4°C. Red muscle was dissected from the fillet (10 g) and finely diced with scissors. The fine pieces obtained (2-3 mm^3) were incubated at +4°C for 7 minutes under stirring in 20 mL of isolation buffer (180 mM KCl, 80 mM sucrose, 5mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, 2mM EGTA, pH 7.2 at +4°C) supplemented with 0.1 mg/mL of bacterial proteinase type XXIV. The resulting tissue suspension was poured into a 30 mL glass Potter homogenizer and homogenized for 3 min using a motorized Teflon pestle at 300 rpm. The homogenate was centrifuged at 7500 *g* for 10 minutes. The resulting pellet was firstly washed and then resuspended in 20 mL isolation buffer containing 2 mg/mL of BSA fatty acid free and homogenized for 3 minutes at 150 rpm. The homogenate was then centrifuged at 700 *g* for 10 min. The supernatant was centrifuged at 1500 *g* for 10 min. The resulting supernatant was centrifuged again at 7000 *g* for 10 min. The mitochondrial pellet obtained was resuspended with a low volume (50 µL) of isolation buffer in order to obtain a concentrated mitochondrial suspension. The protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay kit, derived from the Bradford method (1976) using BSA as a standard. Mitochondria were kept on ice at a final concentration of 60-100 mg/mL for not more than 4 h.

2.4. Mitochondrial potential measurement

The spectrofluorometer Xenius XC (SAFAS Monaco) was employed to monitor the fluorescence of Rhodamine 123 in order to evaluate mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) modification of isolated mitochondria extracted at different storage times (Day 0, Day 1, Day

En cours de soumission

2, Day 3 and Day 4). Importantly, such experimental approach does not allow quantifying $\Delta\Psi_m$ but gives a qualitative index of mitochondrial polarization. 1 mL of respiration buffer (KCl 125 mM, MOPS 20 mM, Tris 10 mM, EGTA 10 µM, KH_2PO_4 2. 5 mM, BSA fatty free acid 2 mg/mL, pH 7.2) at 25°C was added in a 3 mL plastic cuvette. Rhodamine 123 (50 nM final) and respiratory substrates: glutamate (5 mM), malate (2mM) and succinate (5 mM) were sequentially added. The baseline fluorescence of free Rhodamine 123 was recorded 2 minutes and then mitochondria (0.2 mg/mL) were added. The generation of a $\Delta\Psi_m$ leads to accumulation of Rh123 in the mitochondrial matrix and consequent fluorescence quenching (dye stacking). To evaluate mitochondrial function the following additions were sequentially performed. ADP (1mM), CAT (5 µM) and CCCP (2 µM). Sampling rate was 1 Hz, bandwidth 15 nm at excitation and emission, photomultiplier tube voltage was 700 V. Samples were excited at 500 nm and fluorescence was collected at 535 nm

The Rh123 fluorescence intensities recorded at different states of respiration (basal (substrates only), state 3 (ADP addition) and CAT were normalized to the fluorescence recorded after CCCP addition according the following formula:

$$\mathrm{d}100 - \left(\left(\frac{X-Y}{X}\right) \mathrm{x}\ 100\right)$$

Where: X = Rh123 fluorescence intensity after CCCP addition

Y = Rh123 fluorescence intensity after mitochondria or ADP or CAT addition

CCCP at 2 µM completely depolarized mitochondria by consuming all the proton gradient established by the respiratory chain. Thus, the fluorescence intensity obtained after its addition corresponded only to the dissipation of $\Delta\Psi_m$ and allowed taking into account the non-specific binding of the dye.

2.5. Respiration assay

Oxygraphy (Rank Brothers digital model 10 Cambridge, UK) was used to monitor oxygen consumption of isolated mitochondria at 25°C. Firstly, 2.1 mL of respiration buffer (composition previously described) were added in the oxygraphic chamber supplemented with a mixture of glutamate (5 mM), malate (2mM) and succinate (5 mM). Then, mitochondria were added at a final concentration of 0.2 mg/mL. Oxygen consumption rates were assessed without and with ADP (1 mM) (basal and state 3 respectively). Then, CAT (5 µM) was added to block the oxygen consumption linked to ATP synthesis. In order to evaluate the permeability of the mitochondrial outer membrane 10 µM of exogenous cytochrome c from equine heart were added. At the end of the acquisition CCCP was added to disrupt mitochondrial membrane potential and uncoupling the respiratory chain leading to an oxygen

En cours de soumission

consumption increase. The medium was stirred continuously during measurement. Calibration was performed, using sodium dithionite to reach the zero oxygen in the oxygraphic chamber.

Oxygen consumption rates were determined at each day of storage in the different experimental conditions (basal, state 3 and CAT). As an index of mitochondrial coupling respiratory control index (RCI) was calculated according to the following formula:

$$\mathrm{RCI} = \frac{\text{state 3}}{\mathrm{CAT}}$$

Where state 3 is the respiration rate during maximal ATP synthesis and CAT is the respiration rate not linked to ATP synthesis. Integrity of the outer membrane was evaluated by calculating the percentage of oxygen consumption not linked to ATP synthesis stimulated following the addition of exogenous cytochrome c.

2.6. Statistical analysis

The statistical analysis and graphs were generated with SPSS 17 software. Each experiment was performed at least in triplicate. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Unpaired two-sample t-tests were used to express the significance of difference ($p < 0.05$) between means, and Levene's test to determine the homogeneity of variance.

3. Results

3.1 Ultrastructural analysis of post mortem fish muscle

In order to study *post mortem* (PM) cell structural changes, ultrastructure of gilthead sea bream muscle tissue has been observed by transmission electron microscopy (TEM) from Day 0 to Day 6: Day 0 (6 h PM: Fig. 1a), Day 3 (72 h PM: Fig. 1b), Day 4 (96 h PM: Fig. 1c) Day 6 (144 h PM: Fig. 1d).

At Day 0, myofibrils were characterized by intact and well organized different bands (I-bands and A-bands) and lines (Z-lines and M-lines). The myofilaments of actin and myosin which constitute the sarcomere were well defined and their alignment was parallel.

The disorganization of the I-bands was observed from Day 3 of storage and it was amplified at Day 4 (Fig 1.c). At Day 6, I-band was barely identifiable (Fig 1.d). The loss of density of the Z-line was mainly observed at Day 6. The disruption of the parallel alignment of Z-lines, M-lines and I-bands was observed from Day 3 (Fig 1.b) and amplified at Day 6 (Fig 1.d). From Day 3, the myofilaments of actin and myosin were no longer aligned and tight between them and some gaps were detectable.

