



**HAL**  
open science

**Développement d'une méthode méthodologie de PCR en temps réel pour l'identification et la quantification de trois espèces de thon (Thunnus obesus, Thunnus albacares et Katsuwonus pelamis) dans les produits appertisés**

Daline Bojolly

► **To cite this version:**

Daline Bojolly. Développement d'une méthode méthodologie de PCR en temps réel pour l'identification et la quantification de trois espèces de thon (Thunnus obesus, Thunnus albacares et Katsuwonus pelamis) dans les produits appertisés. Sciences et techniques des pêches. Université du Littoral Côte d'Opale, 2017. Français. NNT : 2017DUNK0445 . tel-02151058

**HAL Id: tel-02151058**

**<https://theses.hal.science/tel-02151058>**

Submitted on 7 Jun 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.

# Université du Littoral Côte d'Opale

École Doctorale Sciences de la Matière,  
du Rayonnement et de l'Environnement : ED SMRE 104  
Discipline : Ingénierie des Fonctions Biologiques (IFB)

Équipe de Recherche Biochimie des Produits Aquatiques (BPA)  
USC Anses-ULCO - Institut Charles VIOLLETTE (EA 7394) ;  
LOG (UMR 8187) ; PFINV

Thèse présentée par :

**Daline BOJOLLY**

Soutenue le 29 mars 2017

Pour obtenir le Grade de Docteur  
délivré par l'Université du Littoral Côte d'Opale

**Développement d'une méthodologie de  
PCR en temps réel  
pour l'identification et la quantification  
de trois espèces de thon  
(*Thunnus obesus*, *Thunnus albacares* et *Katsuwonus pelamis*)  
dans les produits appertisés**

## Composition du Jury :

Jean-François BAROILLER, rapporteur ..... *Directeur de Recherches, CIRAD, Montpellier*  
Charles MANCEAU, rapporteur ..... *Directeur de Recherches, Anses, Angers*  
Agnès DETTAÏ, examinatrice ..... *Maître de Conférences, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris*  
Urania CHRISTAKI, directrice de thèse ..... *Professeur des Universités, ULCO, LOG, Wimereux*  
Véronique VERREZ BAGNIS, co-directrice de thèse ..... *Cadre de Recherches HDR, Ifremer, Nantes*  
Thierry GRARD, co-encadrant ..... *Maître de Conférences HDR, ULCO, Boulogne sur mer*  
Lydie REMBUR, invitée ... *Responsable qualité / méthodes Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues, Boulogne sur mer*



# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur BAROILLER, Monsieur MANCEAU et Madame DETTAÏ pour l'intérêt porté à ce travail et pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je vous présente l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à remercier très sincèrement Madame Urania CHRISTAKI et Madame Véronique VERREZ-BAGNIS d'avoir accepté de co-diriger ces travaux de thèse. Je vous remercie pour vos encouragements, vos conseils avisés et tout le soutien que vous m'avez accordé. Je remercie Monsieur Thierry GRARD et Madame Périne DOYEN pour leur encadrement. Merci Thierry pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe BPA et pour ton accompagnement tout au long de ma thèse. Je tiens également à remercier Monsieur Bruno LE FUR de Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues (PFINV) pour tout le soutien accordé.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues, de BPI France et de la région Hauts-de-France qui ont participé au financement de la bourse et aux travaux de thèse. Je tiens à leur adresser mes sincères remerciements pour leur soutien.

Je tiens à remercier Monsieur Philippe DROIN, anciennement secrétaire général de la CITPPM chargé du projet IDThon. Encore une fois, je remercie la Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues et plus particulièrement Monsieur Olivier POLINE, son directeur. Je tiens également à remercier Monsieur Mathieu VOLZ pour son soutien technique, ainsi que Madame Lydie REMBUR, Monsieur Florent DEBRUYNE et Madame Véronique MULAK.

Je remercie la CITPPM qui porte le projet IDThon, ainsi que Madame Évelyne FENART Secrétaire générale de la CITPPM et Madame Julie MANCINI chargée de mission du pôle AQUIMER.

Je remercie Monsieur François RODIUS de l'Université de Lorraine - Metz pour les conseils prodigués et pour sa collaboration au sein des comités de thèse. Je remercie Astrid FOVET, pour sa participation au sein du projet IDThon, ainsi que son aide apporté dans les expérimentations.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe BPA pour l'accueil chaleureux que m'ont témoigné Maryse BONNIN-JUSSERAND, Pierrette ETHUIN, Irina SADOSKAYA, Philippe LENCEL, Denis WATIER, Cédric LE BRIS, Marie-France LOUCHET, Mamadou DIOP et Jérôme CLEACH. Je vous remercie pour vos conseils, votre soutien, votre disponibilité et vos encouragements. J'ai rencontré des personnes passionnées et tout simplement formidables.

Je remercie Madame Anne BRISABOIS de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de l'Anses de Boulogne-sur-Mer. Je tiens à remercier Madame Graziella BOURDIN, Madame Mélanie GAY et Monsieur Guillaume DUFLOS, de m'avoir accueillie parmi leurs différentes équipes.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de l'Anses de Boulogne-sur-Mer, une pensée pleine de reconnaissance inspirée par la générosité et la gentillesse que vous m'avez manifestées. Merci à Régine, Sophie, Karine, Corinne, Odile, Charlotte, Sylvie, Cindy, Guylaine, Clémence, Sabine, Virginie, Gaëlle, Sophie K, Thomas, Alexandre, Yuwalee, Arnaud, Ludovic et Estelle, pour m'avoir fait une place, d'avoir su répondre à ma curiosité scientifique et pour le temps que vous m'avez accordé. Je remercie Madame Stéphanie COPIN et Madame Annick ROBERT-PILLOT pour leurs conseils prodigués en PCR quantitative et la construction des sondes. Évidemment, je te remercie Marie pour ta bonne humeur, ta gentillesse et tes petits mots qui savent toujours encourager.

Je tiens à remercier Solène CROQUELOIS et Valérie LENCEL pour la préparation des TP, pour vos conseils et votre gentillesse. Cela aura été une expérience extrêmement enrichissante. Je remercie Odile et Jocelyne pour votre disponibilité et votre bienveillance. Je tiens vivement à remercier Madame Pierrette ETHUIN et Monsieur Guillaume DUFLOS pour leurs conseils avisés en enseignement. Pierrette, du fond du cœur, mille mercis...

Je tiens à remercier Monsieur David ROUX, mon maître de stage de Master 2 pour m'avoir soutenue et encouragée dans cette voie. Merci pour ton humour et ta vision de la recherche.

Je remercie l'ensemble de ma famille et mes amis pour leur écoute et leur soutien sans failles. Ma sœur et mes petits frères que je chéris tant, mes taties qui m'ont toujours soutenue, mes petites-cousines, mon « Tonton » adoré et ma « Marraine-tata » qui m'ont tant apporté, Hermance, Aline, Guy, Cécile, Christophe et mon petit Thibaut, merci pour vos encouragements qui m'ont été précieux ainsi que pour les beaux moments passés ensemble...

Je remercie mes parents d'avoir toujours cru en moi et pour m'avoir toujours accordé leur soutien inconditionnel. Merci, pour vos mots réconfortants, votre patience et votre persévérance. Il n'y aura jamais suffisamment de mots pour vous exprimer mon infinie gratitude...

Gilles, merci pour tout le soutien que tu as su me témoigner, souvent dans les moments les plus difficiles. Je crois que je ne te remercierai jamais assez pour toute l'aide que tu m'as apportée à chaque fois que j'en avais besoin...

Je te remercie surtout pour ces belles années...

Pour toi Ben, ton souvenir reste et demeure inoubliable, « la vie est courte et précieuse, le mieux que nous puissions faire, c'est de la vivre, en faisant ce qui nous passionne ».

Je tiens à remercier toutes les personnes rencontrées et tous ceux qui ont contribué à faire de ces années une expérience enrichissante sur bien des aspects.

*Merci à toutes et à tous.*

# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>7</b>
<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>11</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>15</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>19</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>27</b>
A.    GENERALITES .....	29
1.    IMPORTANCE DU MARCHÉ DU THON ET DE LA CONSERVE DE THON .....	29
2.    LES SUBSTITUTIONS VOLONTAIRES ET INVOLONTAIRES .....	37
2.1.    SUBSTITUTIONS ENTRE LES ESPÈCES MORPHOLOGIQUEMENT PROCHES .....	37
2.2.    SUBSTITUTIONS LIÉES AUX TECHNIQUES DE PÊCHE .....	38
2.3.    SUBSTITUTIONS LIÉES À LA CONSERVATION AVANT TRANSFORMATION.....	39
2.4.    SUBSTITUTIONS LIÉES À LA PERTE DES CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES EXTERNES LORS DE LA TRANSFORMATION.....	40
2.5.    LE SEUIL DE DIFFÉRENCIATION ENTRE LES SUBSTITUTIONS POUR UN LOT.....	41
B.    LES MÉTHODES D'IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE THON .....	42
1.    IDENTIFICATION DES ESPÈCES BASÉES SUR LES PROTÉINES ET ÉTUDE DE L'IMPACT DE L'APPERTISATION.....	42
1.1.    LES MÉTHODES UTILISANT LES PROTÉINES.....	42
1.2.    EFFET DE L'APPERTISATION ET DE L'AJOUT D'INGRÉDIENTS ALIMENTAIRES .....	43
1.3.    L'ADN MITOCHONDRIAL AU SERVICE DE L'IDENTIFICATION DES ESPÈCES ENTRANT DANS LA COMPOSITION DE PRODUITS TRANSFORMÉS .....	44
2.    IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE THON PAR PCR .....	46
2.1.    LES PRINCIPALES MÉTHODES ISSUES DE LA PCR EN POINT FINAL PERMETTANT L'IDENTIFICATION DES ESPÈCES .....	46
2.2.    LES MARQUEURS MITOCHONDRIAUX PERMETTANT L'IDENTIFICATION DES ESPÈCES .....	49
C.    MÉTHODES DE QUANTIFICATION DES ESPÈCES.....	52
1.    LA PCR QUANTITATIVE OU EN TEMPS REEL.....	52
2.    LES DIFFÉRENTES STRATÉGIES DE QUANTIFICATION.....	56
2.1.    MÉTHODE BASÉE SUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE AVEC STANDARD EXTERNE .....	56
2.2.    LA QUANTIFICATION RELATIVE.....	59
D.    CONCLUSION .....	60
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>63</b>



A.	MATIERES PREMIERES.....	65
1.	ECHANTILLONS DE TISSUS CRUS.....	65
2.	ECHANTILLONS DE TISSUS APPERTISES .....	66
B.	EXTRACTION DE L'ADN.....	68
1.	ECHANTILLONS DE TISSUS CRUS.....	68
2.	ECHANTILLONS DE TISSUS APPERTISES .....	68
3.	METHODES D'EXTRACTION DE L'ADN .....	69
C.	DOSAGE ET EVALUATION DE LA QUALITE DE L'ADN.....	70
D.	SELECTION DES AMORCES ET DES SONDAS PERMETTANT L'IDENTIFICATION DES ESPECES.....	70
E.	PCR EN POINT FINAL .....	71
F.	MIGRATION ELECTROPHORETIQUE.....	71
G.	PCR EN TEMPS REEL .....	72
H.	CONSTRUCTION DES COURBES STANDARDS DE QUANTIFICATION .....	72
I.	LES STRATEGIES DE QUANTIFICATION.....	72
1.	METHODE BASEE SUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE AVEC STANDARD EXTERNE .....	72
2.	METHODE BASEE SUR LA QUANTIFICATION RELATIVE AVEC STANDARD EXTERNE .....	73
J.	LE LOQ ET LE LOD .....	73
K.	INTER-CALIBRATION DE LA METHODE .....	73
L.	STATISTIQUES.....	74
	<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>75</b>
A.	EXTRACTION DE L'ADN.....	77
B.	ETUDE ET SELECTION DES MARQUEURS D'INTERET POUR L'IDENTIFICATION DES ESPECES DE THON .....	81
1.	RECHERCHE DES VARIATIONS INTERSPECIFIQUES ENTRE LES ESPECES DE THON ET ASSIMILEES AU THON .....	83
2.	RECHERCHE DES VARIATIONS INTRASPECIFIQUES ENTRE LES ESPECES DE THON ET ASSIMILEES AU THON.....	85
C.	OBTENTION DES COUPLES D'AMORCES/SONDE SPECIFIQUES AUX ESPECES DE L'ETUDE .....	88
D.	SELECTION DES AMORCES PAR PCR EN POINT FINAL.....	89
1.	SUR TISSU CRU .....	89
2.	SUR TISSU APPERTISE .....	90
E.	SELECTION DES AMORCES ET DES SONDAS PAR PCR EN TEMPS REEL.....	92
1.	LE THON ALBACORE .....	94
2.	LE LISTAO .....	95
3.	LE THON OBESE .....	96
4.	LES COUPLES AMORCES/SONDE UNIVERSELS .....	97
5.	SYNTHESE CONCERNANT LA SELECTION DES MARQUEURS .....	99
F.	IDENTIFICATION DES ESPECES DE THON .....	100
1.	DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D'IDENTIFICATION DES ESPECES DE THON .....	100
2.	LIMITES ET SPECIFICITES DES AMORCES ET DES SONDAS .....	102

---

3.	LES LIMITES DU COUPLE SPECIFIQUE AU THON ALBACORE .....	104
4.	LES LIMITES DU COUPLE SPECIFIQUE AU THON OBESE .....	104
5.	LES LIMITES DU COUPLE SPECIFIQUE AU LISTAO.....	105
6.	LES ESPECES MANQUANTES .....	106
7.	ETUDE DE LA SPECIFICITE SUR D'AUTRES ESPECES QUE LES SCOMBRIDES.....	106
8.	SYNTHESE CONCERNANT L'IDENTIFICATION.....	106
G.	QUANTIFICATION DES ESPECES DE THON .....	108
1.	LISTAO.....	109
2.	THONS ALBACORE ET OBESE .....	110
2.1.	METHODE BASEE SUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE AVEC STANDARD EXTERNE .....	110
2.2.	METHODE BASEE SUR LA QUANTIFICATION RELATIVE AVEC STANDARD EXTERNE .....	111
3.	SYNTHESE ET CONCLUSION CONCERNANT LA QUANTIFICATION .....	113
H.	APPLICATION AUX PRODUITS COMMERCIAUX .....	114
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>117</b>
	<b>ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>117</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>123</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>139</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>183</b>
	<b>RESUME .....</b>	<b>184</b>



# Glossaire

ADN .....	Acide désoxyribonucléique
AI .....	Thon albacore pêché dans l'océan Indien
AFLP .....	Amplified Fragment Length Polymorphism, polymorphisme de longueur ..... de fragments amplifiés
Anses .....	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, ..... de l'environnement et du travail
ARN .....	Acide ribonucléique
ARNr .....	Acide ribonucléique ribosomique
ATP .....	Adénosine-triphosphate
ATP6 .....	ATP synthase sous-unité 6
ATP8 .....	ATP synthase sous-unité 8
BET .....	Bromure d'éthidium
BLAST .....	Basic Local Alignment Search Tool
BPA .....	Biochimie des Produits Aquatiques
CITPPM .....	Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes
CMR .....	Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique
COI / COX I .....	Cytochrome oxydase sous-unité 1
COII / COX II .....	Cytochrome oxydase sous-unité 2
COIII / COX III .....	Cytochrome oxydase sous-unité 3
Cq .....	Cycle de quantification
CREDOC .....	Centre de recherche pour l'étude et l'observation des conditions de vie
Ct .....	Cycle threshold ou cycle seuil
Cyt b .....	Cytochrome b
DCP .....	Dispositif de Concentration de Poissons
D-Loop .....	Région de contrôle ou Displacement loop
dNTP .....	désoxyribonucléotides triphosphate
DO .....	Densité Optique ou absorbance
DTT .....	Dithiothréitol
E .....	Efficacité d'amplification de la PCR
EDTA .....	Éthylène diamine tétra-acétique
ELISA .....	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
FAM .....	6-carboxyfluorescéine, <i>fluorophore</i>
FAO .....	Food and Agriculture Organisation (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation ..... et l'agriculture)
FINS .....	Forensically Informative Nucleotide Sequencing
FRET .....	Fluorescence Resonance Energy Transfert
GMS .....	Grandes et Moyennes Surfaces
HRM .....	High-Resolution DNA Melt curve analysis
Idha .....	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase
IEF .....	IsoElectric Focusing (Electrophorèse en isoélectrofocalisation)
Ifremer .....	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
ITS1 .....	Internal Transcribed Spacer 1 ou espaceur intergénique transcrit 1
LA .....	Listao pêché dans l'océan Atlantique
LI .....	Listao pêché dans l'océan Indien
LOD .....	Limite de détection, Limit of Detection

LOG	Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences
LOQ	Limite de quantification, Limit of Quantification
MDD	Marque de distributeurs
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
mtDNA	mitochondrial DNA (ADN mitochondrial)
MultAlin	Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, logiciel de bio-informatique d'alignement des séquences
NaCl	Chlorure de sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NADH	Nicotinamide adénosine dinucléotide
ND1	NADH déshydrogénase sous-unité 1
ND2	NADH déshydrogénase sous-unité 2
NGS	Next Generation Sequencing (Séquençage haut-débit)
OGM	Organismes Génétiquement Modifiés
OI	Thon obèse pêché dans l'océan Indien
ONG	Organisation non gouvernementale
PAGE	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide)
pb	paires de bases
PCI	Phénol/Chlorophorme/alcool Isoamylique
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne par polymérase)
PFINV	Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues
Primer3plus	Logiciel de bio-informatique de dessin d'amorces et sondes
pH	Potentiel hydrogène
qPCR	PCR quantitative, réaction en chaîne par polymérase quantitative ou en temps réel
R <sup>2</sup>	Coefficient de corrélation
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA (amplification aléatoire d'ADN polymorphe)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorphisme de longueur de fragments de restriction)
RNAse	Ribonucléase
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (polymorphisme d'un seul nucléotide)
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism (polymorphisme de conformation du simple brin)
TAFT	Trans-Atlantic Fisheries Technology conference
Tampon TBE	Tampon TRIS borate EDTA
Tampon TE	Tampon TRIS EDTA
Tampon TENS	Tampon TRIS EDTA NaCl et SDS
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	point de fusion (melting temperature)
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
UE	Union Européenne
ULCO	Université du Littoral Côte d'Opale
UV	Ultra-violet
WEFTA	West European Fish Technologists Association
°C	Degré Celsius
mL	millilitre
nm	nanomètre
ng/μL	nanogramme par microlitre

$\mu\text{L}$ .....	microlitre ( $10^{-6}$ litre)
$\mu\text{M}$ .....	Micromolaire
v/v .....	volume/volume
$\lambda$ .....	Lambda ou longueur d'onde



# Table des illustrations

## Index des figures

Figure 1 : Positionnement de l'équipe BPA (QSA – Anses – ULCO) au sein de l'Institut Charles Violette.....	21
Figure 2 : Principales espèces de thon capturées au niveau mondial.....	29
Figure 3 : Répartition des achats de conserves en 2014.....	30
Figure 4 : Principales caractéristiques morphologiques des scombridés.....	33
Figure 5 : Relations de parenté entre différentes espèces de scombridés obtenues à partir de données morphologiques .....	34
Figure 6 : relations de parenté entre différentes espèces de scombridés obtenues à partir de données moléculaires d'un fragment de 522 pb du gène du cytochrome b suivant la méthode du « Neighbour Joining ».....	35
Figure 7 : Répartition des espèces : listao, thon obèse et thon albacore au sein de leurs zones respectives de pêche .....	36
Figure 8 : Morphologie des espèces de l'étude .....	38
Figure 9 : Dispositifs de concentration des poissons .....	39
Figure 10 : Etat du poisson après congélation et exemple de détériorations dues à la congélation.....	40
Figure 11 : Possibilités de substitutions liées à la perte des caractéristiques morphologiques externes au cours de la transformation .....	41
Figure 12 : Représentation schématique du génome mitochondrial du thon albacore.....	50
Figure 13 : Principe de la technologie TaqMan®.....	55
Figure 14 : Construction de la courbe standard et obtention des concentrations à partir de la courbe standard.....	57
Figure 15 : Protocole de préparation des conserves réalisées par PFINV.....	67
Figure 16 : Prélèvement des échantillons appertisés .....	68



Figure 17 : résultats obtenus <i>via</i> le spectrophotomètre Denovix DS-11 pour les extractions d'ADN sur le tissu appertisé en fonction du kit et de la méthode d'extraction de l'ADN.....	79
Figure 18 : Exemple de mise en évidence des variations interspécifiques du gène du cytochrome b pour l'espèce <i>K. pelamis</i> .....	84
Figure 19 : Exemple de variations intraspécifiques présentes chez <i>K. pelamis</i> pour la région non codante D-Loop ou région de contrôle .....	86
Figure 20 : Exemple de la présence de variations intraspécifiques pour l'espèce <i>Auxis rochei</i> après alignement des séquences du gène du cytochrome b.....	87
Figure 21 : Exemple de produits PCR obtenus pour les amorces testées sur le tissu appertisé .....	91
Figure 22 : Exemple de résultats du séquençage de produits PCR .....	91
Figure 23 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Talb_ND2 1, spécifiques au thon albacore .....	94
Figure 24 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Talb_COII 6 spécifique au thon albacore .....	95
Figure 25 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Kpel_COI 1 spécifiques à l'espèce listao.....	95
Figure 26 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Kpel_COII 2 spécifiques au listao .....	96
Figure 27 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Tobe_ND2 4 spécifique au thon obèse émettant de la fluorescence pour le thon albacore .....	97
Figure 28 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Tobe_ND2 5 spécifique au thon obèse .....	97
Figure 29 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan universel Univ_12S sur les 3 espèces de l'étude .....	98
Figure 30 : Quantification du listao .....	109
Figure 31 : Quantification (en pourcentage) des mélanges binaires de thons albacore et obèse suivant la méthode de quantification absolue avec standard externe .....	111

Figure 32 : Quantification (en pourcentage) du thon obèse suivant la méthode basée sur la quantification relative avec standard externe (mélange obèse/albacore) .....	112
Figure 33 : Schéma expérimental à mettre en œuvre pour identifier la présence du listao et des thons albacore et obèse et éventuellement quantifier la présence des thons albacore et obèse en mélange dans une boîte de conserves .....	113

### **Index des tableaux**

Tableau I : Importation française de conserves de thons .....	31
Tableau II : Espèces visées à l'article 2 du règlement européen n°1536/92 .....	32
Tableau III : Zones de capture et définition des différentes zones FAO.....	37
Tableau IV : Echantillonnage et mode de conservation des autres espèces de thon et assimilées au thon incluses dans l'étude .....	66
Tableau V : Techniques d'extraction de l'ADN utilisées .....	69
Tableau VI : synthèse des résultats obtenus pour les gènes nucléaires.....	83
Tableau VII : Combinaisons utilisées pour le dessin des amorces et des sondes .	88
Tableau VIII : Synthèse des couples amorces/sonde obtenus à partir des gènes mitochondriaux .....	89
Tableau IX : Séquences des ADN mitochondriaux utilisées pour le dessin des amorces et des sondes .....	93
Tableau X : Séquences des amorces et des sondes TaqMan sélectionnées pour le développement de la méthode d'identification et de quantification .....	98
Tableau XI : Résultats obtenus pour l'identification des espèces .....	101
Tableau XII : Résultats obtenus pour les tests des couples amorces/sonde sur des espèces de thon, assimilées au thon, et des espèces n'appartenant pas à la famille des Scombridae.....	103
Tableau XIII : Présentation des résultats obtenus pour les tests effectués sur les boîtes commerciales .....	115
Tableau XIV : Résultats synthétiques de l'étude des boîtes commerciales .....	116

**Index des annexes**

Annexe 1 : Présentation des caractéristiques des couples amorces/sonde ..... 141

Annexe 2 : Valorisation des travaux ..... 143

Annexe 3 : Development of a qPCR method for the identification and quantification of two closely related tuna species, bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in canned tuna..... 145

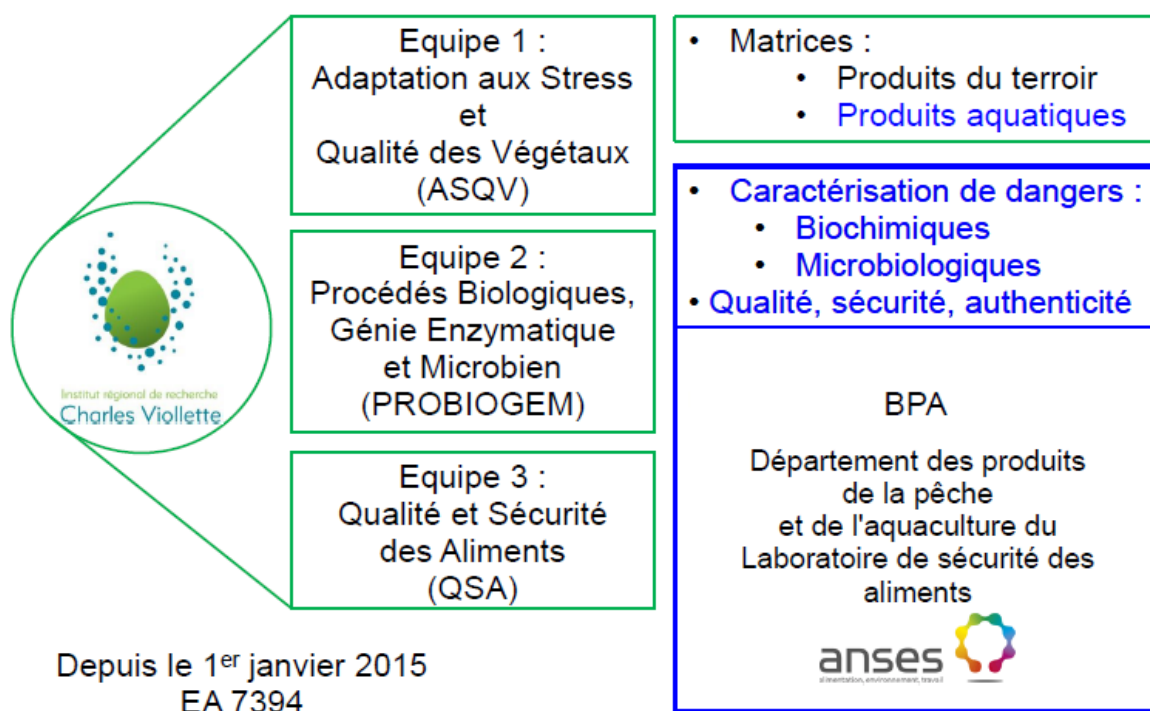
Annexe 4 : Preliminary development of a probe-based fluorescence melting analysis for quick testing of the presence of more than one scombridae fish species in canned tuna ..... 177

# Avant-propos



Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe BPA (Biochimie des Produits Aquatiques) de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) sur le site de Boulogne-sur-Mer. L'équipe BPA s'intègre au sein de l'équipe QSA (Qualité et Sécurité des aliments) du laboratoire régional de recherche en agroalimentaire, créé le 1<sup>er</sup> Janvier 2015, sous le nom de l'institut Charles VIOLLETTE (Figure 1 ci-dessous).

Boulogne-sur-Mer est le premier port de pêche de France avec 21 860 tonnes de produits de la mer vendus en halle en 2013 ([FranceAgrimer, \(2014\)](#)). De nombreuses entreprises de mareyage se sont concentrées dans la région boulonnaise. Le positionnement géographique de la ville de Boulogne-sur-Mer, à mi-chemin entre l'Europe du Nord, productrice, et l'Europe du Sud, consommatrice en fait un carrefour commercial incontournable des produits de la mer. La ville est ainsi devenue leader dans la transformation des produits de la mer en Europe.



**Figure 1 : Positionnement de l'équipe BPA (QSA – Anses – ULCO) au sein de l'Institut Charles Viollette**

Ces dernières années, de nombreux scandales alimentaires ont été rapportés en Europe tel qu'en 2013, le « Horsegate » ou la « crise de la viande de cheval ». Elle concernait des plats préparés, comme des lasagnes, où la viande de bœuf avait été remplacée frauduleusement par de la viande de cheval (<http://agriculture.gouv.fr/quel-bilan-un-apres-le-horsegate>). Outre les conséquences directes, comme la défiance des consommateurs vis-à-vis des produits transformés, ces nouveaux faits ont surtout mis en lumière les défaillances liées aux systèmes de traçabilité. Les pouvoirs politiques et législatifs ont donc réagi en durcissant la législation et en mettant en place des normes permettant d'éviter la réitération de ces problèmes, dans le dessein de prévenir les pratiques déloyales et de protéger les consommateurs. Des efforts considérables ont donc été fournis afin d'intensifier le développement d'outils permettant l'authentification des espèces dans les produits alimentaires. Parmi ces méthodes, les techniques d'identification des espèces fondées sur l'analyse de l'ADN ont connu une énorme expansion. En effet, ces techniques sont rapides, fiables et peuvent être appliquées à de nombreux domaines de la traçabilité ([Dalvit et al., \(2007\)](#), [Portetelle et al., \(2000\)](#)), comme la protection des droits (cultivars...), la certification des produits (origine, composition, pureté, présence ou absence d'OGM...), le suivi (retrouver le terroir par la microflore, valider les protocoles...), le contrôle (origine, composition, toxicité...), la caractérisation et l'identification des espèces.

Les produits d'origine halieutique ne sont pas épargnés par les fraudes. Par exemple, l'étude réalisée par l'ONG Oceana ([Warner et al., \(2013\)](#)) montre que sur le marché américain, des poissons sont fréquemment vendus dans les magasins avec un étiquetage inexact. En effet, après analyse de l'ADN, cette étude a montré qu'entre autres 84 % des échantillons de thon blanc (*Thunnus alalunga*) analysés avaient été échangés soit par des Pangasiidés (espèces de poisson appartenant aux poisson-chats), du mérrou (*Epinephelus marginatus*), de la sole (*Solea solea*), de la morue (*Gadus morhua*) ou de l'escolar (*Lepidocybium flavobrunneum*) qui est une espèce de poisson pouvant provoquer de graves troubles digestifs. Des travaux plus récents menés en France, à partir d'un échantillonnage de 371 poissons prélevés dans les grands surfaces, les

poissonniers et les restaurateurs, font état de 14 cas d'erreur d'étiquetage pour cinq espèces dont le thon rouge (*Thunnus thynnus*) et le thon albacore (*Thunnus albacares*) ([Bénard-Capelle et al., \(2015\)](#)). Enfin, [Gordoa et al., \(2017\)](#) reportent des taux de substitution très importants concernant le thon rouge (73 % des cas) provenant de poissonniers et de restaurateurs espagnols sur un échantillonnage de 375 individus de différentes espèces étudiés génétiquement.

Les produits issus de la pêche subissent de nombreuses transformations et sont retrouvés à la vente sous différentes formes (décongelées, sous atmosphère modifiée, marinées, en pulpe, fumées, séchées, salées, fermentées, panées, cuisinées, transformées en farine, en huile, en surimi, en conserve...(Panorama des industries, (2014)). Ceci facilite les actions frauduleuses, puisque les caractéristiques morphologiques externes sont perdues au cours de la transformation. Or, la législation spécifique aux conserves de thon précise que dans le but d'assurer une bonne transparence du marché et une protection correcte du consommateur quant au contenu des récipients qu'il est interdit de réaliser un mélange d'espèces de thon différentes dans un même conserve de thon ([Règlement CE 1536, \(1992\)](#)) .

En France, le marché de la conserve de thon représente plus de 50 % des volumes d'achat de produits aquatiques ([FranceAgrimer, \(2016\)](#)). La maîtrise des approvisionnements est une problématique à laquelle sont confrontés les conserveurs de thon et connaître les espèces constitutives des lots de matières premières en est un élément majeur. Or, cette maîtrise se heurte à deux difficultés :

- la première correspond à une **substitution involontaire** des espèces, pouvant conduire au mélange involontaire des espèces. Ce type de substitution peut être lié à l'utilisation d'outils communs pour la fabrication de conserves (issues de différentes espèces de thon), et/ou être la conséquence d'erreurs d'identification entre les espèces morphologiquement très proches
- la seconde correspond à une **substitution volontaire** des espèces, où le remplacement d'une espèce par une autre est frauduleux, dans le but de réaliser un avantage économique.



Face à cette problématique, le projet IDThon a été développé : « Identification et quantification des espèces de thon dans les produits appertisés », financé par le FUI (Fonds Unique Interministériel) et porté par la CITPPM (Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes) qui a apporté son appui pour la coordination avec les professionnels (définition des produits à tester, fourniture de matières premières...), a participé à l'organisation des comités de pilotage ainsi qu'à la rédaction des documents et la diffusion des résultats. Différents partenaires ont été associés dans ce projet IDThon.

**L'entreprise de Recherche et de développement PHYLOGENE** est spécialisée dans l'identification (individus, espèces, variétés...). Dans le cadre du projet IDThon, elle a participé au développement de méthodes d'identification et de quantification des espèces de thon par LC-MS/MS (Chromatographie liquide-Spectrométrie de masse de type triple quadripôle) dans le but de séparer les molécules et plus particulièrement les protéines suivant leur taille et leur polarité afin de discriminer des espèces de thon du projet IDThon.

**L'équipe de recherche de l'Université d'Artois IFAA** (Ingénierie de Formulation des Aliments et Altérations) est issue du rapprochement de l'Université d'Artois et du centre technique de ressources technologiques pour les entreprises agroalimentaires ADRIANOR. L'équipe IFAA a participé au projet IDThon en déployant une méthode d'authentification des espèces de thon *via* la technique de la spectroscopie de fluorescence frontale. Cette équipe fait aussi partie de l'institut Charles VIOLLETTE.

**La Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues (PFINV)** est spécialisée dans le contrôle analytique et la valorisation des produits aquatiques ainsi que dans le développement aquacole. PFINV a contribué au projet en tant que soutien technique et technologique pour la collecte des échantillons, la préparation des conserves et leur distribution à l'ensemble des partenaires du projet IDThon. L'ensemble de ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Bruno LE FUR. PFINV a également participé au financement de la thèse à hauteur de 50%. L'autre moitié a été financée par la Région Hauts-de-France.

**L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer)** est l'un des instituts de recherche marine intégrée ayant la plus large gamme de

compétences et d'expertises à travers le monde. Le laboratoire d'Ecosystèmes Microbiens et Molécules Marines pour les Biotechnologies (EM<sup>3</sup>B) de l'Ifremer de Nantes a développé une expertise en matière d'authenticité des espèces marines. Leur expérience dans ce domaine fait de l'Ifremer de Nantes, un partenaire privilégié. La codirection de la thèse a été assurée par Madame Véronique VERREZ-BAGNIS, chercheur dans ce laboratoire.

**L'équipe BPA (QSA – ULCO)** s'est positionnée au sein du projet IDThon avec ces travaux de thèse codirigés par Madame Urania CHRISTAKI, Professeur au Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG), unité mixte de recherche associant le CNRS, l'Université de Lille et l'ULCO, portant sur le développement de méthodes d'identification et de quantification d'espèce de thons présentes dans les conserves *via* des techniques de biologie moléculaire et plus particulièrement les techniques de PCR en temps réel. Dans le cadre de ce travail de thèse, des méthodes faisant appel à la PCR quantitative ont été développées afin d'identifier et de quantifier les espèces *Thunnus obesus* (thon obèse), *Thunnus albacares* (thon albacore) et *Katsuwonus pelamis* (listao) qui sont les espèces les plus utilisées pour la fabrication de conserves.

L'innovation majeure de ce travail a consisté à mettre au point une méthode permettant de **quantifier** la présence de ces espèces afin de distinguer les substitutions involontaires et les substitutions volontaires.



# Etude bibliographique

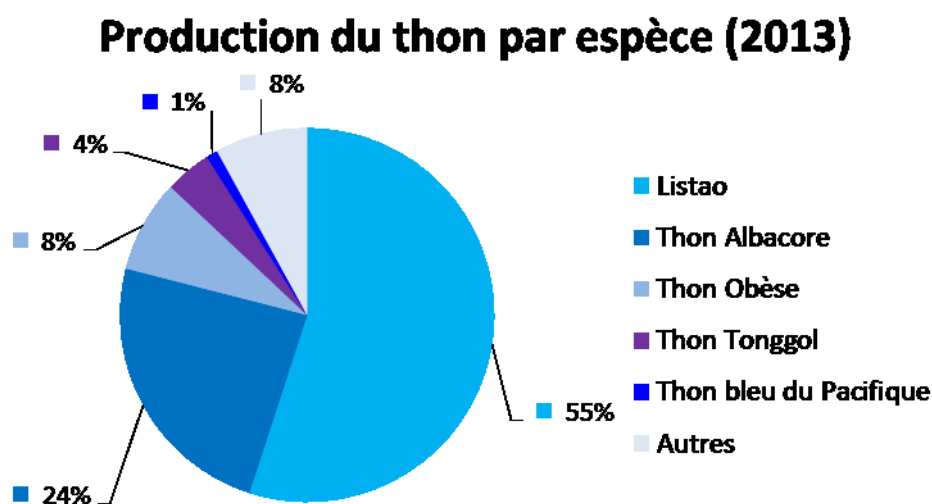


## A. Généralités

### 1. Importance du marché du thon et de la conserve de thon

Les thons et les espèces apparentées représentent la plus grosse part des espèces de poisson pêchées en haute mer, avec un total des captures de plus de 7 millions de tonnes en 2012. Le listao (*Katsuwonus pelamis*) est la troisième espèce de poisson la plus pêchée avec près de 2,79 millions de tonnes, après l'anchois du Pérou (*Engraulis ringens*) (4,69 millions de tonnes) et le lieu d'Alaska (*Gadus chalcogrammus*) (3,27 millions de tonnes). Le thon albacore (*Thunnus albacares*), quant à lui, constitue la huitième espèce la plus pêchée au monde en 2012 avec 1,35 million de tonnes (FAO, (2014)).

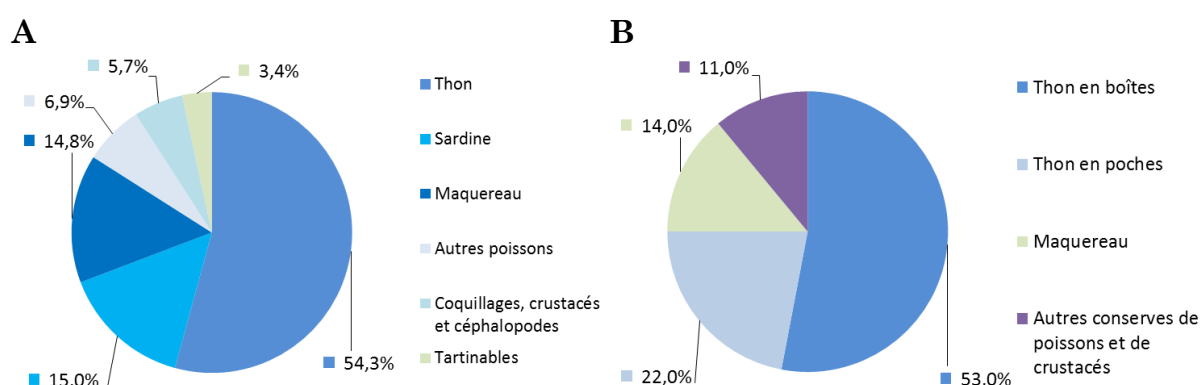
En 2014, la répartition des captures de thon (par rapport au montant total des captures) était de 55 % pour le listao (skipjack tuna), 24 % pour le thon albacore et 8 % pour le thon obèse (Figure 2 ci-dessous), montrant ainsi l'importance de ces trois espèces dans la production mondiale.



**Figure 2 : Principales espèces de thon capturées au niveau mondial (source : FAO, (2014))**

Exception faite du thon rouge (*Thunnus thynnus*), qui est vendu uniquement en frais et dont la valeur commerciale peut aller jusqu'à 605 000 euros pour un thon de 220 kg en 2017, sur le marché international, le thon est commercialisé sous 3 formes principales : frais pour la consommation (sous forme de sashimi, de sushi...), congelé sous forme de longes et en conserve (FranceAgrimer, (2011)).

En France, selon les enquêtes de [FranceAgrimer, \(2015\)](#) portant sur la consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture en 2014, le thon représente le plus important volume de vente de poisson en conserve, soit 54,3 % (ou 71 435 tonnes en 2014) des valeurs d'achat de produits aquatiques en conserves par les ménages français et 53 % des volumes achetés pour la restauration hors foyer (Figure 3 ci-dessous). Parmi les différents types de conserves de thon achetées par les ménages, 56,4 % étaient au naturel, 19,4 % sous forme de miettes, 15,3 % sous forme de salades et autres préparations, 4,6 % de conserves à l'huile et 4,3 % de conserves en sauce ([FranceAgrimer, \(2012\)](#)).



**Figure 3 : Répartition des achats de conserves en 2014**

**A. Répartition des achats de conserves par les ménages Français en 2014 (source : [FranceAgrimer, \(2015\)](#)) ; B. Répartition des achats de conserves en restauration hors foyer (source : [FranceAgrimer, \(2015\)](#))**

Dans l'étude intitulée « Le marché français du thon en conserve », Romain [Chabrol, \(2014\)](#) précise les différentes spécificités du marché du thon qui se divise entre les producteurs et les transformateurs : les pays producteurs (Taiwan, Indonésie, France...) exportent le thon congelé vers les pays transformateurs (Thaïlande, Seychelles, Côte d'Ivoire...), tandis que les pays transformateurs importent des matières premières congelées et exportent les conserves. La pêche du thon approvisionne en premier lieu l'industrie de la conserve, induisant une pêche plus importante des espèces dédiées pour les produits appertisés. Cinq espèces principales sont utilisées par l'industrie mondiale du thon appertisé. Il s'agit du listao, représentant environ 58 % du total des captures mondiales des espèces de Scombridae en 2011, du thon albacore

correspondant à 26 % du total des captures, du thon obèse représentant 7 % du total des captures, du thon germon ou thon blanc (*Thunnus alalunga*) cumulant 6 % du total des captures et du thon tonggol (*Thunnus tonggol*) représentant 2 à 3 % du total des captures.

Le marché de la conserve de thon représente un marché économiquement important aux niveaux mondial et national faisant intervenir différents acteurs (pêcheurs, fournisseurs, transformateurs, conserveurs, vendeurs, acheteurs...). De ce fait, la notion de traçabilité est déterminante, d'autant que la plupart des conserves consommées en France sont majoritairement fabriquées à l'étranger et que la France est une importante importatrice de conserves de thon. Les importations proviennent principalement d'Espagne, des Seychelles et de la Côte d'Ivoire (Tableau I ci-dessous). C'est pourquoi, dans le but d'informer le consommateur et de protéger les différents acteurs interagissant au sein du marché de la conserve de thon, les espèces de thon utilisées pour la fabrication de produits appertisés répondent aux réglementations et aux normes appliquées aux produits de la mer ([Codex alimentarius \(1981 ; 1995\)](#) ; [Codex alimentarius \(1985 ; 1991\)](#) ; [Règlement CE 104, \(2000\)](#), [Règlement CE 2065, \(2001\)](#)). Les espèces employées pour la fabrication de conserves de thon doivent supporter le procédé de l'appertisation et doivent également être abondantes avec des prix compatibles à la demande industrielle.

**Tableau I : Importation française de conserves de thons**

(source : direction nationale des statistiques du commerce extérieur : DNSCE)

Pays importateur	Millions de tonnes par année					
	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Côte d'Ivoire	10,0	6,1	10,8	12,9	6,4	9,5
Equateur	6,6	7,4	5,8	7,6	5,3	5,3
Espagne	11,3	17,5	9,3	10,9	13,8	14,5
Ghana	3,8	4,3	3,0	2,2	3,9	4,3
Ile Maurice	0,8	1,1	2,2	2,7	4,1	2,5
Madagascar	1,7	5,0	3,7	3,3	2,6	1,3
Seychelles	6,5	9,5	12,0	12,5	11,4	10,4
Thaïlande	4,6	5,2	2,9	4,4	3,5	2,4
Autres	4,8	3,6	2,5	3,3	3,8	4,2
Totaux	50,1	59,7	52,2	59,8	54,8	54,4



De plus, l'étiquetage doit mentionner le mode de présentation (entier, miettes...), le milieu de couverture et le nom de l'espèce. Les espèces autorisées sous la dénomination de « thon », sont les espèces appartenant au genre *Thunnus*. Une exception est faite pour le listao ou bonite à ventre rayé (*Katsuwonus pelamis*), qui, même s'il fait partie du genre *Katsuwonus*, peut être étiqueté sous la dénomination de « thon » (Tableau II ci-dessous).