Fig 1a to 1d illustrated also the effect of post-mortem storage on mitochondrial structures. The micrograph of Day 0 gilthead sea bream muscle showed intact mitochondria with dense

En cours de soumission

matrix. The cristae compartments were compact and well organized. For the majority of the mitochondria, the double layer membranes were visible with an intact and regular shape. From Day 3, the mitochondrial morphology evolved. Mitochondria appeared swollen. The shape of the membranes was discontinuous and at some places damaged. The cristae were elongated, tubular, disorganized and have almost disappeared in some mitochondria. The matrix had a more electron lucent appearance with the presence of few dense granules (Fig. 1.b). The number of granules increased over time (rare granules on day 3, many granules on day 6 Fig 1.d). At Day 6, dense granules were located in nearly all mitochondria.

From a general point of view, gilthead sea bream fillet muscle cell has undergone several major structural changes from 3 days *post mortem* at +4°C. The mitochondria seem to undergo profound structural damages from the third day. The correlation between structural damages and mitochondrial activity *post mortem* in fish fillet muscle has been studied in the following experiments.

3.2 Post mortem *assessment of mitochondrial function*

Here, we studied by oxygraphy mitochondrial oxygen consumption from gilthead sea bream fillet muscle at different times of storage at +4°C (Fig 2.a-e).

Figure 2 shows typical oxygraphic recordings of the evolution of mitochondrial function from Day 0 to Day 4 (a: Day 0; b: Day 1; c: Day 2; d: Day 3; e: Day 4). At Day 0 (Fig. 2a), basal respiration (substrates only) reached 13.9 nmol O2/min/mg proteins. Following ADP addition mitochondrial respiration was stimulated (39.95 nmol O2/min/mg proteins) secondary to the consumption of the proton gradient by the ATP synthase. Addition of CAT inhibits the adenine nucleotides translocator and consequently ATP synthesis. As a consequence oxygen consumption decreased to reach a new steady state of respiration not coupled to ATP synthesis (7 nmol O2/min/mg proteins). The addition of cytochrome c, showing the integrity of the outer membrane of mitochondria by measuring the effect on respiration, demonstrated that the endogenous cytochrome c had no effect on respiration. The mitochondrial outer membrane was intact. Finally the decoupling agent CCCP was added. This respiration rate increased to 50 nmol O2/min/mg proteins illustrated an increase of the respiratory activity to maintain the disruption of $\Delta\Psi_m$.

The results for the mitochondrial oxygen consumption at Day 0 was compared with the mitochondrial oxygen consumption at Day 1 (Fig 2.b), Day 2 (Fig 2.c), Day 3 (Fig 2.d) and Day 4 (Fig 2.e).

En cours de soumission

From Day 0 (Fig 2.a) to Day 3 (Fig 2.d), the mean basal respiration rate was around 13.75 nmol O_2/min/mg proteins. From Day 4 (Fig 2.e), the respiration rate significantly increased to attain 17.75 nmol O_2/min/mg proteins. From Day 0 to Day 3 (Fig. 2.a-d), molecules of ADP, CAT and CCCP produced an effect on the oxygen consumption. From Day 4 (Fig 2.e), the effect of these molecules was very weak, which showed a mitochondrial decoupling. From Day 0 (Fig 2.a) to Day 4 (Fig 2.e), the respiration rate at state 3 progressively decreased from 39.95 nmol O_2/min/mg proteins to 24.225 nmol O_2/min/mg proteins. From Day 0 (Fig 2.a) to Day 3 (Fig 2.d), the difference between the basal respiration rate and state 3 was significate. At Day 4 (Fig 2.e), no significant difference was detectable between the basal respiration rate and the state 3 demonstrating that ADP addition has no effect.

Figure 3.a illustrates the repeatability of results from figure 2 according to 3 independent experiments. The evolution of the respirations (basal, state 3 and after CAT addition) is illustrated on Fig. 3a. From Day 0 to Day 3, no difference of basal respiration and a slight decrease of state 3 rate and after CAT addition were observed. At Day 4 (Fig. 3a), the basal respiratory rate was increased by 45 % (10.48 ± 3.10 nmol O_2/min/mg proteins to 15.93 ± 5.38 nmol O_2/min/mg proteins, $p < 0.05$). At Day 4, a slight increase of respiration rate after CAT addition was observed (8.88 ± 2.36 nmol O_2/min/mg proteins to 15.66 ± 5.66 nmol O_2/min/mg proteins, $p < 0.05$). At Day 4, mitochondria were not responding to ADP addition, indicating either a dysfunction of the ATP synthasome or an increased permeability of the inner membrane to protons.

The respiratory control index (RCI = state3/CAT) was calculated for each day (Fig 3a). At Day 0, RCI was 3.17 ± 0.71. RCI decreased from Day 0 to Day 4 to attain 1.30 ± 0.15 illustrating a significant difference between Day 0 and Day 4 ($p < 0.05$).

The evaluation of the external membrane integrity was measured by the addition of exogenous cytochrome c (Fig. 3.b). From Day 0 to Day 2, a slight elevation of the respiration rate was observed between 0.70 and 8 %. According to Kuznetsov *et al.*, (2008), an increase induced by cytochrome c was considered normal and acceptable when it is in between 5 and 15 %. From Day 3, more than 30 % stimulation of the respiratory rate was observed (38.5 % ± 21.19 at Day 3 and 35 % ± 19.06 at Day 4) illustrating that the outer membrane of mitochondria was damaged.

3.3 Post mortem *assessment of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)*

To further characterize the evolution of mitochondrial function post-mortem, a qualitative assessment of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was performed (Fig. 4). $\Delta\Psi_m$ being

En cours de soumission

generated by the electron transport chain it is correlated to mitochondrial function and integrity Zorova *et al.*, (2018). The potentiometric dye Rh123 was used to qualitatively assess $\Delta\Psi_m$. Rh123 accumulates in the mitochondrial compartment as a function of $\Delta\Psi_m$. The higher the potential the more dye will get into the matrix. Following accumulation and stacking of the dye within the matrix its fluorescence is quenched. Modulation of the electron transport chain activity by ADP, CAT or CCCP leads to $\Delta\Psi_m$ change and consequent movement of the dye accros the mitochondrial inner membrane.

At Day 0 (Fig 4.a), the addition of mitochondria in the buffer led to a strong fluorescence intensity decrease (quenching). Then, when ADP was added (state 3), the Rh123 fluorescence increased due to the release of the probe from the matrix in the surrounding buffer. ADP addition led to $\Delta\Psi_m$ decrease. In contrast, addition of CAT restored the $\Delta\Psi_m$ and consequently led to a decrease of fluorescence intensity. At the end of the experiment (Day 0; Fig. 4.a), addition of CCCP disrupted $\Delta\Psi_m$ and led to a fast fluorescent increase. The fluorescent signal did not reach the baseline value indicating that part of the decreased fluorescence following addition of mitochondria was not associated to the modulation of $\Delta\Psi_m$.

From Day 0 to Day 4 (Fig4.a-e), the intensity of Rh123 fluorescence in the respiratory buffer was evaluated in a same way. From Day 0 to Day 3 (Fig4.a-d), the mitochondria addition caused a fall in fluorescence of about 36 to 40% which showed a significant incorporation of Rh123 and therefore a high $\Delta\Psi_m$. At Day 4 (Fig4.e), the mitochondria addition led to lower fluorescence decrease (27%). From Day 0 to Day 3 (Fig4.a-d), ADP addition, by its decoupling action, decreased $\Delta\Psi_m$ and led to a release of the probe (fluorescence increase). This action was less important on Day 4 (Fig4.e). Conversely, by the blocking action of the nucleotide transporters, CAT increased $\Delta\Psi_m$ and therefore the incorporation of Rh123 in the mitochondria. This action was clearly identified from Day 0 to Day 3 (Fig4.a-d) and less important from Day 4 (Fig4.e).

The action of the CCCP (increased fluorescence due to rhodamine release) was related to the level of probe incorporation and more visible at Day 0,1,2,3 (Fig4.a-d) than at Day 4 (Fig4.e). The results obtained at Day 4 revealed that the $\Delta\Psi_m$ is disrupted.

In order to obtain a global view of the $\Delta\Psi_m$ evolution at different times of storage *post mortem*, the recorded fluorescence intensity was analyzed at different states of respiration (Fig 5). The fluorescence associated to different states of respiration (basal/ADP/CAT) was normalized by the fluorescence associated with CCCP treatment (as described in material and methods).

En cours de soumission

From Day 0 to Day 2, effects of ADP and CAT on Rh123 fluorescence were significant. From Day 3 to Day 4, neither ADP nor CAT were affecting Rh123 fluorescence demonstrating severe mitochondrial dysfunction.

From Day 3 to Day 4, the normalized Rh123 fluorescence was significantly higher for each state of respiration in comparison with Day 0, Day 1 and Day 2. This increase reflected a lower intake of Rh123 in the mitochondria and consequently the fall of $\Delta\Psi_m$. According to these results, we can conclude that after 72 h of storage (Day 3) at +4°C, the $\Delta\Psi_m$ started to decline and became significantly disrupted after 96 hours (Day 4).

4. Discussion

This study focused for the first time mitochondrial activity from fish skeletal muscle at different times of *post mortem* storage at +4°C in order to show structural and functional evolution of postmortem mitochondria. The structural evolutions have been described based on the electron microscopy images. The dual approach (oxymetric approach and mitochondrial potential approach: $\Delta\Psi_m$) of the mitochondrial functionalities allowed to better understanding the alterations suffered by the mitochondria of the sea bream fillets. This work showed that mitochondria undergo profound postmortem changes and led to have another look at fresh food products.

The post mortem structural changes in fish skeletal muscle

Electron microscopy images allowed to study the structural changes of the mitochondria in fish fillets stored *post mortem* at +4°C during 6 days. By choosing days 3 and 4 we wanted to check whether the observed mitochondrial activity changes were associated with major structural changes. At Day 0 (6 hours *post mortem*), fish cell muscle conserved their structural integrity. The myofibrils arrangement was conserved and well-organized. No gaps between sarcomeres were observable and collagen was still visible. These observations were in correlation with others studies which described a good conservation of muscle myofilaments in gilthead sea bream fillet at Day 0 Caballero *et al.*, (2009); Ayala *et al.*, (2010); Ayala *et al.*, (2011). The majority of mitochondria were intact with non-altered membrane and a network of compact and well organized cristae. Some authors who studied the evolution of myofilament structure in fish muscles have also been able to observe the evolution of mitochondria. Indeed, Ayala *et al.*, (2010) observed in gilthead sea bream fillet (kept at +4°C), the swelling of some organelles such as mitochondria and sarcoplasmic réticulum after 3 hours post-mortem. Another study on sea bass of the same authors, showed a rapid evolution of the mitochondrial structure (with swelling) after 3 hours *post mortem* Ayala *et*

En cours de soumission

al., (2005). Roy *et al.*, (2012) described altered mitochondria with swollen cristae on Pacific bluefin tuna muscle cell at Day 0. More focused studies on mammalian mitochondria showed a good mitochondrial structures conservation several hours *post mortem*. From a structural point of view, it appears that gilthead sea bream mitochondria (as for mammalian mitochondria: Barksdale *et al.*, (2010)) undergo few changes within a few hours of the animal's death. From Day 3 to Day 6 (72 h – 144 h *post mortem*), several structural damages of muscle myofilaments in gilthead sea bream fillet were observed with a general disorganization of the myofibrils alignment with several gaps. Ayala *et al.*, (2011) reported the same observations from Day 5 in gilthead sea bream muscle such as alteration of sarcomeres at the I-band level, actin filaments and disruption of Z-lines.

Mitochondria were swollen with disrupted membranes and dense granules in mitochondrial matrix. The dense granules have also been observed by Ayala *et al.*, (2010) on gilthead sea bream mitochondria from five days post-mortem and described as “dense granules”. These granules have also been observed post-mortem in mammalian mitochondria Kuypers et Roomans, (1980). Wolf *et al.*, (2017) offered an explanation on the appearance of dense granules in mitochondria. These authors showed that the granules came from the accumulation and precipitation of calcium in the mitochondrial matrix. Dong *et al.*, (2006) showed that during cell death processes calcium homeostasis was profoundly disturbed and led to massive calcium entry into the mitochondria. This flux led initially to the swelling of the organelles and then to the precipitation of calcium as insoluble phosphate and hydroxyapatite, which participated of mitochondrial damage and cell death Dong *et al.*, (2006). Calcium aggregation in ischemia conditions described by these authors could be similar to those found *post mortem* in muscle cell which were also deprived of oxygen.