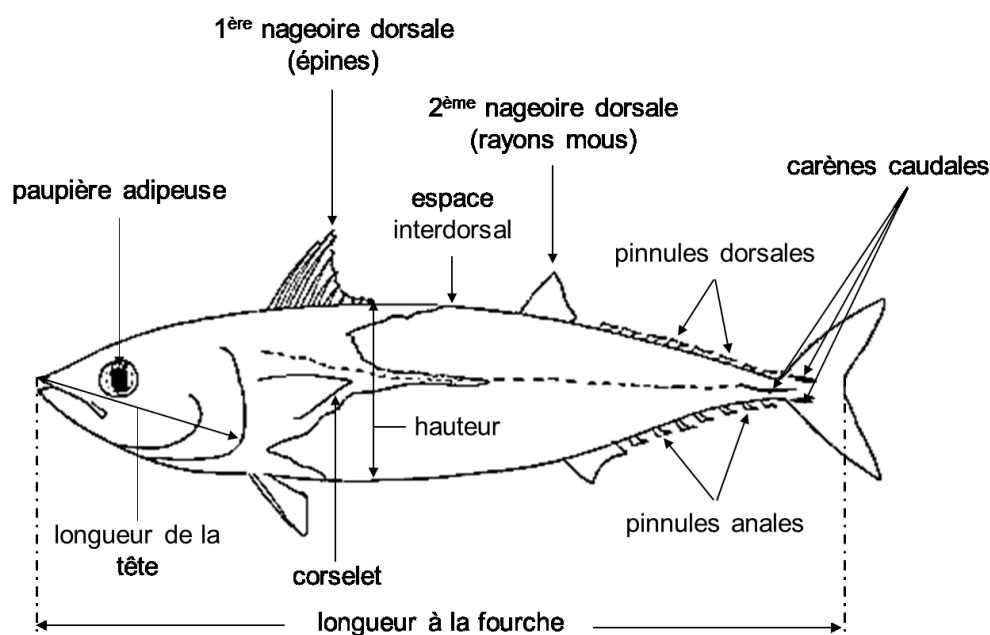
**Tableau II : Espèces visées à l'article 2 du règlement européen n°1536/92**

(sources : [Règlement CE 1536, \(1992\)](#)) ; FAO ([www.fao.org](http://www.fao.org)) ; fisbase (<http://www.fishbase.org/>) et Eschmeyer's catalog of fishes (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>))

Nom vernaculaire français	Nom vernaculaire anglais	Nom latin	Source
<b>Thon</b>			
<b>Espèces du genre <i>Thunnus</i></b>			
Thon blanc ou germon	<a href="#">Albacore tuna</a>	<i>Thunnus alalunga</i>	Bonnaterre, 1788
Thon à nageoires jaunes ou albacore	<a href="#">Yellowfin tuna</a>	<i>Thunnus albacares</i>	Bonnaterre, 1788
Thon rouge ou thon rouge de l'Atlantique	<a href="#">Atlantic bluefin tuna</a>	<i>Thunnus thynnus</i>	Linnaeus, 1758
Thon patudo ou obèse	<a href="#">Bigeye tuna</a>	<i>Thunnus obesus</i>	Lowe, 1839
Autres espèces du genre <i>Thunnus</i>		<i>Thunnus spp</i>	
<b>Listao ou bonite à ventre rayé</b>	<a href="#">Skipjack tuna</a>	<i>Katsuwonus pelamis</i>	Linnaeus, 1758
<b>Bonite</b>			
<b>Espèces du genre <i>Sarda</i></b>			
Bonite à dos rayé	<a href="#">Atlantic bonito</a>	<i>Sarda sarda</i>	<i>Bloch, 1793</i>
Bonite du Pacifique oriental	<a href="#">Eastern Pacific bonito</a>	<i>Sarda chiliensis</i>	<i>Cuvier, 1832</i>
Bonite de l'océan Indien	<a href="#">Oriental tuna ou Bonito</a>	<i>Sarda orientalis</i>	<i>Temminck &amp; Schlegel, 1844</i>
Autres espèces du genre <i>Sarda</i>		<i>Sarda spp</i>	
<b>Espèces du genre <i>Euthynnus</i>, à l'exception de l'espèce <i>Katsuwonus pelamis</i></b>			
Thonine commune	<a href="#">Little tunny</a>	<i>Euthynnus alleteratus</i>	Rafinesque, 1810
Thonine orientale	<a href="#">Kawakawa</a>	<i>Euthynnus affinis</i>	Cantor, 1849
Thonine noire	<a href="#">Black skipjack</a>	<i>Euthynnus lineatus</i>	Kishinouye, 1920
Autres espèces du genre <i>Euthynnus</i>		<i>Euthynnus spp</i>	
<b>Espèces du genre <i>Auxis</i></b>			
Melva ou Auxide	<a href="#">Frigate tuna</a>	<i>Auxis thazard</i>	Lacepède, 1800
Bonitou	<a href="#">Bullet tuna</a>	<i>Auxis rochei</i>	Risso, 1810

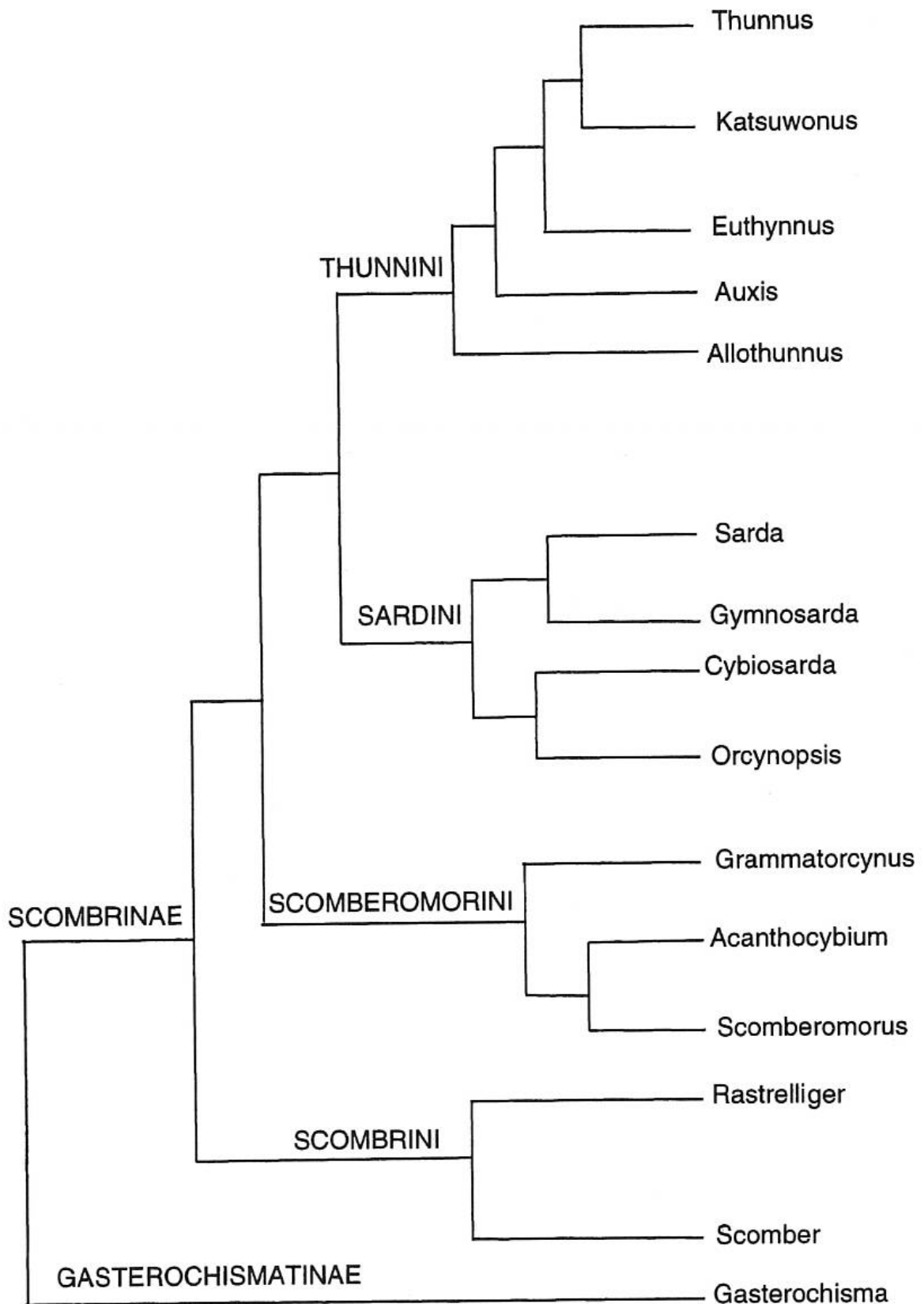
Le règlement (CEE) n° 1536/92 du Conseil, du 9 juin 1992 ([Règlement CE 1536, \(1992\)](#)), fixant les normes communes de commercialisation pour les conserves de thon et de bonite précise l'interdiction de réaliser un mélange d'espèces de

poisson différentes dans une même boîte de conserve. Ce dernier point accentue l'intérêt et l'importance du développement de méthodes d'identification et de quantification des espèces de thon qui font partie de la famille des Scombridés (Scombridae (Rafinesque, 1815)). Les Scombridés possèdent des caractéristiques morphologiques communes : un corps allongé et fusiforme, deux nageoires dorsales, une série de pinnules au niveau de la partie postérieure du corps, des nageoires pectorales insérées en position haute, des écailles cycloïdes minuscules et un fin pédoncule caudal orné de carènes latérales. La nageoire caudale est fortement divisée et rigide avec une base striée mince (Figure 4 ci-dessous).



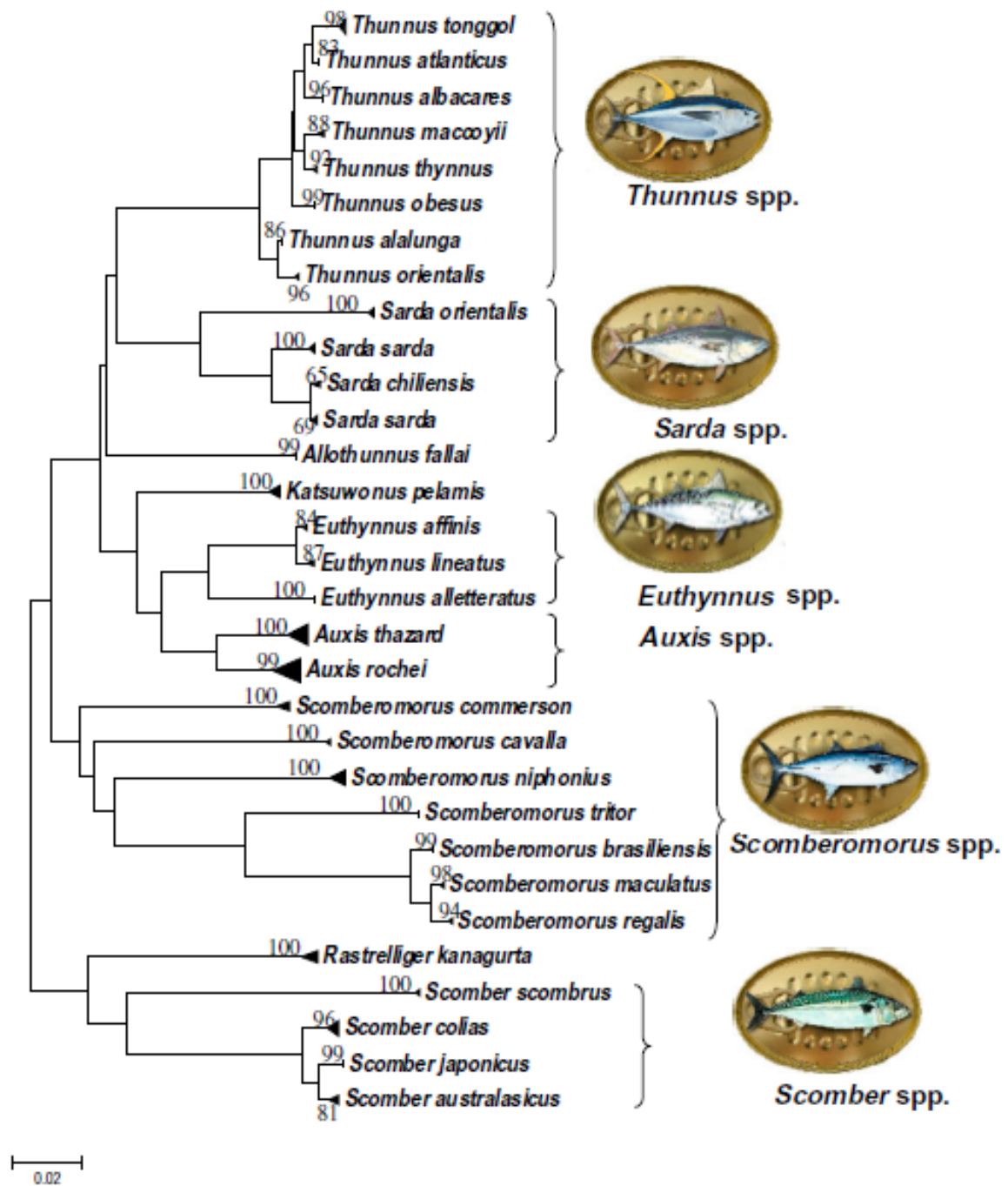
**Figure 4 : Principales caractéristiques morphologiques des scombridés**  
(source : <http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/y0870e/y0870e36.pdf>)

Cette famille se compose de 54 espèces classées dans 15 genres et deux sous-familles (<http://www.fishbase.org/> ; Froese et Pauly, (2000)). Il existe huit espèces de thons « vrais » appartenant au genre *Thunnus* (Collette et Nauen, (1983) ; Collette *et al.*, (2001)). Les études phylogénétiques réalisées pour les scombridés et les *Thunnus* ont permis de montrer la parenté et la proximité génétique existantes entre les espèces de thon et apparentées au thon (Chow et Kishino, (1995) ; Quinteiro *et al.*, (1998) ; Terol *et al.*, (2002) ; Espiñeira *et al.*, (2009a) ; Espiñeira *et al.*, (2009b) ; Viñas et Tudela, (2009) ; Abdullah et Rehbein, (2015b)) (Figure 6 page 35). De ce fait, la réalisation de substitutions volontaires et/ou involontaires peut être facilitée.



**Figure 5 : Relations de parenté entre différentes espèces de scombridés obtenues à partir de données morphologiques**

(source : [Collette et al., \(2001\)](#))



**Figure 6 :** relations de parenté entre différentes espèces de scombridés obtenues à partir de données moléculaires d'un fragment de 522 pb du gène du cytochrome b suivant la méthode du « Neighbour Joining » (source : [Espíñeira et al., \(2009a\)](#))

Les espèces de thon sont réparties suivant différentes zones géographiques. Le listao, le thon obèse et le thon albacore se répartissent principalement dans l'océan Pacifique, Atlantique et Indien (Figure 7 page 36).

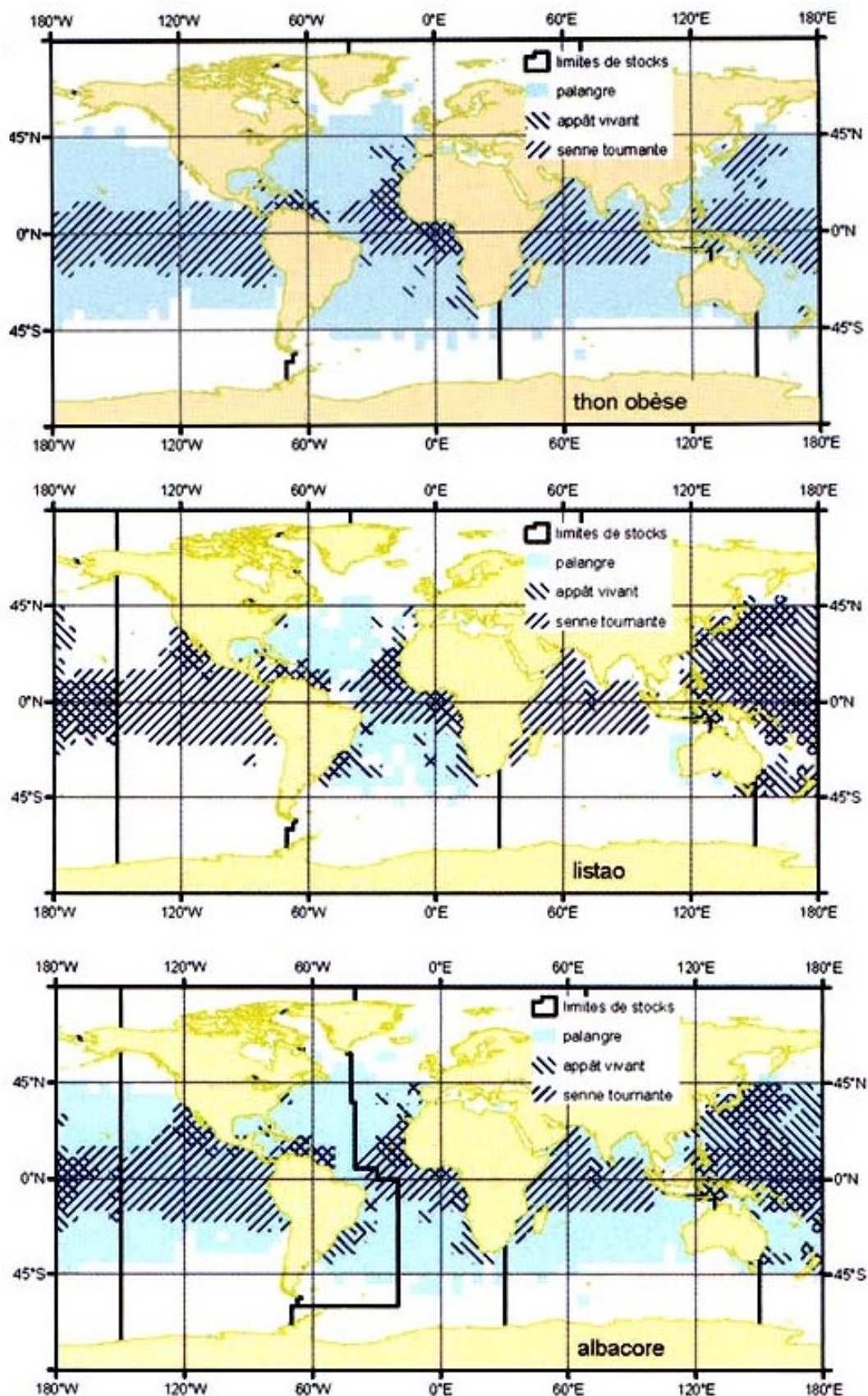


Figure 7 : Répartition des espèces : listao, thon obèse et thon albacore au sein de leurs zones respectives de pêche

(source : <http://www.fao.org/docrep/009/y5852f/Y5852F10.htm>)

Le Règlement (CE) n°2065/2001 de la Commission du 22 octobre 2001, établissant les modalités d'application du règlement (CE) n°104/2000 en ce qui concerne l'information du consommateur dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture précise les modalités de l'information du consommateur, en particulier en ce qui concerne la dénomination commerciale de l'espèce, la méthode de production et la zone de capture (Tableau III page 37).

**Tableau III : Zones de capture et définition des différentes zones FAO**

Zones de capture	Définition de la zone <sup>(1)</sup>
Atlantique Nord-Ouest	Zone FAO n° 21
Atlantique Nord-Est <sup>(2)</sup>	Zone FAO n° 27
Mer Baltique	Zone FAO n° 27.
Atlantique Centre-Ouest	Zone FAO n° 31
Atlantique Centre-Est	Zone FAO n° 34
Atlantique Sud-Ouest	Zone FAO n° 41
Atlantique Sud-Est	Zone FAO n° 47
Mer Méditerranée	Zone FAO n°s 37.1, 37.2 et 37.3
Mer Noire	Zone FAO n° 37.4
Océan Indien	Zones FAO n°s 51 et 57
Océan Pacifique	Zones FAO n°s 61, 67, 71, 77, 81 et 87
Antarctique	Zones FAO n°s 48, 58 et 88

(1) Annuaire FAO. Statistique des pêches. Captures. Vol. 86/1. 2000.

(2) Sauf Mer Baltique

Dans la partie suivante, seront présentés les différents types de substitutions pouvant être opérées pour les espèces de thon.

## **2. Les substitutions volontaires et involontaires**

### **2.1. Substitutions entre les espèces morphologiquement proches**

Il est possible de différencier deux espèces de thon entre elles grâce aux outils d'identification basés sur la classification, tels que les clés d'identification ([Nakamura et Séret, \(2002\)](#)). Par exemple, le listao se distingue clairement des espèces de thon, car il possède des rayures ventrales spécifiques à cette espèce (Figure 8 page 38). Par contre, il est beaucoup plus aisé de confondre les espèces albacore et obèse puisqu'elles appartiennent au genre *Thunnus*. Elles possèdent

des caractéristiques extrêmement proches, surtout au stade juvénile (Figure 8 page 38) ([Nakamura et Séret, \(2002\)](#) ; [Pedrosa-Gerasmio et al., \(2012\)](#)).



**Figure 8 : Morphologie des espèces de l'étude**

**A. morphologie du listao ; B. morphologie du thon albacore ; C. morphologie du thon obèse**

(sources : ICCAT (Commission internationale pour la conservation des thonidés de l'Atlantique) ; planches : FAO ; crédits photographiques : <https://www.vetofish.com/>).

Ces différences morphologiques très légères peuvent être à l'origine de confusions entre ces deux espèces : le thon obèse peut être identifié comme étant du thon albacore et *vice-versa*. Ces deux espèces peuvent donc être à l'origine de substitutions involontaires et/ou volontaires.

## **2.2. Substitutions liées aux techniques de pêche**

Même si des techniques de pêche traditionnelle perdurent, elles ont été majoritairement remplacées par des techniques de pêche à la senne coulissante moins sélectives (<http://www.ifremer.fr/peche/Le-monde-de-la-peche/La-peche/comment/Les-engins/Sennes>). Concernant le thon, la technologie de pêche à la senne est généralement couplée à l'utilisation d'objets flottants appelés DCP (dispositifs concentrateurs de poissons ; Figure 9 page 39) pratique qui consiste à attirer les poissons au préalable ce qui accroît et concentre les espèces de thon

sans distinction entre les adultes et les juvéniles des espèces listao, albacore, obèse, ou apparentées aux thons ([Amandè et al., \(2010\)](#)). La conséquence est la capture simultanée de thons adultes et juvéniles ([Miyake, \(2010\)](#)).