En cours de soumission

Mitochondria activity: an early fish freshness indicator

In the second part, the study was focused on mitochondrial activity *post mortem* in fish muscle cell at different times of storage at +4°C: Day 0 (6 h), Day 1 (24 h) , Day 2 (48 h), Day 3 (72 h) and Day 4 (96 h). Two approaches based on oxygraphy and fluorescence allowed to investigate mitochondrial activity.

Mitochondria maintained significant respiratory activity for the first 3 days of storage (Day 0 to Day 3). From Day 4, the respiratory activity declined significantly (96 hours *post mortem*): RCI (1.3 ± 0.15) was significantly lower than at Day 0 (3.17 ± 0.71). RCI is a useful measure to assess mitochondrial function in isolated mitochondria and its decrease is associated to mitochondrial dysfunction Brand et Nicholls, (2011). This mitochondrial dysfunction came

from electrons transport chain alteration, whose activity can be explored with different substrates (ADP, CAT, Cytochrome C, CCCP). At the fourth day (Day 4), decoupling agents such as CCCP and ADP had no action on mitochondrial respiration (no respiratory activity increase) showing the inability of respiratory chains to adapt to the loss of mitochondrial potential (via ADP or CCCP addition). The mitochondrial decoupling at Day 4 could be due to the mitochondrial membranes permeabilization. The mitochondrial outer membrane alteration was confirmed by the activating effect of exogenous cytochrome c on respiration activity (30% at Day 4).

The fluorescent probe Rhodamine 123 (Rh123) was used for the membrane potential evaluation of isolated mitochondria ($\Delta\Psi_m$). Comparing to the oxygraphic results, we can clearly observe the uncoupling action of ADP and CCCP on mitochondria isolated from sea bream fillets conserved at +4°C (Day 0, Day 1, Day 2). ADP and CCCP led to a mitochondrial potential dissipation which decreased the uptake of the probe and thus increased the overall fluorescence in the surrounding buffer. From Day 3, ADP and CCCP additions had no significant effects on Rh123 fluorescence intensity indicating the mitochondrial decoupling. In addition, Rh123 fluorescence intensity increased from Day 3 for all states of respiration. This increase was associated to a decrease of Rh123 quenching. The high value of standard deviation obtained at Day 3, representative of eight independent experiments; emphasized the great heterogeneity of the results at this precise time compared to Day 4. Overall, the results obtained with the fluorescent probe Rh123 demonstrated that $\Delta\Psi_m$ was strongly and significantly disrupted from Day 4. This disruption was correlated to the mitochondrial activity decline and consequently to cell health and mitochondrial membrane integrity Zorova *et al.*, (2018) .

Both approaches (oxygraphic and fluorescence) coincided well and showed that isolated mitochondria of sea bream fillets stored at +4°C conserved activity 2 to 3 days *post mortem*. From Day 3/Day 4, mitochondrial respiratory activity and $\Delta\Psi_m$ strongly decreased. According to the expression of Cheah et Cheah, (1971), the “critical storage time” was between 72 hours (Day 3) and 96 hours (Day 4) for the model *Sparus aurata* stored on ice at +4°C. The maintenance of mitochondrial activity was demonstrated in others studies in ox neck muscle Cheah et Cheah, (1971); Cheah et Cheah, (1974) and in mouse and human brain Barksdale *et al.*, (2010).

In stress condition of anoxia retrieved after death, calcium homeostasis is disrupted and calcium level increase in sarcoplasm. Mitochondria have the ability to maintain their activity *post mortem*. This maintain occurs, because mitochondrial ATP synthase can run in reverse,

En cours de soumission

hydrolyzing ATP generated by glycolysis in order to maintain $\Delta\Psi_m$ St-Pierre *et al.*, (2000). Sarcoplasmic calcium integrates mitochondria through the maintained $\Delta\Psi_m$. From Day 3/Day 4, calcium accumulation in mitochondria became important and appeared in the form of dense granules by electron microscopy. Mitochondrial calcium overload became important, led to $\Delta\Psi_m$ disruption and mitochondrial membrane permeabilization according to Dong *et al.*, (2006). The membranes permeabilization can be associated to the formation of mitochondrial permeability transition pore leading to the release of cell death inducing factors, cytochrome c and huge amounts of calcium in sarcoplasm. This release probably plays a role in integrating death signals and can participate in proteolytic enzyme activation (via the release of cytochrome c and mitochondrial calpains activation) Boudida *et al.*, (2015), Smith et Schnellmann, (2012).

Day 3/Day 4 is a crucial time of storage in gilthead sea bream muscle cell which is the starting point of important cell alteration. From Day 3, it was reported that insoluble collagen decreased strongly leading to a loss of firmness and an increase of the water-holding capacity Suárez *et al.*, (2005). At Day 4, the molecule dystrophin, which provides a link between cytoskeletal actin and extracellular matrix, almost disappeared while actin and desmin were detected in fish muscle at early stages of alteration *post mortem* (14 days). Loss of dystrophin is correlated to detachment myofibres and myocommata and a reduction in flesh hardness Caballero *et al.*, (2009). From Day 4, free LDH activity released from sea bream muscle strongly increase demonstrating an increase of fish autolysis after 4 days of storage at +4°C Diop *et al.*, (2016).

It could be interesting to focus in future studies mitochondrial activity maintained during a longer time in other experimental conditions such as a storage temperature of +0°C/+2°C, the use of natural additives or modified atmosphere packaging.

En cours de soumission

5. Conclusion

The mitochondrial structural changes (swelling, membranes and cristae alteration, accumulation of dense granules) were correlated with permeability increase (sensitivity to cytochrome c), $\Delta\Psi_m$ disruption and respiratory activities decrease. The mitochondria of sea bream fillets stored at +4°C maintained a significant respiratory activity during the first three days of storage. Thereby, mitochondria could be attractive targets for measuring the freshness of seafood and the starting point of the development of a fish freshness kit concerning the first stages of spoilage. Can these structural and physiological mitochondrial changes in a fresh

seafood product (such as fish fillets) have an influence on perception and health on the consumer?