**A** : Surface d'un DCP ressemblant à un simple radeau en bambou équipé d'une balise radio

**B** : Partie immergée d'un DCP dérivant

**C** : Concentration dense de thons albacore sous un DCP dérivant

**Figure 9 : Dispositifs de concentration des poissons**

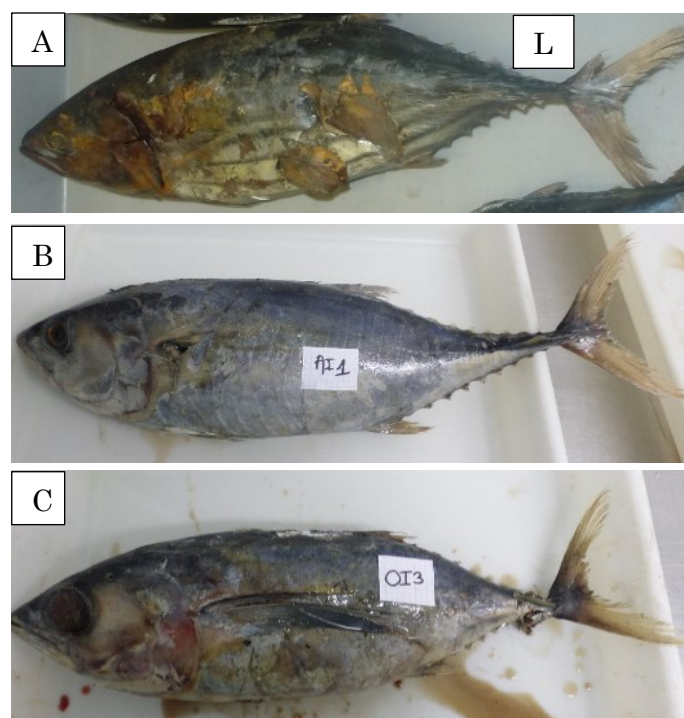
Crédits photographiques : Marc TAQUET, FADIO/IRD-Ifremer ; (source : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00115/22657/20383.pdf> ; [Taquet et al., \(2011\)](#))

C'est d'ailleurs ce qui a constitué le point de départ de la crise déclenchée par Greenpeace, en octobre 2014, vis-à-vis de l'entreprise MWBrands, détentrice de la marque « Petit Navire ». Greenpeace, sur la base d'analyses moléculaires effectuées au sein du laboratoire espagnol AZTI Tecnalia, a reproché à cet industriel thonier d'utiliser cette technique de pêche à l'origine de mélanges entre du thon albacore et du thon obèse au sein des boîtes de conserve (<http://oceans.greenpeace.fr/petit-navire-gros-degats>). Ce contexte de crise a eu un impact très important sur le déroulement de ce programme de recherches. Cela a ostensiblement conditionné les travaux menés en se focalisant sur la différenciation entre le thon albacore et le thon obèse. Il est à noter que pour certains industriels, le tri ne paraît pas nécessaire pour les espèces dont les petits spécimens (difficiles à différencier) se vendent à la même valeur, comme l'albacore et l'obèse ([Satoh et al., \(2010\)](#)).

### **2.3. Substitutions liées à la conservation avant transformation**

Pour des raisons de conservation, les poissons destinés à l'industrie de la conserverie sont livrés congelés. Or, la congélation entraîne une déformation du poisson, sa décoloration et la détérioration de sa peau, de ses nageoires, ce qui complexifie l'identification des espèces (Figure 10 page 40).





**Figure 10 : Etat du poisson après congélation et exemple de détériorations dues à la congélation**

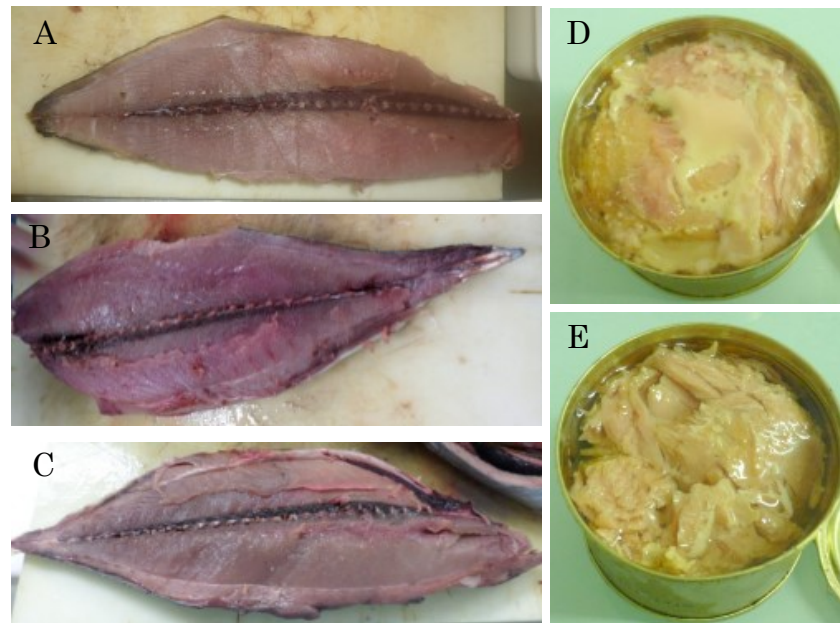
A. listao originaire de l’océan Indien (LI) avec absence de nageoire pectorale, une détérioration et un décollement de la peau ; B. thon albacore originaire de l’océan Indien (AI 1) avec une absence d’une nageoire pectorale et une altération de la couleur jaune sur la partie ventrale ; C. thon obèse originaire de l’océan Indien (OI 3) avec une absence de nageoire dorsale et une absence de globe oculaire (crédits photographiques : PFINV).

Les espèces relativement proches peuvent être mal identifiées lorsque le tri s’effectue après la congélation et des erreurs d’identification peuvent être réalisées si les caractéristiques morphologiques externes sont très détériorées.

#### **2.4. Substitutions liées à la perte des caractéristiques morphologiques externes lors de la transformation**

La transformation du poisson en filet induit une perte des caractéristiques morphologiques externes favorisant par la suite des substitutions volontaires ou involontaires entre les espèces (Figure 11 page 41).

En outre, l’application de processus industriels comme l’appertisation a pour conséquence de rendre difficile, voire impossible la reconnaissance des espèces. En effet, la chair après cuisson est d’apparence similaire pour la plupart des espèces de thon, ce qui peut favoriser les substitutions (Figure 11 page 41). C’est pourquoi le développement d’outils d’identification et de quantification des espèces de thon est nécessaire.



**Figure 11: Possibilités de substitutions liées à la perte des caractéristiques morphologiques externes au cours de la transformation**  
 A. filet de listao ; B. filet d'albacore, C : filet de thon obèse ; D. conserve de thon albacore ; E. conserve de thon obèse (crédits photographiques : PFINV)

### 2.5. Le seuil de différenciation entre les substitutions pour un lot

Pour un lot de conserves dont l'identification des espèces en présence est vérifiée pour un certain nombre de boîtes, une substitution involontaire aura pour résultat un pourcentage de substitution de l'espèce élevé, mais pour un nombre restreint de boîtes d'un même lot. A l'inverse, concernant les substitutions volontaires, le pourcentage de substitution sera élevé dans toutes les boîtes produites pour un même lot.

Un seuil limite de mélange de deux espèces a été appliqué dans le cadre du projet IDThon afin de distinguer les lots contenant des substitutions volontaires de lots contenant des substitutions involontaires. En d'autres termes, au-dessous de ce seuil, il s'agit de substitutions fortuites, tandis qu'au-dessus de celui-ci, il s'agit de substitutions frauduleuses. Après consultation des professionnels, ce seuil a été fixé à 1 % par les industriels du projet.

## **B. Les méthodes d'identification des espèces de thon**

### **1. Identification des espèces basées sur les protéines et étude de l'impact de l'appertisation**

#### **1.1. Les méthodes utilisant les protéines**

Les premières méthodes d'identification des espèces de poisson et de thon ont été développées en se basant sur la composition en protéines. Il s'agit de techniques d'électrophorèses de type IEF (IsoElectric Focusing ou Isoélectrofocalisation) et/ou PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) ([Etienne et al., \(2001\)](#), [Etienne et al., \(2000\)](#), [Etienne et al., \(1999\)](#), [Mackie, \(1996\)](#), [Rehbein, \(1990\)](#), [Rehbein et al., \(2000\)](#), [Pepe et al., \(2012\)](#)). D'autres méthodes ont été développées en se basant sur l'étude des allozymes ([Ward et al., \(1995\)](#)), sur l'immunologie ([Mackie, \(1996\)](#)), [Asensio et al., \(2008\)](#), [Chen et Hsieh, \(2014\)](#)), et également sur la composition en acides gras ([Gribbestad et al., \(2005\)](#), [Molkentin et al., \(2015\)](#), [Medina et al., \(1997\)](#)).

Toutefois la méthode IEF, qui permet d'obtenir des profils électrophorétiques spécifiques à l'espèce, a été la plus utilisée. Cette méthode comparative permet d'authentifier l'espèce en comparant les profils IEF obtenus, avec des profils IEF de référence de différentes espèces de poisson répertoriés dans des bases de données, comme celles de la FDA (Food and Drug Administration). [Smith et al., \(1994\)](#) ont démontré que la méthode IEF permet de différencier l'espèce de thon *T. obesus* des espèces de thon *T. maccoyii* et *T. thynnus*. Cependant, cette méthode n'est pas appropriée pour différencier toutes les espèces de thon et plus particulièrement, les espèces très proches comme *T. maccoyii* et *T. thynnus* (Figure 6 page 35). Les espèces de thon très proches ayant un degré de similarité important dans leurs séquences protéiques empêchent leurs identification par IEF ([Abdullah et Rehbein, \(2015a\)](#)). [Smith et al., \(1994\)](#) sont tout de même parvenus à différencier ces espèces en réalisant une étude supplémentaire des variations existantes chez les enzymes G3PDH (Glycérol-3-phosphate déshydrogénase) et malate déshydrogénase (MDH). De même, [Pepe et al., \(2010\)](#) ont associé la technique IEF à la spectrométrie pour discriminer les espèces de thon *T. thynnus*, *T. albacares* et *T. alalunga*. En effet, des gels à 2 dimensions ont été effectués (première séparation des protéines par IEF, suivie par une seconde

séparation des protéines par SDS-PAGE), puis les protéines ont été analysées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Cependant, même si, cette approche a permis d'authentifier les trois espèces de thon *T. thynnus*, *T. albacares* et *T. alalunga*, cela n'a été possible qu'à partir de la chair crue.

Les méthodes utilisant les protéines peuvent être applicables à certains produits chauffés, mais ne peuvent pas être appliquées aux produits très transformés comme les produits en conserve et plus particulièrement pour le thon ([Etienne et al., \(2000\)](#), [Mackie et al., \(1999\)](#)). En effet, les températures appliquées pour la stérilisation ont pour effet de dénaturer les protéines.

L'ADN étant plus résistant que les protéines aux procédés de transformation, comme la cuisson, les méthodes basées sur l'analyse de l'ADN sont plus adaptées aux produits très transformés ([Dalvit et al., \(2007\)](#), [Mackie et al., \(1999\)](#)). Néanmoins, même si l'ADN est plus résistant que les protéines aux hautes températures, l'appertisation conduit tout de même à sa dégradation. En effet, [Quinteiro et al., \(1998\)](#) ont démontré l'impact de l'appertisation sur l'ADN en réalisant un gel de contrôle des extraits d'ADN. L'analyse de la taille des acides nucléiques contenus dans les extraits, issus des mêmes espèces de thon à la fois sur tissus crus et sur tissus appertisés, a montré que la taille des fragments variait de moins de 100 à 200 pb pour les tissus appertisés, tandis que les échantillons congelés donnaient des fragments de longueur variable de 20 000 à 100 000 pb.

### **1.2. Effet de l'appertisation et de l'ajout d'ingrédients alimentaires**

L'appertisation engendre des fragments d'ADN de petite taille, généralement compris entre des tailles inférieures à 100 pb jusqu'à 360 pb pour les produits appertisés. Il est donc nécessaire d'adapter les couples d'amorces, permettant l'obtention de fragments inférieurs ou autour de 200 pb ([Unsel et al., \(1995\)](#) ; [Ram et al., \(1996\)](#) ; [Quinteiro et al., \(1998\)](#) ; [Pardo et Pérez-Villareal, \(2004\)](#) ; [Tanaka et al., \(2006\)](#) ; [Chapela et al., \(2007\)](#) ; [Lin et Hwang, \(2007\)](#)).

Une autre caractéristique des produits alimentaires appertisés est l'ajout d'ingrédients utilisés au cours de la préparation des conserves. Ces ingrédients entrent dans la composition de la recette et/ou permettent la conservation des produits. Il s'agit notamment des milieux de couvertures tels que l'huile, la

saumure, les sauces, les épices, les texturants, les cryoprotecteurs, les arômes, les colorants ou encore les conservateurs ([Codex alimentarius \(1981 ; 1995\)](#)). Or, l'ajout d'ingrédients peut augmenter la dégradation de l'ADN et ces mêmes ingrédients peuvent également, lors d'analyses ultérieures, inhiber la réaction de la PCR. De ce fait, l'identification des espèces est d'autant plus complexe pour les produits appertisés. [Ram et al., \(1996\)](#) ont émis l'hypothèse que l'accumulation d'ingrédients serait, dans certains cas, intentionnellement utilisée pour empêcher ultérieurement l'authentification des espèces par les laboratoires de contrôle.

La qualité et la quantité des ADN extraits varient selon la composition et la nature des ingrédients (plus ou moins acides ou basiques) ([Bauer et al., \(2003\)](#), [Michelini et al., \(2007\)](#), [Ram et al., \(1996\)](#), [Unselde et al., \(1995\)](#)). Par exemple, le vinaigre étant acide avec un pH bas, induit une dégradation de l'ADN plus importante, tandis que l'huile est le milieu de couverture pour lequel la dégradation de l'ADN est la moins importante ([Chapela et al., \(2007\)](#), [Ram et al., \(1996\)](#)). La dégradation de l'ADN implique l'obtention de faibles quantités d'ADN extraits, de mauvaise qualité, quelle que soit la méthode d'extraction d'ADN et quels que soient les milieux de couverture ([Chapela et al., \(2007\)](#)).

Dès lors, les produits en conserve ont besoin de prétraitements avant l'extraction de l'ADN. Le but est de « nettoyer » les échantillons du milieu de couverture et des ingrédients. Les prétraitements appliqués sont le trempage des échantillons durant une nuit dans un bain contenant un mélange de chloroforme/méthanol/eau ([Unselde et al., \(1995\)](#) ; [Pardo et Pérez-Villareal, \(2004\)](#)), ou le séchage au papier-filtre qualitatif, puis un lavage à l'éthanol et/ou l'eau ([Jérôme et al., \(2003b\)](#), [Terio et al., \(2010\)](#)).

### **1.3. L'ADN mitochondrial au service de l'identification des espèces entrant dans la composition de produits transformés**

L'ADN des eucaryotes est essentiellement contenu dans le noyau des cellules et une fraction d'ADN est présente dans certains organites, tels que les chloroplastes (chez les plantes et les organismes photosynthétiques) et les mitochondries ([Nass et Nass, \(1963\)](#)). Au cours de l'appertisation, l'ADN nucléaire est fortement dégradé. L'ADN mitochondrial, plus résistant, est l'outil

de référence pour l'analyse des ADN anciens et dégradés ([Pääbo, \(1989\)](#)). Cette particularité est liée à sa nature et sa conformation.

Les mitochondries sont des organites possédant des caractéristiques qui leur sont propres. En effet, selon la théorie endo-symbiotique, formulée dès les années 1960 par Lynn Margulis ([Margulis, \(1970\)](#)), la mitochondrie « serait une cellule procaryote incorporée par endocytose au sein de cellules eucaryotes primitives, il y a environ 1,5 à 2 milliards d'années ». Par conséquent, l'ADN mitochondrial possède des protections supplémentaires, contre les phénomènes de dégradation ([Schwarz et al., \(2009\)](#), [Asensio, \(2007\)](#)) :

- en dehors des globules rouges, les mitochondries sont situées à l'intérieur des cellules eucaryotes
- les mitochondries possèdent deux membranes (une membrane mitochondriale externe et une membrane mitochondriale interne)
- les mitochondries possèdent un ADN double brin circulaire, très compact, car il n'est pas complexé avec des histones. Il est présent en de multiples copies ([Bogenhagen et Clayton, \(1974\)](#)), sachant qu'une cellule peut contenir plus de 10 000 copies d'ADN mitochondrial contrairement à l'ADN nucléaire qui n'est présent qu'en un seul exemplaire. De plus, les copies de l'ADN mitochondrial sont identiques, ce qui représente un avantage, puisque la présence de gènes paralogues peut induire des erreurs d'identification.

Par ailleurs, l'ADN mitochondrial est issu de l'héritage maternel ([Giles et al., \(1980\)](#)), car, après la fécondation, le matériel génétique originaire des mitochondries des spermatozoïdes est détruit au cours du processus d'autophagie de l'ovocyte ([Al Rawi et al., \(2011\)](#)). L'ADN mitochondrial échappe donc au brassage des gènes se produisant à chaque génération et sera ainsi hautement conservé au sein d'une espèce ([Taanman, \(1999\)](#)). De plus, chez les mitochondries, les mécanismes de réparation sont peu efficaces, ce qui induit un polymorphisme dans les séquences nucléotidiques qui évolue plus rapidement que les gènes nucléaires ([Brown et al., \(1979\)](#), [Rastogi et al., \(2007\)](#)). L'ADN mitochondrial est donc un bon marqueur pour l'identification des espèces, puisqu'il permet d'avoir des séquences hautement conservées pour une espèce

donnée, mais suffisamment discriminantes pour la différencier d'une espèce à l'autre.

## **2. Identification des espèces de thon par PCR**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Kary MULLIS ([Mullis et al., \(1986\)](#)). En 1993, Kary MULLIS a reçu le Prix Nobel de Chimie pour le développement de cette technique de choix trouvant son utilité et son application dans de très nombreux domaines de la biologie. [Saiki et al., \(1988\)](#), collaborateurs de Kary MULLIS ont apporté des améliorations considérables à cette technique. Ils ont en effet effectué l'amplification à l'aide d'une enzyme isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* ou *Thermophilus aquaticus* vivant à proximité des sources d'eau chaudes : la *Taq* polymérase ([Brock et Freeze, \(1969\)](#)).

### **2.1. Les principales méthodes issues de la PCR en point final permettant l'identification des espèces**

La plupart des méthodes issues de la PCR peuvent s'appliquer à l'identification des espèces de poisson sur tissus crus, comme, la PCR-AFLP (polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) et la PCR-RAPD (amplification aléatoire d'ADN polymorphe) ([Han et Ely, \(2002\)](#), [Maldini et al., \(2006\)](#), [Partis et Wells, \(1996\)](#)). Toutefois, ces méthodes complexes et laborieuses ne peuvent être appliquées aux tissus appertisés car elles nécessitent l'amplification d'ADN non dégradé et présentent une faible reproductivité ([Lockley et Bardsley, \(2000a\)](#) ; [Nollet et Toldrá, \(2009\)](#) ; [Teletchea, \(2009\)](#) ; [Naaum et Hanner, \(2016\)](#)).

La PCR-SSCP (polymorphisme de conformation du simple brin) est également appliquée à l'authentification des espèces. Elle permet de séparer les fragments d'ADN double brin en un ADN simple brin, ce dernier ayant une conformation particulière selon sa composition en nucléotides. Après migration électrophorétique, un profil spécifique est obtenu, permettant la discrimination de l'espèce. La PCR-SSCP permettant d'amplifier de courts fragments d'ADN, est particulièrement intéressante pour authentifier les espèces présentes dans les aliments traités thermiquement telles que les espèces de thon dans les produits appertisés ([Mackie et al., \(1999\)](#), [Rehbein et al., \(1998\)](#), [Colombo et al., \(2005\)](#)).

Cependant, cette technique présente des limites car elle est dépendante des conditions de l'électrophorèse.

La technique de la PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction) fait partie des techniques fréquemment utilisées pour l'identification des espèces de poisson ([Dalmasso et al., \(2006\)](#), [Hold et al., \(2001a\)](#), [Hold et al., \(2001b\)](#), [Lin et Hwang, \(2007\)](#), [Russell et al., \(2000\)](#)). L'étude de [Hold et al., \(2001a\)](#) comprenant la participation de cinq laboratoires européens a prouvé la reproductibilité de la méthode ainsi que son application aux produits commerciaux ayant subis divers procédés industriels. La PCR-RFLP requiert une première étape d'amplification de l'ADN. Puis, l'ADN amplifié est coupé par des endonucléases en fragments de différentes tailles qui sont ensuite séparés par électrophorèse. Un profil de restriction est obtenu correspondant à une « empreinte génétique » spécifique à l'espèce. Ce profil de restriction est comparé avec le profil d'espèces connues, permettant l'identification de l'espèce. Cette méthode a été très appliquée pour l'identification d'espèces de thon en conserve ([Ram et al., \(1996\)](#) ; [Quinteiro et al., \(1998\)](#) ; [Pardo et Pérez-Villareal, \(2004\)](#) ; [Lin et Hwang, \(2007\)](#)). [Pardo et Pérez-Villareal, \(2004\)](#) ont identifié les espèces *T. alalunga*, *T. albacares*, *T. obesus*, *T. thynnus* et *K. pelamis* dans des produits appertisés, en couplant une PCR-RFLP avec un système de nested-PCR (PCR emboîtée, PCR nichée ou PCR en gigogne). La nested-PCR permet de sélectionner spécifiquement une séquence cible en réalisant deux PCR successives et en diminuant les amplifications non spécifiques, avant la réalisation de la PCR-RFLP.

Une autre stratégie d'identification est l'association de la méthode de la PCR suivie d'une étape de séquençage. Le séquençage permet de déterminer l'ordre des nucléotides d'une séquence cible, cette séquence sera ensuite comparée à une base de données, tels que GenBank NCBI ([National Center for Biotechnology Information](#)) contenant des séquences de gènes référencées pour des espèces données. Cette stratégie d'identification est avantageuse, puisque l'étape de séquençage peut être automatisée, permettant de réduire les coûts. A titre d'exemple, [Bartlett et Davidson, \(1991\)](#) ont identifié le thon rouge (*T. thynnus*), le thon obèse (*T. albacares*), le thon albacore et le thon germon (*T. alalunga*) en



séquençant un fragment de 307 paires de bases du gène mitochondrial du cytochrome b. [Bottero et al., \(2007\)](#) ont développé une technique de mini-séquençage d'un fragment de 132 pb du gène du cytochrome b pour différencier ces trois espèces de thon ainsi que l'espèce *K. pelamis* dans des produits appertisés et ont proposé une alternative à la technique de PCR-RFLP. [Botti et Giuffra, \(2010\)](#) ont montré la présence de substitution d'espèces et de mélanges d'espèces frauduleuses dans des conserves de thon et diverses préparations à base de thon en séquençant un fragment de 226 pb du gène du cytochrome b.

La technique PCR-FINS (forensically informative nucleotide sequencing) est la combinaison de la PCR et du séquençage, suivie d'analyses phylogénétiques. Cette approche rapide et reproductible de [Bartlett et Davidson, \(1992\)](#) a permis, à l'aide d'amorces universelles pour le gène du cytochrome b, d'identifier avec succès des échantillons de morue salée, de morue partiellement cuite, de hareng (*Clupea harengus*) mariné, de maquereau fumé, de saumon (*Salmo salar*) en conserve et de saumon fumé. Cette nouvelle méthode s'est progressivement imposée pour l'analyse de l'ADN des espèces de Scombridae issus d'aliments ayant subi des transformations industrielles ([Espiñeira et al., \(2009a\)](#), [Quinteiro et al., \(1998\)](#), [Terol et al., \(2002\)](#)).