Acknowledgements

Jérôme Cléach is grateful to the *Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale* council and *PFI Nouvelles Vagues* for their financial support of his PhD studies.

Fundings

This study was funded by the French government and the Hauts-de-France region in the framework of the CPER 2014-2020 MARCO project. This research was also funded by FranceAgrimer in the framework of the Altfish project.

En cours de soumission

References

Alasalvar, C., Taylor, K., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M., & Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chem.*, *72*(1), 33-40.

Aubourg, S. P., Quitral, V., Angélica Larraín, M., Rodríguez, A., Gómez, J., Maier, L., & Vinagre, J. (2007). Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. *Food Chem.*, *104*(1), 369-375.

Ayala, M. D., Abdel, I., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M. J., Gil, F., Blanco, A., & Albors, O. L. (2010). Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. *LWT-Food Sci. Technol.*, *43*(3), 465-475.

Ayala, M. D., Albors, O. L., Blanco, A., Alcázar, A. G., Abellán, E., Zarzosa, G. R., & Gil, F. (2005). Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture*, *250*(1-2), 215-231.

Ayala, M. D., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M. J., Blanco, A., Vázquez, J. M., & Albors, O. L. (2011). Muscle tissue structure and flesh texture in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., fillets preserved by refrigeration and by vacuum packaging. *LWT-Food Sci. Technol.*, *44*(4), 1098-1106.

Barksdale, K. A., Perez-Costas, E., Gandy, J. C., Melendez-Ferro, M., Roberts, R. C., & Bijur, G. N. (2010). Mitochondrial viability in mouse and human postmortem brain. *FASEB J.*, *24*(9), 3590-3599.

Blier, P. U., & Guderley, H. E. (1993). Mitochondrial activity in rainbow trout red muscle: the effect of temperature on the ADP-dependence of ATP synthesis. *J. Exp. Biol.*, *176*(1), 145-158.

Boudida, Y., Becila, S., Gagaoua, M., Boudjellal, A., Sentandreu, M., & Ouali, A. (2015). Muscle to meat conversion in common carp (*cyprinus carpio*): new insights involving apoptosis. In *61th. International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST). 2015; 61. International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), Clermont-Ferrand, FRA, 2015-08-23-2015-08-28, 162-162*): INRA.

Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.*, *435*(2), 297-312.

Caballero, M., Betancor, M., Escrig, J., Montero, D., De Los Monteros, A. E., Castro, P., Ginés, R., & Izquierdo, M. (2009). Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture, 291*(3-4), 210-216.

Cambier, S., Benard, G., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Rossignol, R., Brethes, D., & Bourdineaud, J.-P. (2009). At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*). *Int. J. Biochem. Cell Biol., 41*(4), 791-799.

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.

Cheah, K., & Cheah, A. (1971). Post-mortem changes in structure and function of ox muscle mitochondria. 1. Electron microscopic and polarographic investigations. *J. Bioenerg., 2*(2), 85-92.

Cheah, K., & Cheah, A. (1974). Properties of mitochondria from ox neck muscle after storage in situ. *Int. J. Biochem., 5*(9-10), 753-760.

Cheng, J. H., Sun, D. W., Han, Z., & Zeng, X. A. (2014). Texture and structure measurements and analyses for evaluation of fish and fillet freshness quality: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 13*(1), 52-61.

Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R., & Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 46*(5), 409-421.

Diop, M., Watier, D., Masson, P.-Y., Diouf, A., Amara, R., Grard, T., & Lencel, P. (2016). Assessment of freshness and freeze-thawing of sea bream fillets (*Sparus aurata*) by a cytosolic enzyme: Lactate dehydrogenase. *Food Chem., 210*, 428-434.

Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (2006). Calcium in cell injury and death. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 1*, 405-434.

Garceau, N., Pichaud, N., & Couture, P. (2010). Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by *in vitro* exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquat. Toxicol., 98*(2), 107-112.

Hassoun, A., & Karoui, R. (2015). Front-face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring fish freshness stored under different refrigerated conditions. *Food Control, 54*, 240-249.

Hassoun, A., & Karoui, R. (2017). Quality evaluation of fish and other seafood by traditional and nondestructive instrumental methods: Advantages and limitations. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 57*(9), 1976-1998.

Hilton, Z., Clements, K. D., & Hickey, A. J. (2010). Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *J. Comp. Physiol., B, 180*(7), 979-990.

Kuypers, G. A., & Roomans, G. M. (1980). Post-mortem elemental redistribution in rat studied by X-ray microanalysis and electron microscopy. *Histochemistry, 69*(2), 145-156.

Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature protocols, 3*(6), 965.

Lanari, M., & Cassens, R. (1991). Mitochondrial activity and beef muscle color stability. *J. Food Sci., 56*(6), 1476-1479.

Lionetti, L., Mollica, M. P., Donizzetti, I., Gifuni, G., Sica, R., Pignalosa, A., Cavaliere, G., Gaita, M., De Filippo, C., & Zorzano, A. (2014). High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. *PloS one, 9*(3), e92753.

Mendes, R. (2018). Technological processing of fresh gilthead seabream (*Sparus aurata*): A review of quality changes. *Food Rev. Int.*, 1-34.

En cours de soumission

Ocaño-Higuera, V. M., Maeda-Martínez, A. N., Marquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D. F., Castillo-Yáñez, F. J., Ruíz-Bustos, E., Graciano-Verdugo, A. Z., & Plascencia-Jatomea, M. (2011). Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chem., 125*(1), 49-54.

Oehlenschläger, J., & Sörensen, N. (1997). Criteria of fish freshness and quality aspects. In *The Final Meeting of the Concerted Action-Evaluation of Fish Freshness-1997*, (pp. 30-35).

Olafsdottir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I., Henehan, G., Nielsen, J., & Nilsen, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Technol., 8*(8), 258-265.

Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S. a. V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A., & Jørgensen, B. M. (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends Food Sci. Technol., 15*(2), 86-93.

Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadottir, S. V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., & Esaiassen, M. (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science & Technology, 15*(2), 86-93.

Parlapani, F. F., Mallouchos, A., Haroutounian, S. A., & Boziaris, I. S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International journal of food microbiology, 189*, 153-163.

Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). Mitochondria in cell death. *Essays Biochem., 47*, 99-114.

Pasdois, P., Parker, J. E., Griffiths, E. J., & Halestrap, A. P. (2011). The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia. *Biochemical Journal, 436*(2), 493-505.