Une autre approche pour l'identification des espèces appartenant au genre *Thunnus* a consisté à utiliser la PCR-ELISA ([Santaclara et al., \(2015\)](#)).

La PCR en multiplex a également constitué une approche appliquée pour identifier *T. albacares*, *T. obesus* et *K. pelamis* ([Michelini et al., \(2007\)](#)) ou authentifier *A. thazard* et *A. rochei* ([Infante et al., \(2004\)](#)). Elle permet d'amplifier simultanément plusieurs séquences d'ADN. Cependant, cette méthode est limitée par le nombre de couples d'amorces, qui doit être restreint à cause des interactions possibles entre les différents couples.

Les méthodes de séquençage haut-débit NGS (Next Generation Sequencing) permettent l'analyse de millions de séquences simultanément en employant des micro et/ou des nanotechnologies ([Shendure et Ji, \(2008\)](#)). Les technologies les plus répandues sont le séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina), le séquençage par ligation (Applied Biosystems-Life Technologies) et le séquençage par mesure ionique – Ion Torrent (Life Technologies).

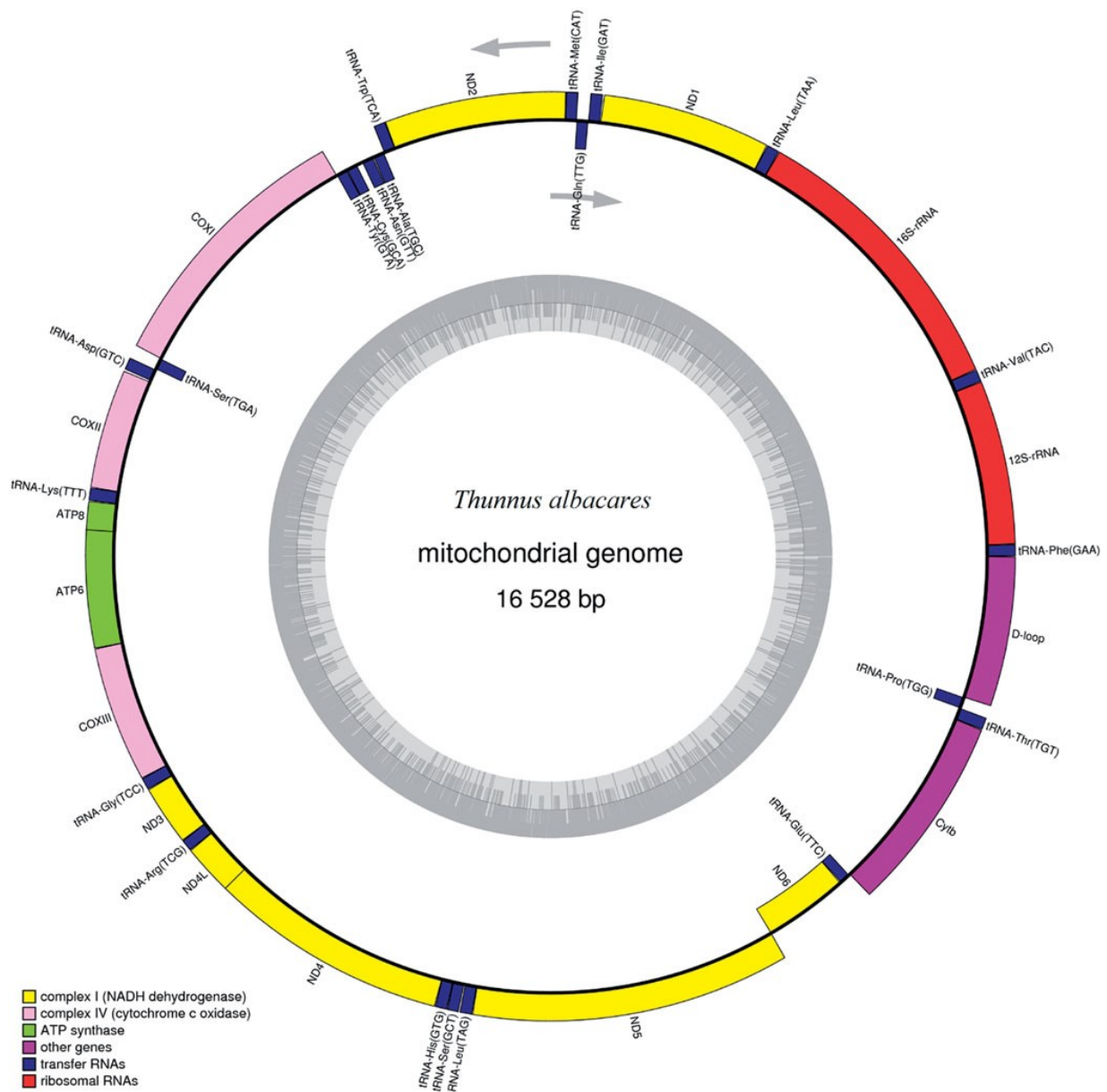
Enfin, des kits commerciaux faisant appel à la méthode PCR ont été développés, tels que les kits NEOGEN permettant d'identifier l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), le cabillaud (*Gadus morhua*), le lieu noir (*Pollachius virens*), le lieu jaune (*Pollachius pollachius*), le merlan (*Merlangus merlangus*), le merlu (*Merluccius merluccius*), le saumon (*Salmon salar*) ou la truite (*Onchorynchus mykiss*). Le kit BioFish de Biotools permet, quant à lui, d'authentifier 3 espèces de poisson. Toutefois, la plupart des kits ne peuvent être appliqués aux produits appertisés.

## **2.2. Les marqueurs mitochondriaux permettant l'identification des espèces**

Les différentes méthodes énoncées précédemment utilisent des marqueurs mitochondriaux. La taille de l'ADN mitochondrial animal est de  $16\,500 \pm 500$  paires de bases. Il possède treize gènes codant pour des protéines, deux gènes codant pour des ARN ribosomiaux (12S et 16S) et vingt-deux gènes d'ARN de transfert. Il possède également une région non codante (« région riche en AT » chez les invertébrés et « région de contrôle ou D-loop (Displacement loop) » chez les vertébrés), contenant des sites d'initiation pour la réplication de l'ADN mitochondrial et la transcription en ARN. Ces gènes sont généralement séparés par au moins dix paires de bases et les gènes codant pour les protéines contiennent rarement des introns ([Meyer, \(1993\)](#)). La représentation du génome mitochondrial du thon albacore est schématisée Figure 12 page 50.

Les mitochondries jouent un rôle dans la thermogénèse, la régulation calcique, le vieillissement, l'apoptose, les réactions énergétiques de la cellule ou encore dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes. Elles sont largement connues pour leur rôle dans la respiration cellulaire ([Gray, \(1999\)](#)), ce qui peut expliquer le fait que le génome mitochondrial soit hautement conservé.

Le gène du cytochrome b est l'un des premiers marqueurs issu de l'ADN mitochondrial qui a été utilisé pour la discrimination des espèces de thon présentes dans les produits alimentaires, comme le *T. thynnus*, *T. alalunga*, *T. albacares*, *T. obesus*, *K. pelamis*, *E. affinis*, *A. thazard*, *S. orientalis*, *T. maccoyii*... ([Lin et Hwang, \(2007\)](#), [Chuang et al., \(2012\)](#), [Bottero et al., \(2007\)](#), [Terol et al., \(2002\)](#), [Tseng et al., \(2011\)](#), [Abdullah et Rehbein, \(2015b\)](#), [Botti et Giuffra, \(2010\)](#), [Chow et Kishino, \(1995\)](#)).



**Figure 12 : Représentation schématique du génome mitochondrial du thon albacore d'après [Guo et al., \(2014\)](#)**

ND n° : NADH déshydrogénase (sous-unité n°) ; CO n° : cytochrome oxydase (sous-unité n°) ; Cyt b : cytochrome b ; D-loop : Displacement loop ou région de contrôle ; ATP n° : ATP synthase (sous-unité n°) ; en jaune : complexe I (NADH déshydrogénase) ; en rose : complexe IV (cytochrome c oxydase) ; en vert : ATP synthase ; en violet : autres gènes ; en bleu : ARN de transfert ; en rouge : ARN ribosomal

La région de contrôle ou D-loop a également été utilisée pour l'identification d'espèces de thon ([Chuang et al., \(2012\)](#), [Kumar et al., \(2012\)](#), [Viñas et Tudela, \(2009\)](#)). Ces auteurs ont démontré que la région de contrôle contenait plus de variations interspécifiques, par rapport aux gènes de la cytochrome oxydase c

sous-unité 1 (COI). Le gène de la région de contrôle est ainsi devenu un marqueur privilégié pour l'identification des espèces de thon et particulièrement adapté pour la technique PCR-FINS.

Le gène de la cytochrome oxydase c sous unité 1 (COI) est l'un des gènes les plus étudiés pour l'identification d'espèces de thon. Il est couramment utilisé pour l'étude des populations, mais aussi pour la vérification de l'authenticité des espèces de thon dans les produits alimentaires ([Paine et al., \(2007\)](#) ; [Paine et al., \(2008\)](#) ; [Lowenstein et al., \(2009\)](#) ; [Khaksar et al., \(2015\)](#) ; [Li et al., \(2015\)](#) ; [Mueller et al., \(2015\)](#) ; [Seyhan et Turan, \(2016\)](#)). C'est d'ailleurs par l'étude de ce marqueur que [Viñas et Tudela, \(2009\)](#) ont démontré et légitimé la proximité génétique existante entre les différentes espèces de thon. Le gène de la cytochrome oxydase c sous unité 1 est surtout connu comme étant le gène de référence utilisé pour différencier des espèces entre elles. Il fait l'objet du projet Barcoding of Life (BOL) ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org), Barcode of Life) lancé, en 2003, par Paul HEBERT et son équipe ([Hebert et al., \(2003\)](#)). Le « barcoding moléculaire » ou « code-barres génétique » correspond à l'analyse d'une séquence d'ADN permettant l'identification au niveau de l'espèce d'un individu. Dans le projet BOL, la séquence d'ADN correspond à un fragment d'ADN du gène COI présent chez tous les organismes vivants et quasiment identique chez des individus d'une même espèce. Des bases de données ont donc été développées pour l'ensemble des organismes et le programme Fish-BOL (Fish Barcode of Life Initiative) est spécifique aux espèces de poisson (<http://www.fishbol.org/> ; [Ratnasingham, \(2007\)](#), [Ward et al., \(2009\)](#)).

L'analyse du gène de la NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND2) a permis de différencier l'espèce *K. pelamis* parmi les espèces *Thunnus thynnus*, *Thunnus albacares* et *Thunnus alalunga* ([Dalmasso et al., \(2006\)](#)). Toutefois, l'utilisation d'amorces spécifiques au genre *Thunnus*, mises au point par ces auteurs, ne leur a pas permis de distinguer ces 3 espèces génétiquement très proches. C'est pourquoi, d'autres systèmes associés aux amorces ont été utilisés, tels que les sondes spécifiques. D'ailleurs, un an plus tard, ([Dalmasso et al., \(2007\)](#)) ont appliqué le système de sonde FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer »), méthode de PCR en temps réel pour l'authentification des espèces *T.*

*thynnus*, *T. albacares*, *T. alalunga* et *T. obesus* à l'aide du gène de l'ATP6 (ATP synthase/synthétase sous-unité 6).

### **C. Méthodes de quantification des espèces**

#### **1. La PCR quantitative ou en temps réel**

Les premières méthodes de quantification par PCR sont apparues au début des années 90 ([Becker-Andre et Hahlbrock, \(1989\)](#)). Elles utilisaient le principe de la PCR compétitive afin de quantifier de façon absolue des acides nucléiques ciblés. Quelque temps après, apparaissait pour la première fois la technique de la PCR en temps réel. Elle permet de détecter les produits PCR au fur et à mesure de leur accumulation et de suivre l'intensité de fluorescence émise par le milieu réactionnel en temps réel ([Higuchi et al., \(1992\)](#) ; [Higuchi et al., \(1993\)](#)). La quantité d'ADN formée à chaque cycle PCR étant proportionnelle à la fluorescence émise, il devenait possible de quantifier la quantité d'ADN cible initial. Un autre avantage de la PCR en temps réel était de ne pas faire intervenir des étapes post-PCR, comme la réalisation de gels d'électrophorèse, permettant de diminuer le risque des contaminations croisées ([Rodriguez-lazaro, \(2003\)](#), [Lopez et Pardo, \(2005\)](#)). De plus, il s'agissait d'une technique plus rapide, moins chère que la PCR-SSCP ou la PCR-RFLP, fiable, reproductible et pouvant être automatisée ([Heid et al., \(1996\)](#)).

Au même titre que la PCR en point final, elle requiert l'utilisation d'amorces spécifiques à une séquence cible, des déoxyribonucléotides (dNTPs) ainsi que de la *Taq* polymérase. Sa particularité provient du fait qu'elle fait intervenir un intercalant de l'ADN (molécule fluorescente ou fluorophore) émettant de la fluorescence et permettant de suivre la réaction de PCR en temps réel. Dès lors, un profil caractéristique est obtenu correspondant à la cinétique de la réaction qui est divisée en trois phases :

- La phase de « bruit de fond » correspond aux premiers cycles de PCR au cours desquels, malgré le doublement théorique du produit, il y a peu de changement au niveau de l'émission du signal fluorescent (la fluorescence propre à l'amplification de l'ADN est inférieure au bruit de fond).
- La phase « exponentielle » correspond au doublement théorique du produit à chaque cycle, créant une croissance exponentielle du signal de fluorescence.

- La phase dite de « plateau » est l'étape où les constituants de la réaction deviennent limitants. En théorie, l'amplification par la PCR correspond à une courbe exponentielle, cependant, en pratique, les réactifs s'épuisant au fur et à mesure de l'amplification, le profil d'amplification PCR en temps réel n'est pas strictement exponentiel, la résultante étant l'obtention d'un plateau. Le profil d'amplification observé pour la PCR en temps réel possède en réalité une allure de sigmoïde ([Rutledge, \(2004\)](#)).

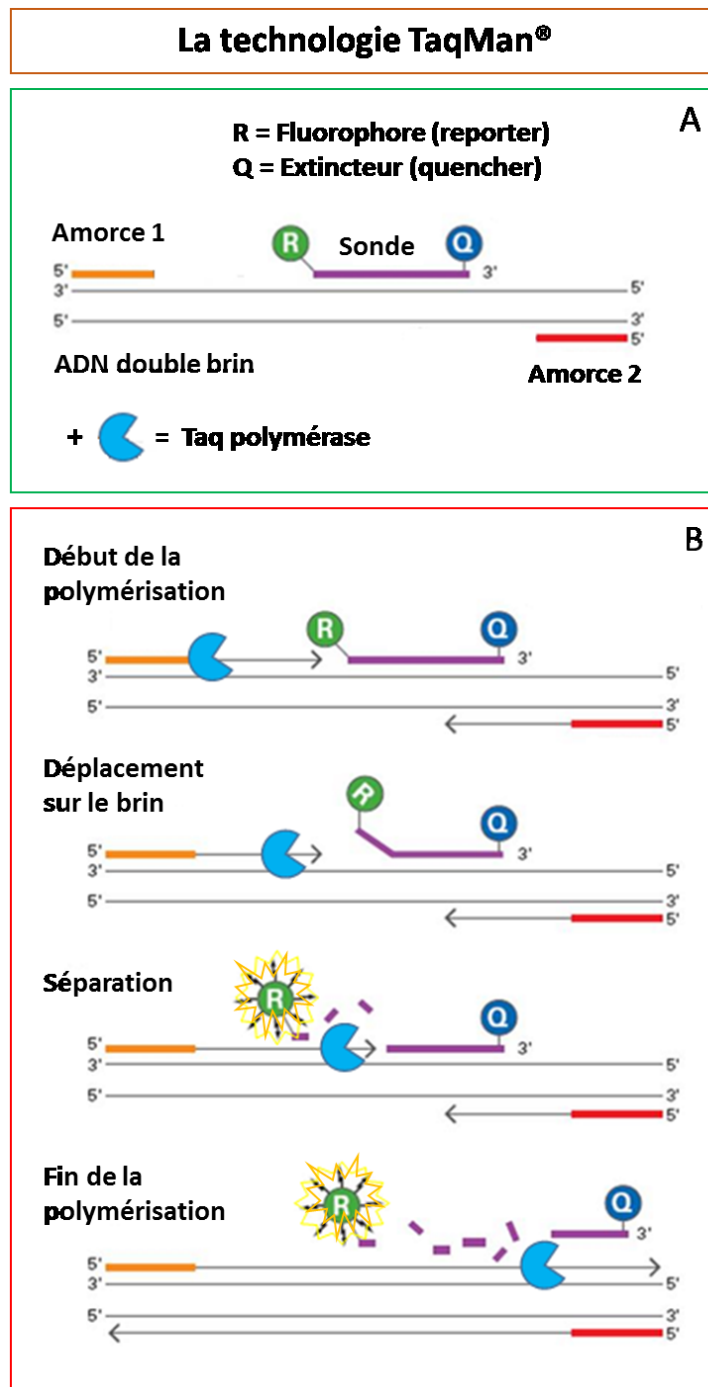
Une notion fondamentale à la base de la PCR quantitative est le Ct ou « cycle threshold » ou encore « cycle seuil », étant également connu sous la terminologie de Cp « crossing point » ou encore TOP « take-offpoint ». Le Cp ou Ct correspond au nombre de cycles à partir duquel le signal fluorescent du gène ciblé est supérieur à celui du bruit de fond ([Wittwer et al., \(1997\)](#) ; [Rasmussen, \(2001\)](#)). En d'autres termes, l'émission de la fluorescence est statistiquement et significativement plus élevée que la ligne de base ou threshold. La ligne de base est constituée de la droite parallèle à l'axe des abscisses et elle coupe toutes les cinétiques en un point de leur phase exponentielle. Au vu des différentes terminologies existantes (Cp, Ct ou TOP) pour la quantification par PCR en temps réel, [Bustin et al., \(2009\)](#) ont publié le MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), où ils proposèrent de remplacer toutes ces désignations par le terme générique de quantification cycle ou Cq en accord avec le RDML (Real-Time PCR Data Markup Language data standard ; <http://www.rdml.org>).

Le premier intercalant de l'ADN utilisé était le bromure d'éthidium (BET), remplacé progressivement par le SYBR Green® (cyanine assymétrique (C32H37N4S)) moins toxique. Il s'agit d'un fluorophore capable d'émettre de la fluorescence, uniquement lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Il absorbe la lumière bleue ( $\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$ ) et émet de la lumière verte ( $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$ ). C'est pourquoi, au cours de la PCR, plus le nombre de brins amplifiés augmente, plus la fluorescence augmente. La technologie SYBR Green® a été utilisée pour l'identification de *T. obesus* dans des produits appertisés ([Chuang et al., \(2012\)](#)).

La technologie TaqMan® a pour caractéristique d'utiliser une sonde spécifique qui permet d'avoir une émission de fluorescence qui est associée à l'activité 5' exonucléase de la *Taq* polymérase ([Holland et al., \(1991\)](#)). Il s'agit d'une sonde fluorogénique qui possède à la fois un élément fluorescent (le reporter ou fluorophore) et un élément inhibant la fluorescence (le quencher ou extincteur). Tant que le quencher et le reporter sont liés à la sonde, il n'y a pas d'émission de fluorescence. Au cours de la réaction de la PCR, la sonde TaqMan est progressivement digérée par la *Taq* polymérase, ce qui a pour conséquence de provoquer la séparation du « quencher » et du « reporter », induisant une émission de fluorescence (

Figure 13 page 55). L'ajout de sonde, en plus des amorces, confère à la chimie TaqMan® l'avantage d'être plus spécifique ([Gudnason et al., \(2007\)](#) ; [Ruijter et al., \(2014\)](#)) et donc plus adaptée à la discrimination des espèces génétiquement proches comme les espèces de thon et les espèces assimilées au thon. Elle a permis l'identification des espèces commerciales comme le merlu commun et certaines espèces de Scombridae ([Chuang et al., \(2012\)](#), [Lopez et Pardo, \(2005\)](#), [Rasmussen et Morrissey, \(2009\)](#), [Sánchez et al., \(2009\)](#), [Terio et al., \(2010\)](#), [Velasco et al., \(2013\)](#)).

Toutefois, même si [Lopez et Pardo, \(2005\)](#) ont réussi à quantifier les espèces des thons *T. alalunga* et *T. albacares* en mélange à partir d'ADN issus de tissus crus, la quantification à partir de tissus appertisés n'a pas été possible à cause de l'effet de la dégradation. D'autres méthodes utilisant des sondes ont été appliquées pour l'identification et la quantification des espèces de thon en utilisant les single-nucleotide polymorphisms (SNPs) et la technologie FRIP (fluorogenic ribonuclease protection) ([Kitaoka et al., \(2009\)](#), [Kitaoka et al., \(2008\)](#)).



**Figure 13 : Principe de la technologie TaqMan®**

À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives ; B. au début de la polymérisation, la *Taq* polymérase se déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorophore est libéré du quencher permettant l'émission de la fluorescence



## 2. Les différentes stratégies de quantification

Les méthodes de quantification par PCR en temps réel sont généralement classées en deux grandes catégories :

- la première correspond à la quantification dite « absolue » et permet de déterminer une quantité absolue en acides nucléiques
- la seconde correspond à la quantification dite « relative » et nécessite une normalisation par rapport à un gène de référence. Parmi ces deux catégories, plusieurs stratégies de quantification existent suivant l'utilisation ou pas d'un standard externe.

### 2.1. Méthode basée sur la quantification absolue avec standard externe

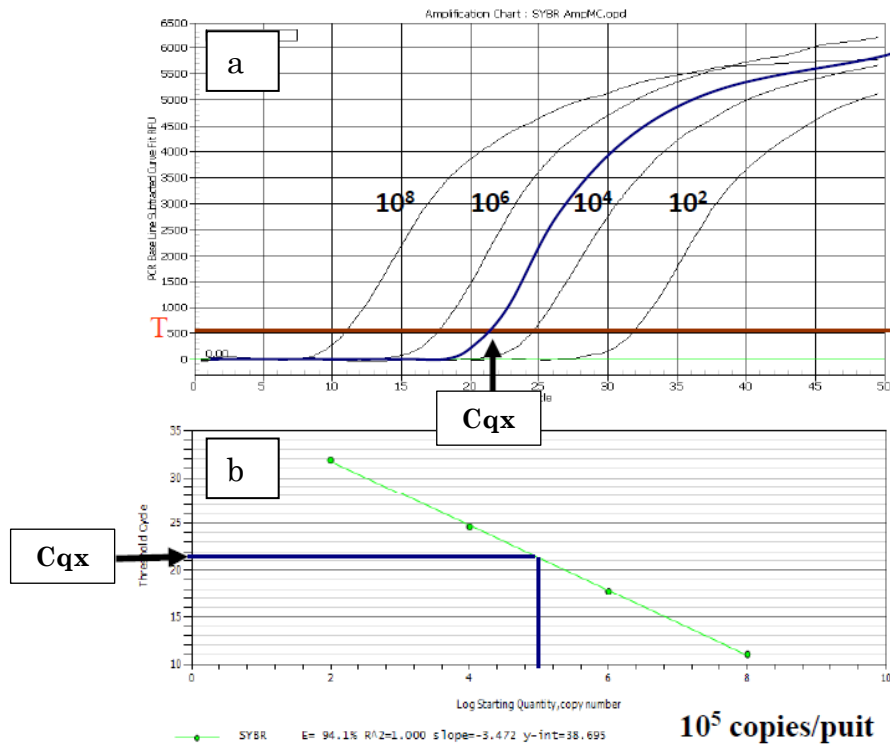
[Becker-Andre et Hahlbrock, \(1989\)](#) ont été parmi les premiers à appliquer la méthode de la quantification absolue. Son principe consiste à déterminer la quantité d'ADN contenue dans un échantillon donné à partir d'une « courbe ou droite standard ». La courbe standard représente les valeurs des Cq obtenues en fonction du log des concentrations décroissantes. Elle est obtenue à partir de la dilution en cascade d'un échantillon, nommé « standard », dont la concentration est connue. La valeur de Cq est inversement proportionnelle au log de la concentration initiale en molécules cibles. En reportant la valeur du Cq d'un échantillon inconnu sur la courbe standard, il est alors possible de déterminer sa concentration (Figure 14 page 57).

#### *Principes mathématiques*

En théorie, la cinétique de la PCR correspond à une courbe exponentielle, pour laquelle la quantité de produits de PCR double à chaque cycle d'amplification et peut être définie par l'équation suivante :

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

où N représente le nombre de molécules amplifiées au final, N<sub>0</sub> le nombre initial de molécules et n le nombre de cycles d'amplification.



**Figure 14: Construction de la courbe standard et obtention des concentrations à partir de la courbe standard**

Un échantillon standard est dilué en série. Les C<sub>q</sub> obtenus (flèche figure a) sont reportés en fonction des log des concentrations relatives du standard et une droite standard est établie (droite en vert de la figure b). Le C<sub>q</sub> obtenu pour un échantillon inconnu (C<sub>qx</sub>) est reporté sur la courbe standard afin d'obtenir le log de la concentration en molécules cibles de cet échantillon (source : [http://biochimie.umontreal.ca/wp-content/uploads/sites/37/2015/07/intro\\_pcr.pdf](http://biochimie.umontreal.ca/wp-content/uploads/sites/37/2015/07/intro_pcr.pdf))

Cependant, en pratique, la quantité de produits est liée à l'efficacité d'amplification qui est définie comme étant le pourcentage moyen de molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. L'efficacité d'amplification est comprise entre 0 (aucune amplification) et 1.

En introduisant ce facteur, l'amplification de la PCR peut être définie par l'équation suivante :

$$N = N_0 \cdot (1+E)^n$$

où E représente l'efficacité de la PCR.

Une relation linéaire de type  $y = ax + b$  peut ensuite être définie selon l'équation :

$$\log N = n \cdot \log (1+E) + \log N_0$$

où « a » représente la pente de valeur  $\log(1+E)$  et « b » représente l'ordonnée à l'origine de valeur  $\log N_0$ . Par conséquent, le nombre initial de molécules  $N_0$  peut être calculé et l'efficacité peut être calculée d'après l'équation suivante :

$$E = (10^{-1/\text{pente}}) - 1$$

Soit  $E = [(10^{-1/\text{pente}}) - 1] \times 100$  (valeur de l'efficacité en pourcentage)

Lorsque la pente est égale à 3,32, l'efficacité est de 100% (c'est-à-dire que  $E = 2$ ), ce qui correspond à un doublement du nombre d'amplicons.

En pratique, l'efficacité de la réaction est variable d'un cycle à l'autre avec des cinétiques différentes pour un même gène détecté à partir d'un même échantillon tissulaire ([Liu et Saint, \(2002\)](#)). C'est pourquoi, d'autres paramètres sont pris en compte pour la quantification absolue avec un standard externe, comme le taux d'erreur et le coefficient de corrélation  $R^2$ .

Le taux d'erreur correspond à l'écart entre les points expérimentaux et la droite de régression obtenue. Il correspond à la somme des carrés des écarts à la moyenne. En règle générale, un taux d'erreur de 0,2 soit 20 % est accepté sur une gamme dynamique de 4 à 5 Log. Le coefficient de corrélation  $R^2$  indique l'intensité de la liaison entre  $C_q$  et  $\log$  base 10 des concentrations initiales en molécules cibles et permet de vérifier la reproductibilité (pipetage...). Plus la valeur de  $R^2$  est proche de 1 ou de -1, plus la méthode est fiable. La quantification absolue avec un standard externe est une méthode de quantification surtout appliquée au domaine médical. Elle a également été appliquée pour le diagnostic microbiologique de produits alimentaires d'origine halieutique ([Robert-Pillot et al., \(2010\)](#) ; [Kamau et al., \(2013\)](#) ; [Than et al., \(2015\)](#)).

Au cours de ces dernières années, de nouvelles stratégies de quantification absolue ont été développées, comme la digital PCR (dPCR) permettant une quantification absolue sans établir une courbe standard. La dPCR est une technologie plus sensible et plus spécifique que la PCR en temps réel, car elle permet l'amplification de molécules d'ADN uniques se réalisant dans des compartiments indépendants ([Kalinina et al., \(1997\)](#) ; [Vogelstein et Kinzler, \(1999\)](#) ; [White et al., \(2009\)](#) ; [Huggett et al., \(2013\)](#)). Elle a notamment été

employée pour quantifier la présence d'agents pathogènes humains dans des échantillons alimentaires ([Coudray-Meunier et al., \(2015\)](#)).

## 2.2. La quantification relative

### *Méthode basée sur la quantification relative utilisant les $\Delta C_T$*

D'abord appliquée au domaine médical et à l'étude de l'expression des gènes, cette méthode de quantification utilise un gène de référence (ou endogène) qui permet de quantifier l'expression d'un gène par rapport à celui-ci. Le but consiste à savoir si le gène est « n fois plus ou moins exprimé ou réprimé ».

Au cours de ces dernières années, plusieurs méthodes de calcul ont été développées pour la quantification relative sans standard externe ([Meijerink et al., \(2001\)](#) ; [Bustin, \(2002\)](#)). La plupart d'entre elles étaient dérivées de la méthode des  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  développée par [Livak et Schmittgen, \(2001\)](#), qui elle-même est la résultante de l'équation  $N = N_0 \cdot (1+E)^n$ . La méthode des  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  permet une quantification de façon relative de l'expression des gènes, en prenant en compte à la fois un « gène de référence » jouant le rôle de contrôle interne et un « calibreur » permettant de calibrer le système, car il n'a subi aucun traitement expérimental (situation normale).

Lorsqu'ils sont correctement sélectionnés, le gène de référence et le calibreur agissent comme des facteurs correcteurs, corrigeant les variations liées à la PCR. L'avantage de cette méthode est qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser de courbes standards, mais simplement de comparer les  $C_q$ . Cette méthode a été adaptée pour la quantification, en termes de pourcentages.

### *Méthode basée sur la quantification relative avec standard externe*

La méthode de quantification relative avec un standard externe est une méthode qui fait appel à la fois à des courbes standards, mais également à un gène endogène. Classiquement rangée parmi les méthodes de quantification relative, celle-ci est en réalité à l'interface des deux types de quantification (absolue et relative), puisqu'il est nécessaire de construire deux courbes standards indépendantes pour le même échantillon. La première courbe standard est construite pour la quantification du gène recherché (ou gène cible) et la seconde pour la quantification du gène de référence (ou gène endogène). Les quantités

obtenues à partir des courbes standards pour le gène cible et le gène endogène sont exprimées sous forme de ratio :

$$\frac{\text{Quantité du gène cible}}{\text{Quantité du gène de référence}}$$

L'avantage de cette méthode est qu'elle demande moins d'étapes de validation, car l'efficacité pour le gène de référence et celle du gène cible peuvent ne pas être égales ([Livak, \(1997\)](#) ; [Liu et Saint, \(2002\)](#) ; [Wong et Medrano, \(2005\)](#)). Elle a d'abord été appliquée pour l'étude quantitative de la présence d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ([Guo et al., \(2009\)](#)), qui se heurte comme pour les espèces de thon aux problèmes liés aux contaminations fortuites et/ou frauduleuses. Cette méthode a également été appliquée pour la quantification d'espèces alimentaires comme le bœuf et de porc en mélange ([Iwobi et al., \(2015\)](#)). La PCR quantitative présente de nombreux avantages dont sa haute sensibilité, sa spécificité, son efficacité et l'absence d'étapes post-PCR. Elle a peu été utilisée pour l'identification des espèces de thon ([Lopez et Pardo, \(2005\)](#)). Toutefois, les études de quantification sont rares et n'ont pas encore exploré toutes les possibilités des différentes stratégies de quantification par PCR en temps réel. A partir de ces méthodes, et quelle que soit la stratégie de quantification, différents modes de calcul ont été appliqués pour la quantification ([Bustin, \(2000\)](#) ; [Livak et Schmittgen, \(2001\)](#) ; [López-Andreo et al., \(2005\)](#) ; [Lopez et Pardo, \(2005\)](#) ; [Guo et al., \(2009\)](#) ; [Iwobi et al., \(2015\)](#)).

#### **D. Conclusion**

Les espèces de thon et apparentées font partie des espèces les plus pêchées en haute mer. Les trois principales espèces de thon les plus capturées au monde sont le listao, le thon albacore et le thon obèse. Ces espèces représentent près de la moitié des produits aquatiques appertisés en France.

Des substitutions volontaires et/ou involontaires peuvent être réalisées lorsque des techniques de pêche comme les dispositifs concentrateurs de poissons sont utilisés (pêche importante de juvéniles de thons obèse et albacore), lorsque les caractéristiques morphologiques externes sont perdues au cours de la transformation en filet ou lorsque les darnes ont le même aspect et la même texture après l'appertisation.

Les différentes crises alimentaires ont eu pour conséquence un renforcement des législations avec des exigences en matière d'étiquetage où doit être mentionné, par exemple, le nom commun ou d'usage de l'espèce, ou encore, l'interdiction d'incorporer des mélanges d'espèces de poisson différentes au sein d'une même boîte de thon. Ceci justifie l'intérêt porté pour le développement des outils permettant l'identification et la quantification des espèces de thon.

Des méthodes d'identification basées sur les protéines ont été développées pour l'authentification de différentes espèces de thon, comme la méthode IEF qui a été la plus répandue pour la discrimination des espèces de thon à partir de tissus crus. Cependant, lorsque les chairs sont cuisinées, très transformées et/ou appertisées, les protéines thermolabiles ne peuvent être utilisées pour l'identification des espèces de thon.

L'ADN étant plus résistant aux températures appliquées au cours de l'appertisation, il peut être utilisé pour la discrimination des espèces de thon et des espèces assimilées au thon. Néanmoins, l'appertisation et l'ajout d'ingrédients alimentaires ont pour conséquence d'induire une forte dégradation de l'ADN, son importante fragmentation, une perte de la qualité et une diminution de sa quantité.

L'utilisation de l'ADN mitochondrial est privilégiée du fait de sa conformation et de sa localisation dans la cellule, le rendant plus résistant que l'ADN nucléaire aux procédés de la stérilisation.

De nombreuses méthodes basées sur l'étude de l'ADN ont permis l'identification des espèces de thon. Il s'agit notamment de la PCR-AFLP, de la PCR-RAPD, de la PCR-SSCP, de la PCR-RFLP, de la PCR-FINS et des nouvelles méthodes de séquençage haut-débit (NGS). Toutefois, ces méthodes n'ont pas permis de quantifier la présence de différentes espèces de thon en mélange au sein d'une même boîte de thon.

La PCR en temps réel ou quantitative a été utilisée pour l'identification des espèces de thon et a pour avantage d'être une méthode rapide, ne nécessitant pas d'étapes post-PCR et permettant de réduire les risques de contaminations croisées. Elle a surtout pour intérêt majeur de permettre la quantification d'ADN cible initialement présent dans les extraits. La quantification des espèces de thon

reste complexe, voire dans certains cas impossible, lorsque le tissu est sous la forme appertisée.

Différentes stratégies de quantification peuvent être appliquées, comme les quantifications absolue ou relative.

Pour l'ensemble de ces raisons, au cours de la thèse, les différentes adaptations appliquées aux produits appertisés et les différentes stratégies de quantification seront abordées afin de savoir, s'il est possible d'identifier et de quantifier les thons albacore, obèse ou le listao, dans les produits appertisés par PCR en temps réel.

# Matériels et méthodes





## A. Matières premières

### 1. Echantillons de tissus crus

Les échantillons de thon utilisés pour l'analyse sur les tissus crus et appertisés ont été prélevés à partir de poissons entiers achetés par PFINV ou collectés par Ifremer. Les échantillons ont été identifiés par séquençage par l'Ifremer *via* le séquençage de fragments de 450 paires de bases de la région de contrôle et de 650 pb du gène codant pour la cytochrome oxydase sous-unité I (COI) qui ont été comparés avec les séquences répertoriées dans les bases de données du BOLD (DNA Barcode of Life ; <http://www.barcodinglife.org/>) et NCBI (National Center for Biotechnology Information - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Pour chaque espèce de l'étude (*T. albacares*, *T. obesus* et *K. pelamis*), les individus ont été capturés dans trois zones géographiques différentes (océan Pacifique, Atlantique et Indien). Les thons ont été livrés congelés à PFINV, puis ont été découpés en longes, congelés et répartis entre les différents partenaires.

Les longes destinées à l'ULCO ont été conservées à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN ; dix individus ont été sélectionnés par espèce.

13 espèces, susceptibles d'être utilisées comme espèce de substitution, ont été incluses dans l'étude afin d'éprouver la méthode. Une partie des échantillons a été fournie par PFINV et conservée par l'ULCO sous forme congelée à -20°C jusqu'à utilisation. L'autre partie des échantillons, conservée dans l'éthanol, a été fournie par Ifremer. Cependant, en raison des difficultés rencontrées pour l'approvisionnement en thons, certaines espèces n'ont pas pu être échantillonnées. L'ensemble des échantillons récupérés sont présentés dans le Tableau IV page 66.

D'autres espèces de Scombridae ou non ont été ajoutées à l'étude :

- parmi les Scombridae, des échantillons de cinq espèces de bonites et de thons conservés dans l'éthanol (fournis par l'Ifremer de Nantes) et cinq individus de maquereau d'Atlantique (*Scomber scombrus*) sous forme congelée (fournis par PFINV).
- parmi les espèces n'appartenant pas aux Scombridae, un échantillon de chaque espèce a été fourni par PFINV : du rouget-barbet cinnabare (*Parupeneus cinnabarinus*), du saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), du

merlan (*Merlangius merlangus*), du cabillaud (*Gadus morhua*), de la sole commune (*Solea solea*), du flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*), de l'espadon (*Xiphias gladius*), du colin d'Alaska (*Gadus chalcogrammus*) et du lieu noir (*Pollachius virens*). Les échantillons ont été livrés sous formes crue et congelée par PFINV, puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

**Tableau IV : Echantillonnage et mode de conservation des autres espèces de thon et assimilées au thon incluses dans l'étude**

Nom scientifique	Mode de conservation	Nombre d'échantillons
<i>Auxis rochei</i>	congelé	1
<i>Auxis thazard</i>	éthanol	1
<i>Euthynnus affinis</i>	éthanol	4
<i>Euthynnus alletteratus</i>	Ethanol	1
<i>Thunnus alalunga</i>	congelé et éthanol	10
<i>Thunnus atlanticus</i>	éthanol	5
<i>Thunnus maccoyii</i>	pas d'échantillon	
<i>Thunnus orientalis</i>	pas d'échantillon	
<i>Thunnus thynnus</i>	éthanol	4
<i>Thunnus tonggol</i>	éthanol	1
<i>Sarda sarda</i>	congelé et éthanol	6
<i>Sarda orientalis</i>	pas d'échantillon	
<i>Sarda chiliensis</i>	pas d'échantillon	

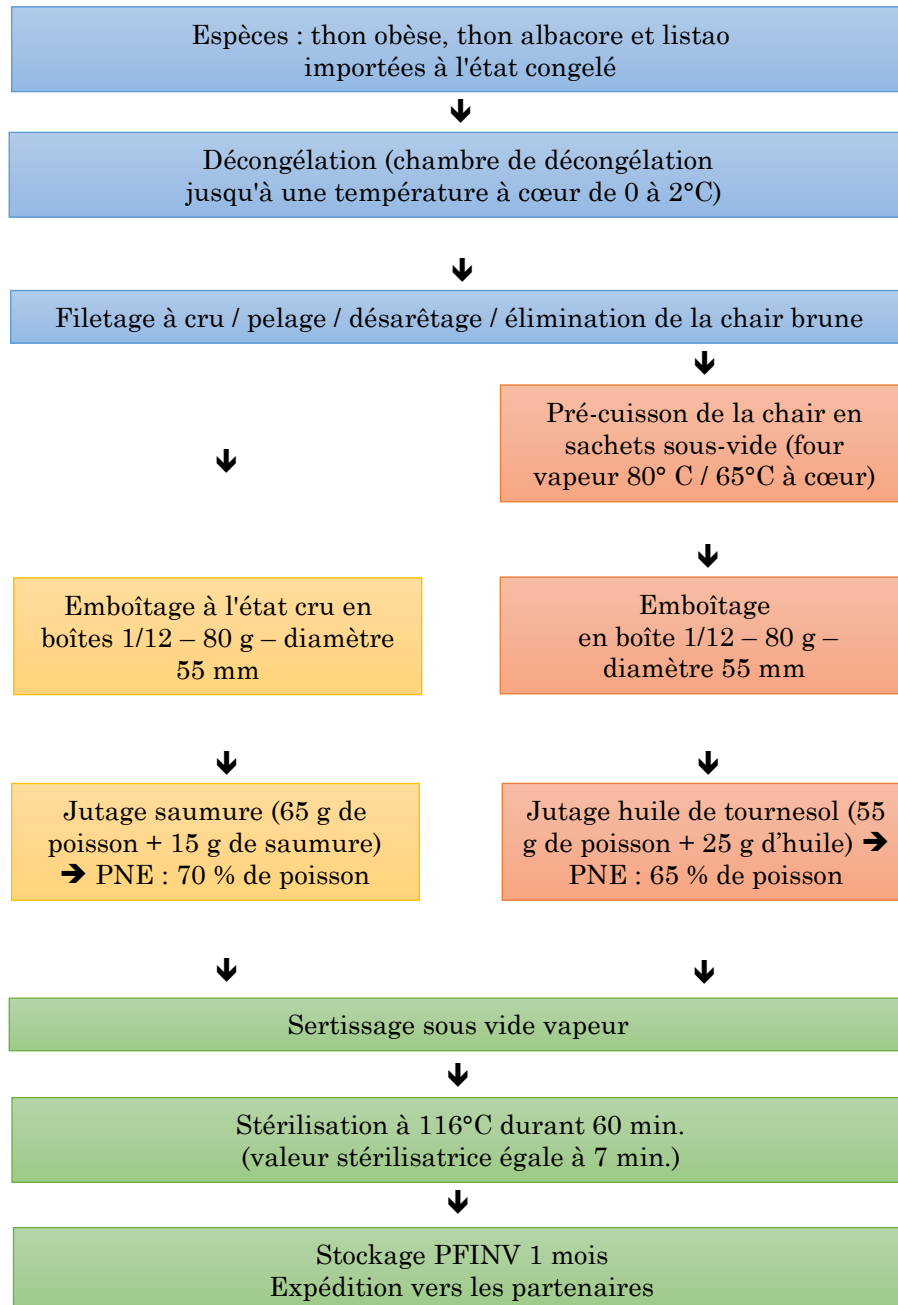
## 2. Echantillons de tissus appertisés

Les boîtes de conserve ont été fabriquées par PFINV suivant le protocole exposé dans la Figure 15 page 67 correspondant au mode de préparation des boîtes commerciales.

Dans un premier temps, des boîtes contenant une seule espèce ont été produites, soit dix boîtes contenant 100 % de *Katsuwonus pelamis* (listao), dix boîtes contenant 100 % de *Thunnus albacares* (albacore) et dix boîtes contenant 100 % de *Thunnus obesus* (thon obèse).

Dans un second temps, des boîtes contenant un mélange de deux espèces ont été préparées afin de simuler différents taux de substitution. Trois mélanges de deux espèces ont été réalisés : albacore/obèse, listao/albacore et listao/obèse. Pour

chaque mélange, différents pourcentages ont été appliqués selon les ratios : 99/1, 95/5, 90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90, 5/95, 1/99 et quatre boîtes par ratio ont été fabriquées.



**Figure 15 : Protocole de préparation des conserves réalisées par PFINV (source : PFINV)**

PNE (présentation des normes européennes)

Trente boîtes commerciales issues de différentes marques et d'enseignes de distribution différentes ont été achetées, dont dix étiquetées « thon albacore »,

cinq étiquetées « thon obèse », trois étiquetées « thon germon », onze étiquetées « listao » et une boîte étiquetée « thon » sans précision de l'espèce.

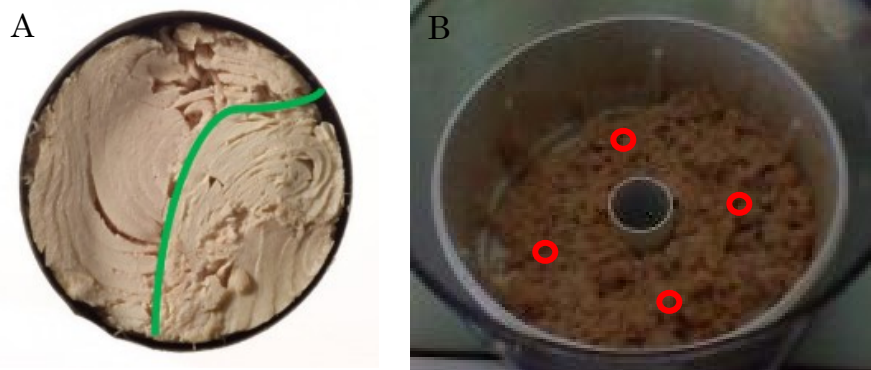
## B. Extraction de l'ADN

### 1. Echantillons de tissus crus

200 mg de tissu sont prélevés pour chaque échantillon. Pour les échantillons conservés dans l'éthanol, les 200 mg de tissu sont préalablement placés dans une étuve à 37°C jusqu'à évaporation totale de l'éthanol.