Pornrat, S., Sumate, T., Rommanee, S., Sumolaya, K., & Kerr, W. L. (2007). Changes in the ultrastructure and texture of prawn muscle (*Macrobrachuim rosenbergii*) during cold storage. *LWT-Food Sci. Technol., 40*(10), 1747-1754.

Roy, B. C., Ando, M., Itoh, T., & Tsukamasa, Y. (2012). Structural and ultrastructural changes of full-cycle cultured Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) muscle slices during chilled storage. *J. Sci. Food Agric., 92*(8), 1755-1764.

Smith, M. A., & Schnellmann, R. G. (2012). Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovasc. Res., 96*(1), 32-37.

Soares, S. S., Gutierrez-Merino, C., & Aureliano, M. (2007). Mitochondria as a target for decavanadate toxicity in *Sparus aurata* heart. *Aquat. Toxicol., 83*(1), 1-9.

St-Pierre, J., Brand, M. D., & Boutilier, R. G. (2000). Mitochondria as ATP consumers: cellular treason in anoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97*(15), 8670-8674.

Suárez, M. D., Abad, M., Ruiz-Cara, T., Estrada, J. D., & García-Gallego, M. (2005). Changes in muscle collagen content during *post mortem* storage of farmed sea bream (*Sparus aurata*): influence on textural properties. *Aquacult. Int., 13*(4), 315-325.

Tang, J., Faustman, C., Hoagland, T. A., Mancini, R. A., Seyfert, M., & Hunt, M. C. (2005). Postmortem oxygen consumption by mitochondria and its effects on myoglobin form and stability. *J. Agric. Food Chem., 53*(4), 1223-1230.

Taylor, R., Fjaera, S., & Skjervold, P. (2002). Salmon fillet texture is determined by myofiber-myofiber and myofiber-myocommata attachment. *J. Food Sci., 67*(6), 2067-2071.

Tomita, Y., Nihira, M., Ohno, Y., & Sato, S. (2004). Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. *Leg. Med., 6*(1), 25-31.

En cours de soumission

Van den Thillart, G., & Modderkolk, J. (1978). The effect of acclimation temperature on the activation energies of state III respiration and on the unsaturation of membrane lipids of goldfish mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr., 510*(1), 38-51.

Watanabe, E., Tamada, Y., & Hamada-Sato, N. (2005). Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on K_I value. *Biosens. Bioelectron., 21*(3), 534-538.

Wolf, S. G., Mutsafi, Y., Dadosh, T., Ilani, T., Lansky, Z., Horowitz, B., Rubin, S., Elbaum, M., & Fass, D. (2017). 3D visualization of mitochondrial solid-phase calcium stores in whole cells. *Elife, 6*.

Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.*, 552, 50-59.

En cours de soumission

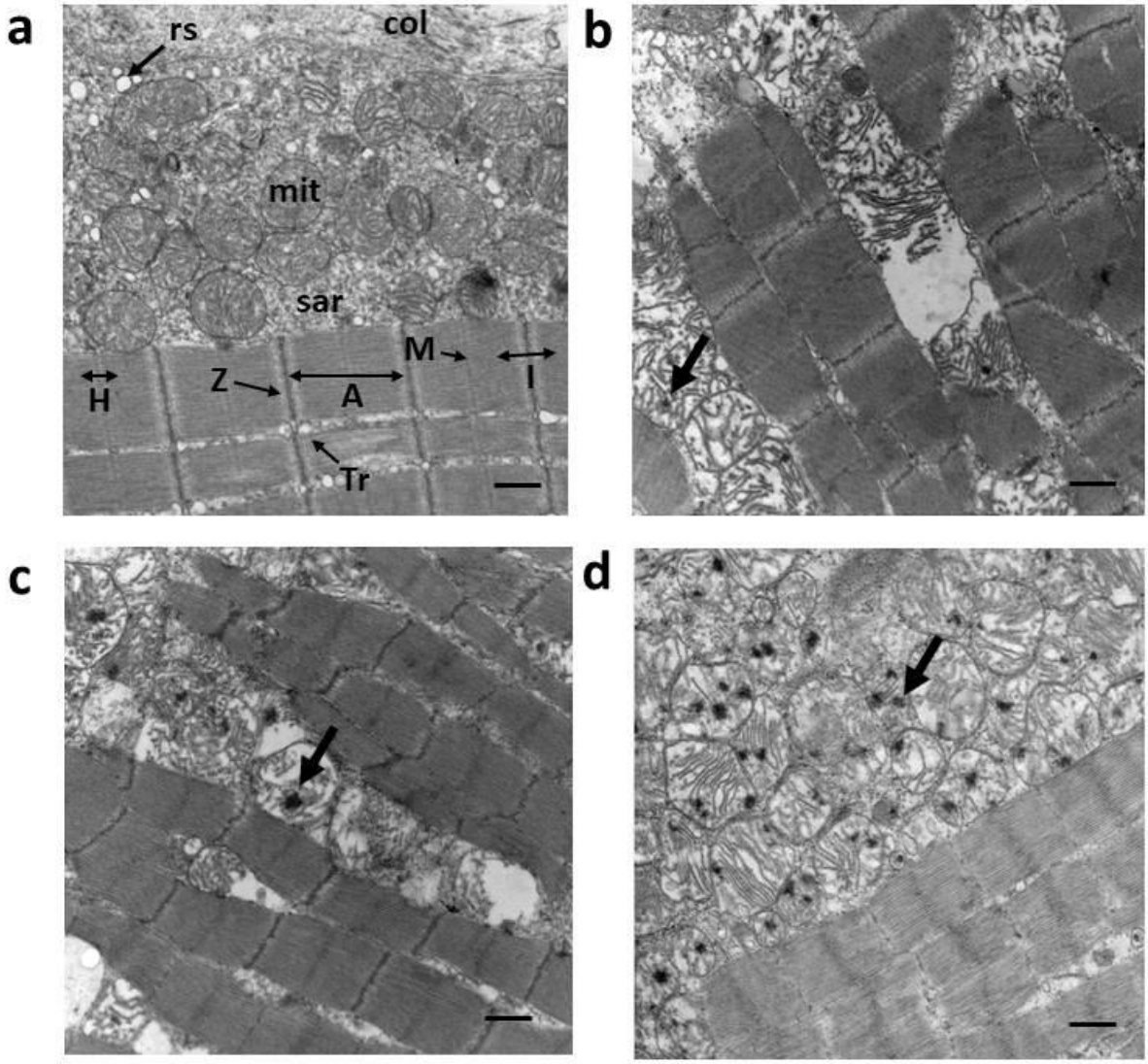


Figure 1: Longitudinal sections of gilthead sea bream muscle at different *post mortem* times 6 h *post mortem* (Day 0) (a), 72 h (Day 3) (b), 96 h (Day 4) (c) and 144 h (Day 6) (d). A: A band; col: collagen; dg: dense granules; H: H zone; I: I band; M: M line; mit: mitochondria; sar: sarcoplasm; sr: sarcoplasmic réticulum; Tr: triad; Z: Z line. Bars: a, b, c, d: 500 nm.

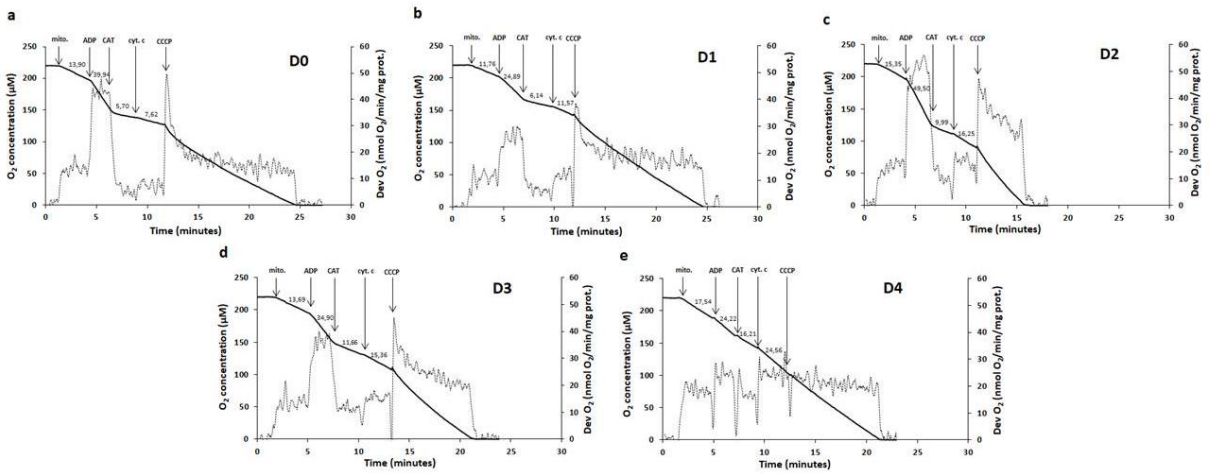


Figure 2: Post mortem assessment of respiratory activity of gilthead sea bream isolated mitochondria by oxygraphy

Oxygraph traces and their first derivate (dotted line) are represented at different times of storage: Day 0 (a), Day 1 (b), Day 2 (c), Day 3 (d), and Day 4 (e). After the addition of mitochondria (mito.) (0.2 mg/mL), the molecules ADP (2 mM), CAT (5 µM), cytochrome c (Cyt. C) (10 µM) and CCCP (2 µM) were respectively added in the incubation chamber. These graphs are representative of one experiment.

En cours de soumission

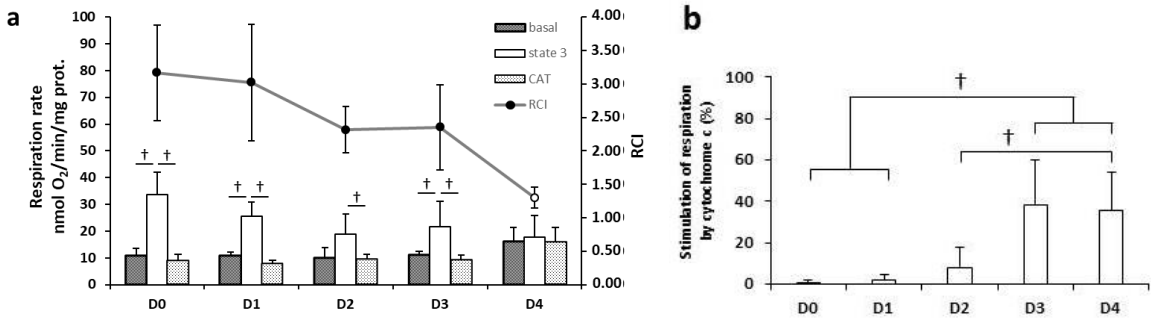


Figure 3: Evaluation of mitochondrial intactness parameters

RCI, respiration rates (a) and stimulation of respiration by cytochrome c (b) at different *post mortem* intervals. The mitochondria were isolated from gilthead sea bream muscle at different times of storage: Day 0, Day 1, Day 2, Day 3 and Day 4. Asterisks denote values which are significantly different of values recorded at Day 0. White circle denotes values which are significantly different of values recorded at Day 0, Day 1, Day 2. Daggers denote values which are significantly different. T-test was performed using SPSS Statistic 17 program; ($P<0.05$; N=3-5).

En cours de soumission

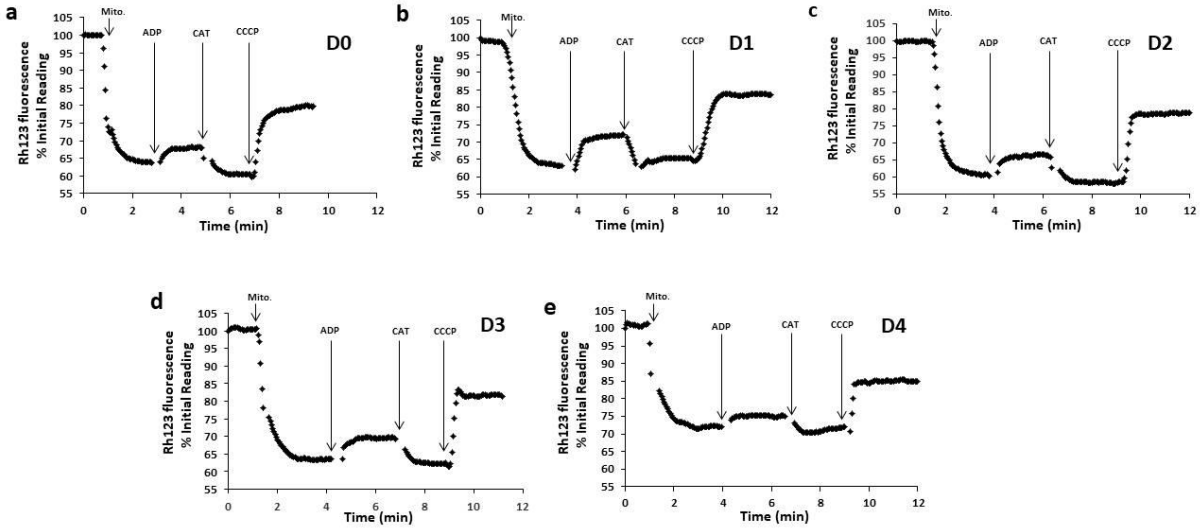


Figure 4: Post mortem assessment of mitochondrial membrane potential of gilthead sea bream isolated mitochondria by fluorimetry (Safas).