### 2. Echantillons de tissus appertisés

En raison de la forte dégradation de l'ADN et de la présence d'inhibiteurs de la PCR pouvant être contenus dans les milieux de couverture (saumure, huile...), il est nécessaire d'appliquer une étape de prétraitement des échantillons appertisés afin d'enlever le milieu de couverture et de « nettoyer » les tissus. Les prétraitements appliqués sont constitués d'un séchage réalisé à l'aide de papier-filtre qualitatif afin d'absorber le surplus de milieu de couverture, d'un lavage à l'éthanol (suivi d'un séchage au papier-filtre) et d'un rinçage à l'eau (suivi d'un séchage au papier-filtre). L'ensemble de ces étapes est réalisé avant l'extraction de l'ADN.



**Figure 16 : Prélèvement des échantillons appertisés**

A. Présence de différentes longues au sein d'une même boîte de thon. Le trait vert représente la limite entre deux longues. B. Boîte de thon mélangée pour les prélèvements aléatoires après mixage du contenu de la boîte. Les cercles rouges représentent les prélèvements aléatoires

Au sein d'une même boîte de thon, plusieurs longues pouvant provenir de différents individus peuvent être retrouvées. C'est pourquoi le contenu de la boîte est tout d'abord mélangé, puis quatre prélèvements aléatoires sont réalisés. Le but

consistait à avoir un prélèvement représentatif du contenu de la boîte et une méthode reproductible pour l'ensemble des boîtes de thon (Figure 16 page 68).

### 3. Méthodes d'extraction de l'ADN

Le protocole d'extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique est celui utilisé par Ifremer ([Jérôme et al., \(2003a\)](#)). D'autres méthodes d'extraction de l'ADN ont été testées (Tableau V ci-dessous) afin de considérer celles qui pourraient être les plus adaptées au développement d'une méthode d'identification et de quantification des trois espèces de l'étude sur le tissu appertisé.

**Tableau V : Techniques d'extraction de l'ADN utilisées**

Kits ou Techniques	Noms	Technologies appliquées pour l'extraction de l'ADN
Kit 1	DNeasy Blood & Tissue (Qiagen ; France)	Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice
Kit 2	DNeasy Mericon Food (Qiagen; France)	Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice
Kit 3	Wizard Genomic DNA Purif (Protocole Anses BSM*)	Précipitation des protéines à l'aide de sels
Kit 4	Wizard SV DNA purif system (Promega ; France)	Précipitation des protéines à l'aide de sels avec colonnes
Kit 5	Genomic DNA from tissue (Machery-Nagel ; France)	Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice
Kit 6	Genomic DNA from food (Machery-Nagel ; France)	Chromatographie d'adsorption sur colonne de silice
Méthode 1	PCI (Ifremer Nantes)	Utilisation de la différence de solubilité entre l'ADN et les protéines

\*BSM : Boulogne-sur-mer

Dans tous les cas, les prétraitements (séchage et lavage éthanol/eau) et le mixage de la boîte ont été réalisés et 200 mg de tissu ont été prélevés afin de pouvoir comparer les méthodes entre elles. Les échantillons traités sont issus des mêmes boîtes : une boîte de thon à l'huile contenant du listao et une boîte de thon au naturel contenant de l'albacore. Deux prélèvements par boîte et par test ont été réalisés, soit quatre prélèvements par méthode d'extraction. Enfin, pour chaque technique d'extraction, deux prélèvements par longe ont été effectués sur deux longues de listao provenant d'individus différents et ont été utilisés comme témoins.

### **C. Dosage et évaluation de la qualité de l'ADN**

Le dosage et l'évaluation de la qualité de l'ADN sont estimés par spectrophotométrie (Denovix DS-11) à 260 nm (coefficient d'extinction molaire de 50 ng/cm/μl pour l'ADN double brin) et en établissant les rapports des densités optiques (DO) 260/230 et 260 /280. Les extraits d'ADN sont ensuite dilués à une concentration finale de 100 ng/μL et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

### **D. Sélection des amorces et des sondes permettant l'identification des espèces**

Avant de réaliser le dessin des sondes et des amorces spécifiques à chaque espèce de thon, des études des variations inter- et intraspécifiques ont été réalisées. L'objectif de ces études consistait à déterminer les régions contenant des sites spécifiques de l'espèce à identifier permettant de discriminer l'ensemble des individus de cette espèce. Les séquences des gènes ont été obtenues sur NCBI (National Center for Biotechnology Information - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). L'ensemble des séquences d'un gène a été aligné avec le logiciel MultAlin (<http://MultAlin.toulouse.inra.fr/MultAlin/> ; Corpet, (1988)).

La région non codante D-Loop ou région de contrôle a été étudiée ainsi que les gènes codant pour le cytochrome b (Cyt b), la NADH déshydrogénase sous-unité 1 (ND1), la NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND2), l'ATP synthase sous-unité 6 (ATP6), l'ATP synthase sous-unité 8 (ATP8), la cytochrome oxydase sous-unité 1 (COI), la cytochrome oxydase sous-unité 2 (COII), la cytochrome oxydase sous-unité 3 (COIII), l'ARNr 16S, l'ARN 12S, le NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (Idha), l'espaceur intergénique transcrit 1 (ITS1), l'espaceur

intergénique transcrit 2 (ITS2), la rhodopsine RH1, l'ARN 5 S, l'ARN 18 S et l'actine. Il s'agit pour la plupart de gènes mitochondriaux, auxquels s'ajoutent certains gènes nucléaires.

Le logiciel libre de bio-informatique Primer3plus a été utilisé pour faciliter le dessin des amorces et des sondes (<http://primer3plus.com/>; [Untergasser et al., \(2012\)](#)). Suite à l'obtention des couples d'amorces/sonde, des étapes de contrôle ont été réalisées afin de s'assurer qu'il n'y avait pas d'hybridation entre les amorces et/ou avec la sonde (dimère, structures secondaires...) et le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) a été utilisé afin de vérifier la spécificité des amorces et des sondes pour l'espèce recherchée (reconnaissance spécifique et absence de similarité avec d'autres espèces). Une dernière vérification a été effectuée en alignant les couples d'amorces/sonde avec la séquence du gène.

Les amorces et les sondes ont été commandées auprès de la société TIB MOLBIOL (Berlin ; Allemagne).

### **E. PCR en point final**

Les réactions de la PCR ont été réalisées avec un volume final de 20  $\mu\text{L}$  par puits. Chaque puits contenait 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  d'ADN, 0,5  $\mu\text{M}$  de chaque amorce, 10  $\mu\text{L}$  du mix du kit Light Cycler 480 Probes Master (Roche ; France). De l'eau stérile exempte de RNase et de DNase a été utilisée pour ajuster au volume final souhaité (Roche, France). Les PCR ont été effectuées avec le thermocycleur LightCycler 480 (Roche, France) avec les conditions suivantes : une étape à 95°C durant 10 min suivi de 40 cycles (95°C durant 15 sec, 60°C durant 1 min et 72°C durant 1 min). Les amorces spécifiques à l'espèce ont été testées sur de l'ADN de thon albacore, de thon obèse et de listao avec du tissu cru et du tissu appertisé en dupliquât.

### **F. Migration électrophorétique**

Des gels à 2 % d'agarose (Eurobio ; France) ont été réalisés avec du tampon TBE (Tris/Borate/EDTA; Eurobio ; France) et du BET (Eurobio ; France). Le dépôt des échantillons dans les puits a été réalisé en ajoutant 5 $\mu\text{L}$  d'échantillon d'ADN issu de la PCR et 1 $\mu\text{L}$  de tampon de charge (Eurobio ; France). La taille des produits d'amplification a été vérifiée par comparaison avec un standard (marqueur



EUROLADDER ; Eurobio ; France). La migration a été réalisée à 120 Volts durant 1 heure. A la fin de la migration, les gels ont été révélés sous UV. Les amplicons ont ensuite été séquencés *via* la méthode de SANGER par l'entreprise GENOSCREEN (Lille ; France).

### **G. PCR en temps réel**

Les réactions de la PCR ont été réalisées avec un volume final de 20 µl par puits contenant 10 ng/µL d'ADN, 0,5 µM de chaque amorce, 0,2 µM de la sonde, 10 µL du mix du kit Light Cycler 480 Probes Master (Roche ; France) et de l'eau stérile (RNase/DNase-free) pour ajuster au volume final (Roche, France). Les PCR ont été effectuées avec le thermocycleur LightCycler 480 (Roche, France) selon les conditions suivantes : un cycle de dénaturation initiale à 95°C durant 10 min., suivie de 40 cycles d'amplification (dénaturation à 95°C durant 15 secondes et hybridation à 60°C durant 1 min). Les données de fluorescence ont été analysées à l'aide du logiciel LightCycler 480 (LightCycler® SW 1.5.1). Chaque résultat de cycles de quantification (Cq) représente la moyenne des Cq issus de trois répétitions.

### **H. Construction des courbes standards de quantification**

Une série de dilutions en cascade au 10<sup>ème</sup> a été réalisée à partir d'un extrait d'ADN contenant une seule espèce de 100 à 0,01 ng/µl. Après la qPCR, la droite de régression a été calculée à partir de l'ensemble des points obtenus (Cq vs concentration). Cette droite de régression correspond à la courbe standard de référence qui sert à quantifier les concentrations d'échantillons inconnus à partir d'échantillons standards connus. Les courbes standards et les efficacités ont été calculées par le logiciel LightCycler 480. Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) a été calculé via le logiciel PAST (PAleontological STatistics version 3.07).

### **I. Les stratégies de quantification**

Les quatre prélèvements par boîte ont été traités en dupliquât au cours de la PCR en temps réel (soit 32 points d'analyse pour chaque mélange).

#### **1. Méthode basée sur la quantification absolue avec standard externe**

Les concentrations d'une espèce sont déduites des courbes standards correspondantes à chaque espèce. Ces mesures ont été transformées en

pourcentages d'une espèce où le pourcentage d'une espèce est calculé suivant les équations :

$$\text{Equation 1 : Pourcentage de l'espèce A (\%)} = \frac{[\text{Espèce A}]}{[\text{ADN total}]} * 100$$

$$\text{Equation 2 : Pourcentage de l'espèce B (\%)} = \frac{[\text{Espèce B}]}{[\text{ADN total}]} * 100$$

où [ADN total] correspond à la concentration totale en ADN (dans le cas d'un mélange binaire, l'ADN est égal à ([Espèce A] + [Espèce B])).

## **2. Méthode basée sur la quantification relative avec standard externe**

Pour chaque espèce de thon étudiée, deux courbes standards ont été construites en parallèle, l'une pour l'espèce cible et l'autre pour le gène endogène. Les concentrations correspondant à l'espèce cible et au gène endogène de l'ARN 12S sont déduites des courbes standards pré-établies. Les pourcentages de chaque espèce sont obtenus en suivant les équations utilisées par l'équipe de [Iwobi et al., \(2015\)](#) :

$$\text{Equation 3 : Pourcentage de l'espèce A (\%)} = \frac{[\text{Espèce A}]}{[\text{ARN 12S}]} * 100$$

$$\text{Equation 4 : Pourcentage de l'espèce B (\%)} = \frac{[\text{Espèce B}]}{[\text{ARN 12S}]} * 100$$

où [ARN 12S] correspond à la concentration totale en ADN.

## **J. Le LOQ et le LOD**

Les valeurs de la limite de détection (LOD) et de la limite de quantification (LOQ) sont obtenues en effectuant des dilutions en série pour chacune des espèces ([Armbruster et Pry, \(2008\)](#), [Bustin et al., \(2009\)](#)). La LOD a été évaluée comme la plus faible quantité d'ADN de thon qui peut être distinguée de manière fiable alors que la LOQ a été évaluée comme la plus faible concentration à laquelle la quantité d'ADN de thon ne peut pas être détectée de manière fiable.

## **K. Inter-calibration de la méthode**

La méthode d'identification et de quantification a été testée à l'aide de différents appareils de PCR en temps réel, de différents kits et dans différents laboratoires : appareil LightCycler 480 (Anses ; Boulogne-sur-Mer), Bio-Rad CFX96 TM Real

time system (Ifremer ; Nantes), Stratagene MXPRO-MX 3000P Quantitative PCR system (Ifremer ; Nantes), Biosystems 7500 Fast real time PCR (PFINV ; Boulogne-sur-Mer) et digital PCR Fluidigm's BioMark (Anses ; Maisons-Alfort).

### **L. Statistiques**

Les données ont été analysées avec le test Chi-2. Le logiciel PAleontological STatistics (PAST ; version 3.07) a été utilisé pour comparer les pourcentages obtenus avec les pourcentages réels. Enfin, les valeurs des Cq ont été comparées en utilisant un test t de Student indépendant avec un  $p < 0,05$ .

# Résultats et discussion



Les objectifs initiaux du projet étaient de développer, pour les professionnels du secteur, des outils analytiques, pouvant leur permettre de contrôler la nature des espèces de thon présentes dans leurs produits, de lutter plus efficacement contre d'éventuelles fraudes ou pratiques déloyales, et d'aboutir au final à une plus grande loyauté des transactions commerciales dans ce secteur.

La méthode à développer devait être applicable à l'analyse de produits transformés et en particulier aux produits appertisés, et ceci quel que soit le procédé de fabrication mis en œuvre. Cette méthode devait, dans la mesure du possible, être quantitative pour permettre de distinguer les contaminations croisées « fortuites » des éventuelles substitutions volontaires.

Trois espèces ont été choisies car elles font partie des espèces les plus utilisées pour la fabrication de produits appertisés en industrie agroalimentaire. Il s'agit du listao (*Katsuwonus pelamis*), du thon albacore (*Thunnus albacares*) et du thon obèse (*Thunnus obesus*).

La PCR quantitative a été choisie pour développer une méthode d'identification et de quantification de ces espèces de thon dans des produits transformés. Dans un premier temps, notre démarche a consisté à adapter la méthode d'extraction de l'ADN aux produits appertisés, puis de sélectionner les couples d'amorces/sonde permettant d'identifier les trois espèces de thon. Les couples spécifiques à l'espèce ont ensuite été testés avec différentes stratégies de quantification. Enfin, notre dernière démarche a consisté à évaluer la méthode sur des boîtes de conserve issues du commerce.

### **A. Extraction de l'ADN**

L'application des traitements thermiques au cours de la stérilisation induit une dégradation de l'ADN, ce qui affecte sa pureté, sa quantité et sa qualité ([Bauer et al., \(2003\)](#), [Michelini et al., \(2007\)](#), [Ram et al., \(1996\)](#), [Unsel et al., \(1995\)](#)). Il était donc nécessaire d'avoir une méthode d'extraction de l'ADN optimale, permettant d'avoir une quantité et une qualité suffisante d'ADN extrait pour réaliser les essais.

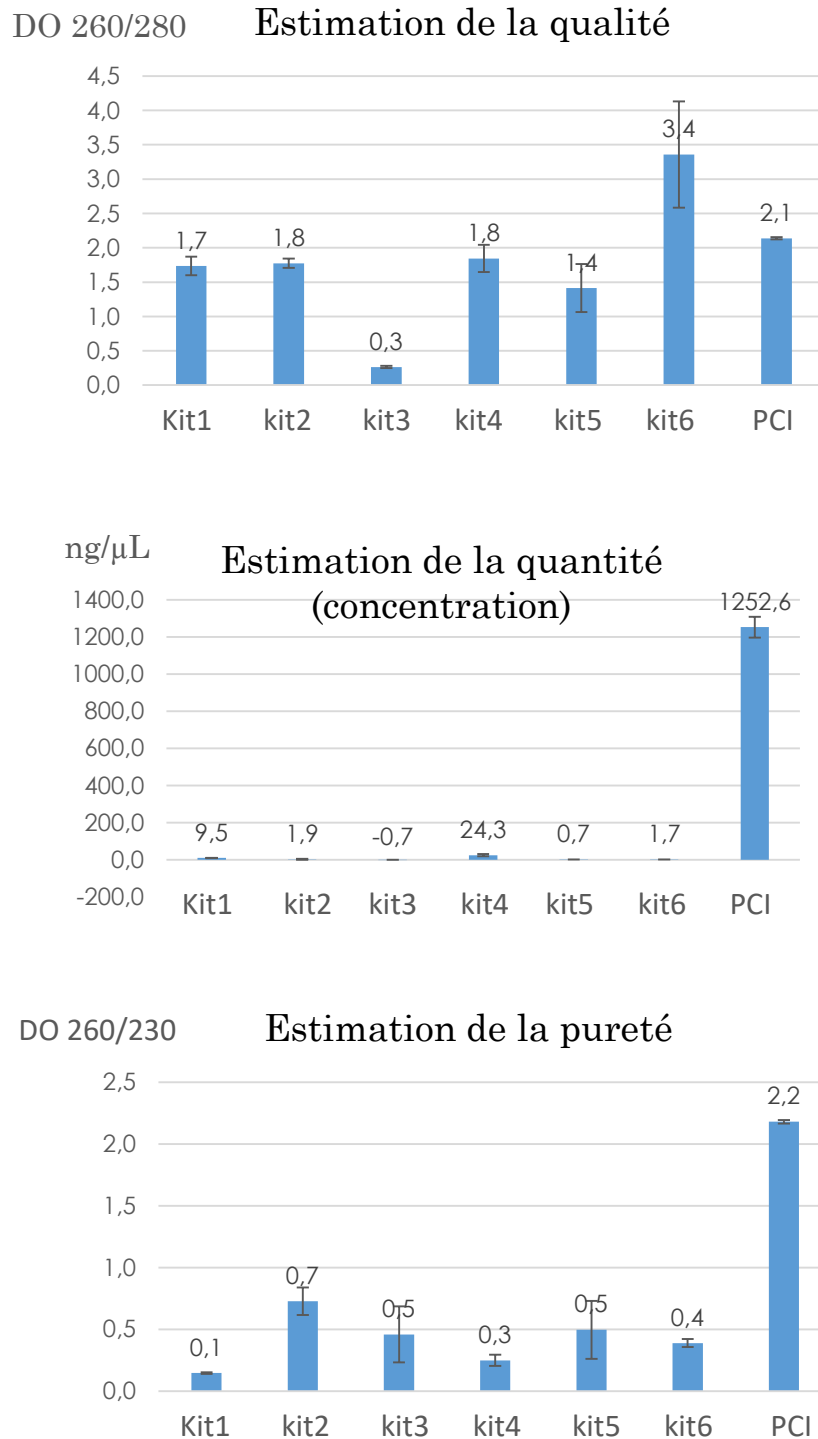
Une des premières adaptations nécessaires a été de déterminer les prétraitements les plus efficaces permettant de « nettoyer » les échantillons du liquide de couverture (saumure ou huile) qui ont, en général, pour effet d'inhiber

la PCR. Les prétraitements réalisés ont été un séchage au papier-filtre qualitatif afin d'enlever le surplus de liquide de couverture, puis un lavage à l'éthanol et un rinçage à l'eau (avec un séchage au papier-filtre après chaque étape). Ce mode de prétraitement s'effectue juste avant l'extraction de l'ADN. Il est plus rapide que le bain de chloroforme/méthanol/eau en trempage qui nécessite une durée de trempage d'une nuit ([Unsel et al., \(1995\)](#)).

Une seconde adaptation a consisté à définir le mode de prélèvement à partir de boîtes de thon. En effet, au sein d'une même boîte, plusieurs longes provenant d'individus différents peuvent être retrouvées (Figure 16 page 68). Or, cela pouvait induire des erreurs d'identification et de quantification, si le prélèvement était effectué uniquement sur une longe. Dans le but d'avoir une méthode fiable, reproductible et représentative de la boîte de conserve, son contenu a été mixé de façon homogène, puis des prélèvements aléatoires ont été réalisés dans le mélange obtenu.

Différentes méthodes d'extraction de l'ADN ont été étudiées (Tableau V page 69) afin de comparer leur efficacité, leur rendement et la qualité de l'ADN extrait. Les résultats montrent que les kits 2 (DNeasy Mericon Food ; Qiagen) et 4 (Wizard SV DNA purif system ; Promega) permettent d'avoir une bonne qualité de l'extrait de l'ADN car les valeurs des ratios 260/280 sont comprises entre 1,8 et 2 (Figure 17 page 79). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le kit 2 est un kit adapté et développé pour les produits alimentaires contenant de l'ADN dégradé et/ou des additifs (sels, sauces, huile...). Le kit 4 permet également d'obtenir un extrait d'ADN de bonne pureté, certainement dû au nombre d'étapes de lavage plus important permettant une meilleure élimination des contaminants. La méthode PCI, malgré une valeur moyenne de 2,1, peut être utilisée, avec une optimisation de l'étape de lavage à l'éthanol.

Hormis pour la méthode PCI où la valeur moyenne des DO 260/230 était de 2,2, les valeurs de DO étaient inférieures à 1 pour l'ensemble des kits, ce qui signifiait la possible présence d'ARN ou de nucléotides libres (Figure 17 page 79). Cependant, dans notre cas, ces résultats sont des résultats attendus, puisque les extractions de l'ADN étaient réalisées à partir de produits appertisés. Les ARN



**Figure 17 : résultats obtenus *via* le spectrophotomètre Denovix DS-11 pour les extractions d'ADN sur le tissu appertisé en fonction du kit et de la méthode d'extraction de l'ADN**

Kit 1 : Dneasy Blood & Tissue (Qiagen) ; Kit 2 : Dneasy Mericon Food (Qiagen) ; Kit 3 : Wizard Genomic DNA Purif (Protocole Anses) ; Kit 4 : Wizard SV DNA purif system (Promega) ; Kit 5 : Genomic DNA from tissue (Machery-Nagel) ; Kit 6 : Genomic DNA from food (Machery-Nagel) ; PCI : méthode Phénol/Chloroforme/alcool Isoamylique



étant extrêmement sensibles, ils sont dégradés au cours de la stérilisation tout comme l'ADN qui est également dégradé et fragmenté ([Tanaka et al., \(2006\)](#)). Il est ainsi fort probable que les ADN extraits contenaient des nucléotides libres. Ces résultats sont confortés par le fait que les valeurs moyennes des rapports DO 260/230 sont égales à  $2 \pm 0,1$  pour des extractions d'ADN issus de tissu cru.