Rhodamine 123 (Rh123) fluorescence traces of isolated mitochondria are represented at different times of storage: Day 0 (a), Day 1 (b), Day 2 (c), Day 3 (d), Day 4 (e). After the addition of mitochondria (Mito.) (0.2 mg/mL), the molecules ADP (2 mM), CAT (5 µM) and CCCP (2 µM) were added in a 3 mL cuvette. These graphs are representative of one experiment.

En cours de soumiss

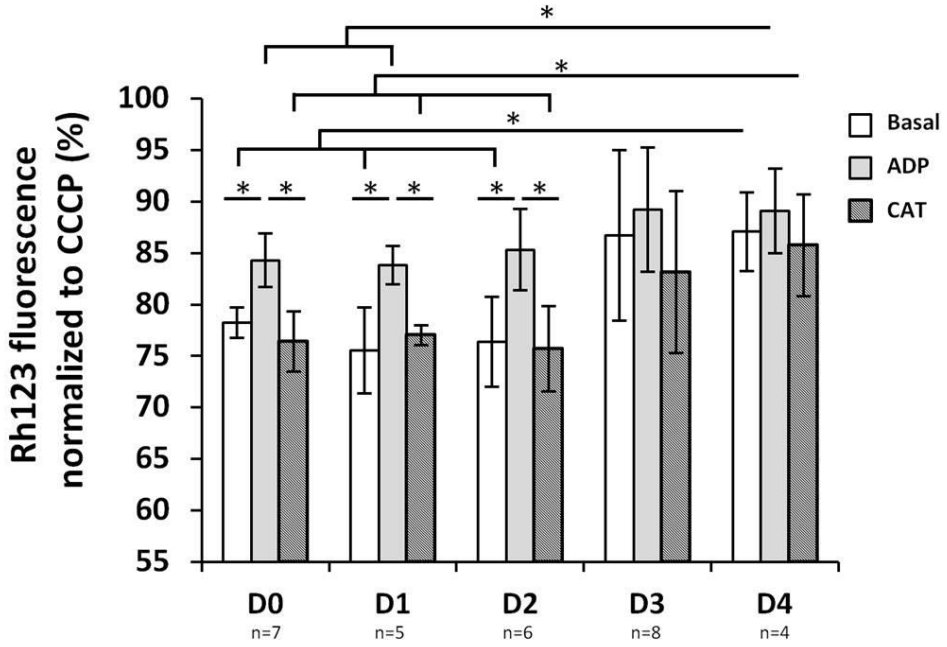


Figure 5: Summary graphs of Rh123 fluorescence level at different states of respiration normalized to CCCP at different times of storage. The different times of storage were: Day 0, Day 1, Day 2, Day 3, and Day 4. Asterisks denote values which are significantly different at different times of storage. T-test was performed using SPSS Statistic 17 program; ($P<0.05$; N=4-8).

En cours de soumission

Résumé

La fraîcheur est un paramètre clé de la qualité du poisson. Les méthodes actuelles appliquées en routine pour déterminer la fraîcheur du poisson ne sont pas applicables à toutes les espèces et reflètent davantage un début d'altération du produit. Ainsi, la recherche d'indicateurs précoces de fraîcheur du poisson représente encore un défi majeur et d'actualité dans l'industrie de la pêche.

Le but de ces travaux de thèse était de démontrer que les fonctions et l'intégrité mitochondriales étaient susceptibles de constituer des indicateurs précoces de la fraîcheur de filets de poisson. En effet, la mitochondrie est la « centrale » énergétique de la cellule eucaryote et joue un rôle clef dans les mécanismes de mort cellulaire tels que l'apoptose et la nécrose.

Les fonctions et l'intégrité mitochondriales de cellules musculaires de filets de poisson ont été étudiées à différents temps de conservation *post mortem* à 4°C. Le modèle d'étude était la daurade royale (*Sparus aurata*) (lignée cellulaire de fibroblastes (SAF-1) et muscles de poisson).

Dans un premier temps, la structure des mitochondries de poisson a été étudiée par microscopie électronique à transmission. De nombreuses dégradations de la structure des mitochondries ont été observées dans les filets à partir de 72 heures (J3) de conservation à 4°C. Ces altérations se sont accentuées à J4 et J6. La fonctionnalité des mitochondries a ensuite été évaluée selon deux approches : la respiration mitochondriale (oxygraphie) et le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) estimé avec la sonde fluorescente Rhodamine 123. À partir de 96 heures de conservation à 4°C (J4), ces deux paramètres ont été significativement impactés témoignant d'une altération des fonctions et de l'intégrité mitochondriales. Ces résultats sont ainsi en corrélation avec l'altération structurale observée par microscopie. En parallèle, une méthode d'évaluation du potentiel membranaire a été développée avec un fluorimètre à microvolume à partir d'un modèle bactérien puis de mitochondries isolées.

Ces travaux de thèse ont démontré que l'étude des fonctionnalités mitochondriales constitue un marqueur fiable et précoce de la fraîcheur des filets de poisson. Des connaissances supplémentaires sur les mécanismes cellulaires *post mortem* ont également été apportées.

Ces résultats constituent ainsi le point de départ pour le développement d'un kit d'évaluation de la fraîcheur et ouvrent la voie pour la recherche de marqueurs de fraîcheur et de congélation/décongélation basés sur les fonctionnalités et intégrité mitochondriales.

Mots clés : fraîcheur, daurade royale (*Sparus aurata*), mitochondrie, respiration mitochondriale, potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), oxygraphie, Rhodamine 123.