La méthode PCI a permis d'obtenir une concentration moyenne de 1252,6 ng/μL, tandis qu'une concentration moyenne de 9,5 ng/μL a été obtenue avec le kit 1 (DNeasy Blood & Tissue ; Qiagen), 1,9 ng/μL avec le kit 2 (DNeasy Mericon Food ; Qiagen) et 24,3 ng/μL avec le kit 4 (Wizard SV DNA purif system ; Promega) (Figure 17 page 79). Ces trois kits ayant donné des résultats intéressants pour les ratios 260/280, nous avons cherché à savoir s'il était possible d'optimiser les quantités obtenues en faisant varier différents paramètres, tels que l'augmentation du temps de lyse (de moins d'une heure à une nuit), l'utilisation de différents types de protéinase K (protéinase K des différents kits ou la protéinase K de chez Roche), l'augmentation des temps de centrifugation, de lavage ou de séchage. Finalement, des résultats similaires ont été obtenus avec l'ensemble des paramètres testés. Ainsi, au vu des valeurs des rapports de DO 260/280 et 260/230 ainsi que celles des quantités de l'ADN obtenues, la méthode PCI a été sélectionnée pour mettre au point la méthode d'identification et de quantification, car elle répondait au mieux à nos attentes, concernant la quantité d'ADN extrait, sa qualité et sa pureté. Nos résultats corroboraient ainsi les résultats précédemment obtenus par [Jérôme et al., \(2003a\)](#).

Toutefois, l'utilisation de cette méthode en analyse de routine serait à éviter du fait de la manipulation de phénol ainsi que de sa longue durée (1,5 jour au lieu de 1h à une demi-journée pour les kits). L'équipe de l'Ifremer de Nantes a poursuivi les investigations sur différents méthodes et kits d'extraction dans le but du développement d'une méthode pratique et rapide pour des tests en routine en laboratoire d'analyse. La méthode PCI (méthode de référence) ainsi que cinq kits ont été choisis : le kit ChargeSwitchForensic DNA (Invitrogen) ; la méthode PCI (Ifremer) ; le kit Wizar® Genomic DNA Purification (Promega) ; le kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) ; le kit Extracta DNA Prep for PCR Tissue (Quanta Biosciences) et le kit Genomic DNA from food (Machery-Nagel). L'ensemble des

kits et la méthode PCI ont été testés sur des conserves de thon du commerce (au naturel, à l'huile de tournesol, d'olive, avec ou sans différents ingrédients tels que épices, tomates séchées, harissa, basilic, thym, curry..., avec ou sans sauce (catalane, citron, tomate, mayonnaise...). Les valeurs des concentrations des DO280/260, des produits PCR obtenus par PCR en point final et des courbes d'amplification obtenues par qPCR ont été comparées. Des couples universels ciblant le gène 16S ont été utilisés pour les tests par PCR et qPCR.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les différents kits techniques testés, le kit Genomic DNA from food (Machery-Nagel) donnait des résultats intéressants, après avoir optimisé le temps de lyse (jusqu'à 2 h au lieu des 30 min. préconisées). La quantité d'ADN extrait obtenue n'était pas dans tous les cas importante, mais elle restait suffisante pour l'obtention d'amplifications correctes en qPCR. Cette méthode a surtout pour avantage de pouvoir être automatisable, rapide (moins d'une journée), simple, peu coûteuse (3,48 € par échantillon). Toutefois, cette méthode optimisée pour les produits alimentaires restait dépendante de la nature de l'échantillon traité (les échantillons issus de conserves de thon à l'huile donnaient de meilleurs résultats) comme l'avait également démontré [Chapela et al., \(2007\)](#). La méthode PCI reste la méthode la plus fiable car elle donnait des résultats similaires quel que soit le type d'échantillon extrait. La méthode PCI reste aussi la méthode de référence pour l'extraction de l'ADN des standards externes qui permettent d'établir les courbes de standard (séries de dilution au 10<sup>ème</sup> d'un extrait à 1000 ng/μL), car les kits testés ne permettaient pas d'obtenir des extraits d'ADN avec des concentrations supérieures à 1000 ng/μL. Une des perspectives qui peut être proposée, serait d'avoir une courbe standard avec des concentrations inférieures à 1000 ng/μL.

## **B. Etude et sélection des marqueurs d'intérêt pour l'identification des espèces de thon**

Dans cette étape, nous avons cherché à définir les gènes qui apparaissaient les plus intéressants pour notre étude. L'ensemble des séquences de gènes mitochondriaux présentes à l'époque dans la base de données NCBI pour les espèces de thon ont été répertoriés. Il s'agit de la région non codante D-Loop ou région de contrôle, des gènes codant pour le cytochrome b (Cyt b), la NADH

déshydrogénase sous-unité 1 (ND1), la NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND2), l'ATP synthase sous-unité 6 (ATP6), l'ATP synthase sous-unité 8 (ATP8), la cytochrome oxydase sous-unité 1 (COI), la cytochrome oxydase sous-unité 2 (COII), la cytochrome oxydase sous-unité 3 (COIII) et l'ARNr 16S.

Outre ces gènes mitochondriaux, des gènes nucléaires ont aussi été sélectionnés tels que celui de l'actine, qui est un gène couramment utilisé comme contrôle interne ([Asensio, \(2007\)](#)). Il s'agit d'un gène codant pour une protéine majoritaire participant à la contraction musculaire et aux mouvements cellulaires. Ce gène a surtout pour qualité de coder une protéine ubiquitaire, présente dans toutes les cellules et il peut donc être utilisé comme gène de référence ou de contrôle. D'autres gènes nucléaires ont été sélectionnés, tels que le gène *Idha* (inositol 2-dehydrogenase gene) responsable du catabolisme de l'inositol ([Ely et al., \(2002\)](#)), le gène de la rhodopsine RH1 (pigment protéique photosensible) ([Abdullah et Rehbein, \(2014\)](#)), le gène de la parvalbumine ([Abdullah et Rehbein, \(2015a\)](#)), les gènes codant pour les ARNr 18S ([Santacilara et al., \(2006\)](#)) et 5S ([Dalmaso et al., \(2006\)](#)), ainsi que les gènes des régions intergéniques ITS1 ou 2 ([López-Piñón et al., \(2002\)](#) ; [Aguilera-Muñoz, \(2008\)](#) ; [Viñas et Tudela, \(2009\)](#)) encadrant le gène de l'ARNr 5S.

L'ensemble des séquences de ces gènes disponibles dans les bases de données publiques a été collecté pour les 16 espèces de l'étude, sachant que les séquences obtenues étaient soit partielles, soit des séquences complètes ou des séquences extraites directement du génome complet de l'ADN mitochondrial.

A l'issue de cette étude, plus de 3600 séquences de gènes ont été répertoriées contenant les informations nécessaires pour la poursuite des travaux.

A partir de ces séquences de gènes, des alignements des séquences ont été réalisés pour la caractérisation des variations inter- et intraspécifiques. Toutefois, la plupart des séquences issues de gènes nucléaires comme le gène de l'actine, de l'ARNr 18S, de l'ARNr 5S et du gène *Idha* n'ont pas pu être utilisées pour les alignements, soit parce qu'il n'y avait pas de séquence disponible, soit parce qu'il n'y avait pas suffisamment de séquence pour l'ensemble des espèces. Par exemple, pour le gène de l'ARNr 5S, une seule séquence a été répertoriée à l'époque et uniquement pour l'espèce *Thunnus thynnus* bien que la séquence du

gène de l'ARNr 5S pour l'espèce *Katsuwonus pelamis* ait été séquencée par [Dalmasso et al., \(2006\)](#), mais celle-ci n'a pas été déposée dans les bases de données telles que NCBI (Tableau VI page 83).

**Tableau VI : synthèse des résultats obtenus pour les gènes nucléaires**

Idha (inositol 2-dehydrogenase gene)

Gènes utilisés	Nombre de séquences obtenues	Possibilité de couple
Idha	Pas de séquence	Pas de couple
Rhodopsine RH1	20 séquences pour le thon albacore 13 séquences pour le listao 18 séquences pour le thon obèse 51 séquences pour les autres thons et apparentés au thon	1 couple pour le thon obèse
Parvalbumine	22 séquences pour 4 espèces Pas suffisamment de séquences et d'espèces pour un design significatif	Pas de couple
ARNr 18S	1 séquence disponible à l'époque pour <i>Thunnus orientalis</i>	Pas de couple
ARNr 5S	Une séquence pour <i>Thunnus thynnus</i>	Pas de couple
Régions intergéniques ITS1	96 séquences pour les 16 espèces sauf <i>Euthynnus alletteratus</i> , <i>Sarda sarda</i> et <i>Sarda chiliensis</i> Présence d'intervalle entre les espèces	Pas de couple
Régions intergéniques ITS2	22 séquences pour <i>Auxis rochei</i> et 1 pour <i>Auxis thazard</i>	Pas de couple
Actine	Pas de séquence	Pas de couple

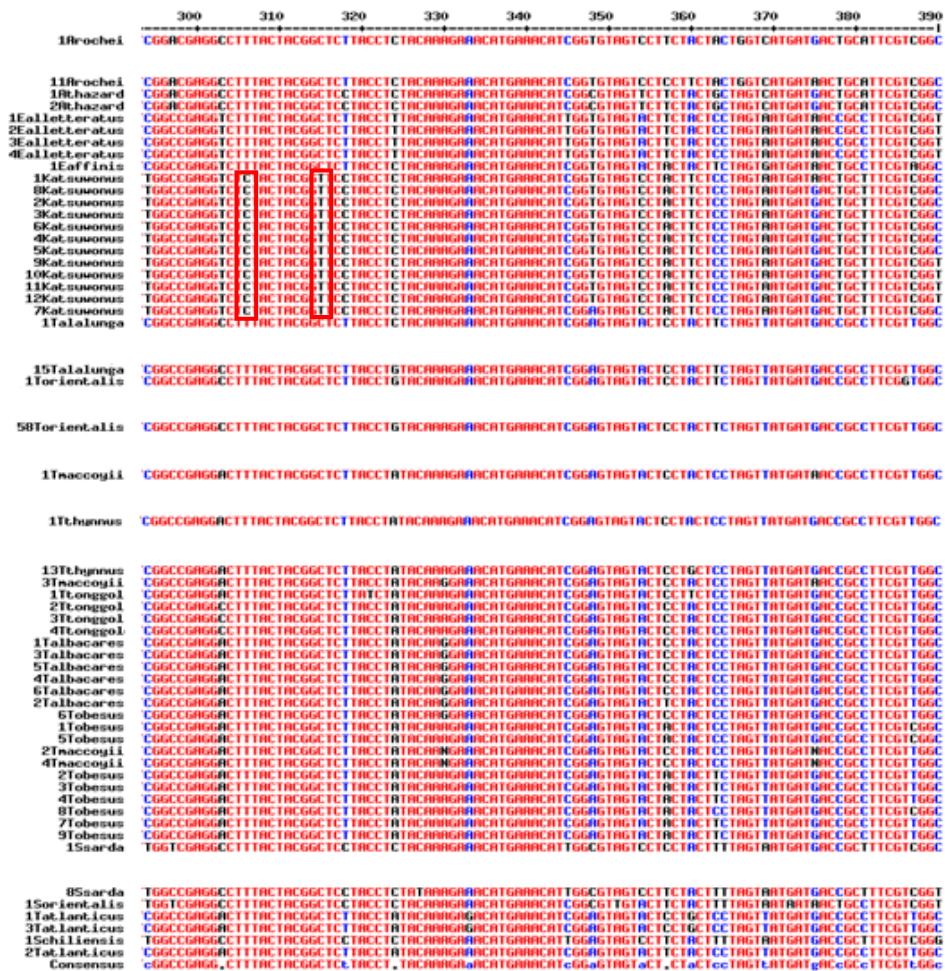
### 1. Recherche des variations interspécifiques entre les espèces de thon et assimilées au thon

L'objectif de l'analyse des variations interspécifiques est de trouver les régions discriminantes pour chaque espèce permettant le dessin des amorces et des sondes.

Un alignement des séquences de l'ensemble des 16 espèces de thon répertoriées pour un gène donné a donc été réalisé. Dans certains cas, comme celui du gène de l'ATP6, aucune séquence n'a été obtenue pour les espèces telles que *Euthynnus affinis*, *Sarda orientalis*, *Sarda chiliensis* ou *Thunnus tonggol*. De plus, le génome mitochondrial n'avait pas été séquencé pour ces espèces au moment de l'étude.

Cette analyse des séquences a permis de vérifier la proximité génétique entre les espèces de thon comme cela avait été démontré précédemment ([Viñas et Tudela, \(2009\)](#)). En effet, les différences entre les espèces *Thunnus albacares*, *Thunnus obesus* et *Katsuwonus pelamis* ne sont liées qu'à quelques nucléotides. A titre d'exemple, sont représentées sur la Figure 18 page 84, les variations

interspécifiques concernant le gène du cytochrome b pour l'espèce *Katsuwonus pelamis*.



**Figure 18 : Exemple de mise en évidence des variations interspécifiques du gène du cytochrome b pour l'espèce *K. pelamis***

L'alignement des séquences a été réalisé avec des séquences d'une portion de 129 pb de la séquence totale du gène du cytochrome b. Le logiciel d'alignement utilisé est le logiciel MultAlin ; les variations interspécifiques sont encadrées en rouge. La couleur rouge représente les nucléotides conservés ; les nucléotides faiblement conservés sont représentés en bleu et les nucléotides différents sont représentés en noir

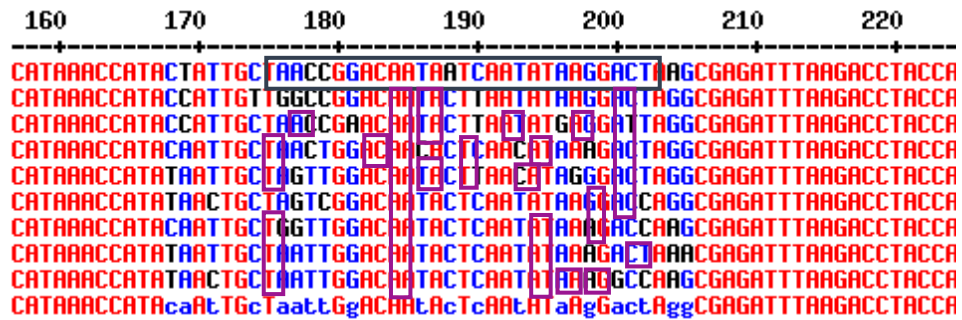
Au final, face à la proximité génétique entre les espèces et plus particulièrement entre le thon albacore et le thon obèse, parmi l'ensemble des gènes étudiés, seuls les gènes du cytochrome b (Cyt b), de la NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND2), de la cytochrome oxydase sous-unité 1 (COI), de la cytochrome oxydase sous-unité 2 (COII), de l'ARNr 16S, de la rhodopsine RH1 et de l'ARN 12S ont pu être sélectionnés pour la conception des amorces et des sondes suivant différentes combinaisons.

## 2. Recherche des variations intraspécifiques entre les espèces de thon et assimilées au thon

Une étude des variations intraspécifiques a été réalisée en alignant les séquences d'un gène obtenu pour une espèce *via* le logiciel de bio-informatique MultAlin (<http://MultAlin.toulouse.inra.fr/MultAlin/> ; [Corpet, \(1988\)](#)). En effet, cet alignement permet de mettre en lumière les régions contenant des nucléotides similaires et différents ([Albaina et al., \(2013\)](#)). Cela permet de déterminer et de révéler le niveau élevé ou faible du polymorphisme nucléotidique intraspécifique ([Chow et Inoue, \(1993\)](#) ; [Chow et al., \(2000\)](#) ; [Lockley et Bardsley, \(2000a\)](#) ; [Bottero et al., \(2007\)](#) ; [Michelini et al., \(2007\)](#)). A titre d'exemple, le marqueur ITS1 possédait un faible niveau de polymorphisme intraspécifique et il constitue un marqueur hautement conservé chez le thon ([Viñas et Tudela, \(2009\)](#)). L'objectif final de cette analyse consistait avant tout à trouver les variations intraspécifiques afin de ne pas les inclure dans le dessin des amorces et des sondes. En effet, il était nécessaire de pouvoir définir des amorces et des sondes permettant d'identifier l'ensemble des individus d'une espèce et pas uniquement quelques individus de l'espèce. De plus, les variations intraspécifiques peuvent induire des faux positifs ou des faux négatifs ([Lockley et Bardsley, \(2000b\)](#), [Michelini et al., \(2007\)](#), [Sánchez et al., \(2009\)](#)).

La région non codante D-Loop ou région de contrôle a retenu toute notre attention (voir Figure 19 page 86). Il a effectivement fait l'objet d'un stage réalisé par Astrid FOVET en 2<sup>ème</sup> année de préparation du DUT Génie Biologique option Industries Agroalimentaires et Biologiques (IAB) à l'IUT du Littoral Côte d'Opale (Boulogne-sur-Mer) en 2014.

La région non codante D-Loop fait partie des gènes les plus utilisés pour l'identification des espèces de thon ([Alvarado Bremer et al., \(1997\)](#) ; [Chuang et al., \(2012\)](#) ; [Kumar et al., \(2012\)](#) ; [Pedrosa-Gerasmio et al., \(2012\)](#) ; [Kunal et al., \(2013\)](#)). Près de 1100 séquences ont été répertoriées pour celui-ci. Ces séquences ont été alignées pour les seize espèces de thon et assimilées. La région non codante D-Loop est un excellent candidat pour l'identification par séquençage et pour la méthode FINS. Il contient des zones riches en variations interspécifiques.

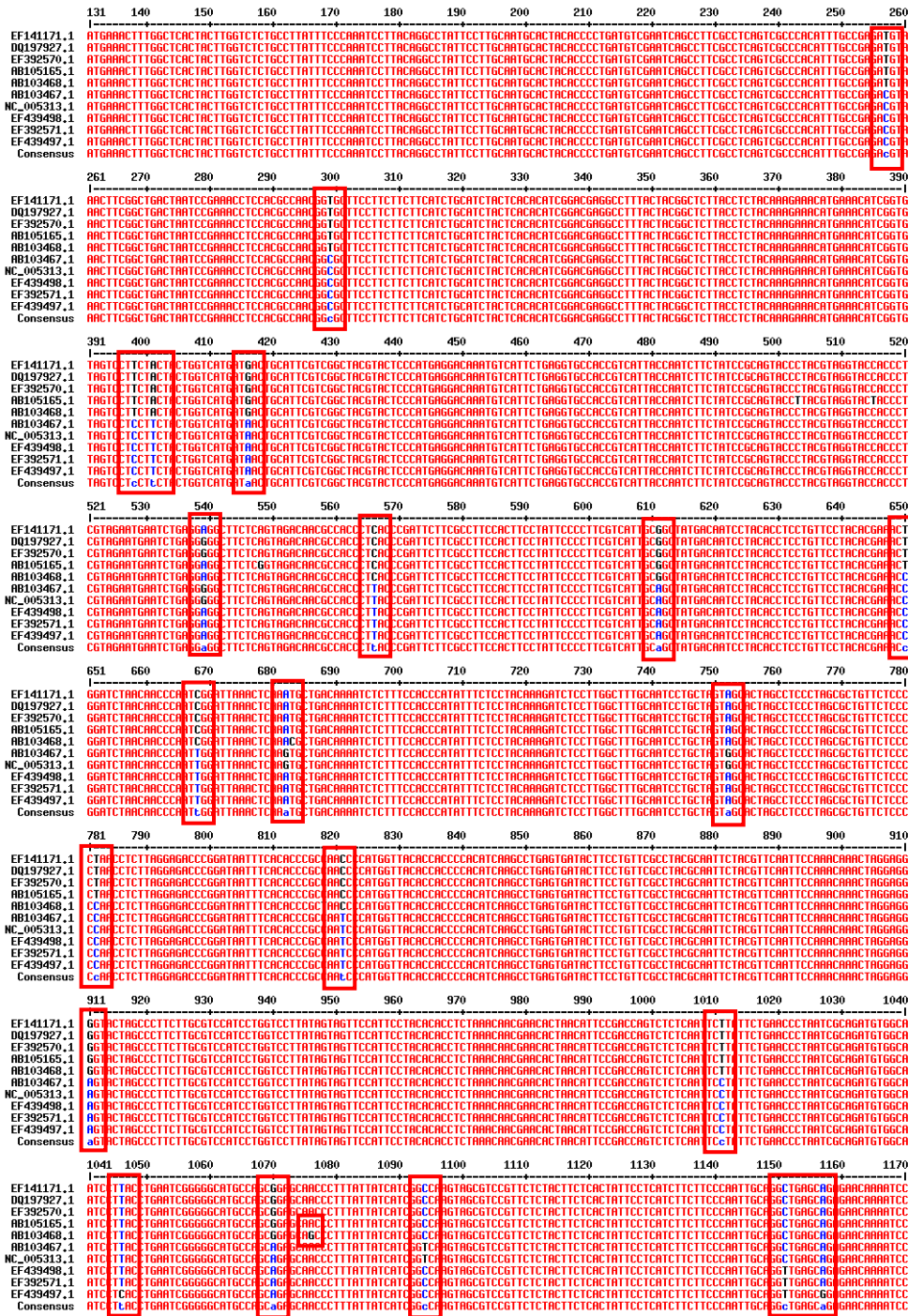


**Figure 19 : Exemple de variations intraspécifiques présentes chez *K. pelamis* pour la région non codante D-Loop ou région de contrôle**

L'alignement des séquences a été réalisé avec des séquences de la région non codante D-Loop ou région de contrôle pour l'espèce *K. pelamis*. Le logiciel d'alignement utilisé est le logiciel MultAlin ; les variations intraspécifiques sont encadrées en violet ; la couleur rouge représente les nucléotides conservés ; les nucléotides faiblement conservés sont représentés en bleu et les nucléotides différents sont représentés en noir

Mais, il était complexe de dessiner des amorces spécifiques pour les trois espèces de l'étude car dans tous les cas, la présence de variations intraspécifiques a été constatée. La région non codante D-Loop ou région de contrôle n'a donc pas été sélectionné pour le développement de la méthode d'identification et de quantification.

A titre d'exemple, sont représentées sur la Figure 20 page 87, les variations intraspécifiques concernant le gène du cytochrome b pour l'espèce *Auxis rochei*.



**Figure 20 : Exemple de la présence de variations intraspécifiques pour l'espèce *Auxis rochei* après alignement des séquences du gène du cytochrome b**

L'alignement des séquences a été réalisé avec des séquences du gène du cytochrome b pour l'espèce *Auxis rochei*. Le logiciel d'alignement utilisé est le logiciel MultAlin ; les variations intraspécifiques sont encadrées en rouge ; la couleur rouge représente les nucléotides conservés ; les nucléotides faiblement conservés sont représentés en bleu et les nucléotides différents sont représentés en noir



### C. Obtention des couples d'amorces/sonde spécifiques aux espèces de l'étude

Les études des variations interspécifiques ont permis de montrer la proximité génétique existante entre les espèces de thon, conduisant à l'obtention de zones nucléotidiques contenant des variations interspécifiques peu nombreuses, rares et limitées à quelques nucléotides pour une espèce donnée. [Bottero et al., \(2007\)](#) ont montré que lorsque les espèces sont du même genre (*Thunnus*), le dessin des amorces spécifiques à l'espèce n'était pas toujours possible. De ce fait, les couples amorces/sonde ont été conçus suivant les combinaisons présentées dans le Tableau VII ci-dessous.

**Tableau VII : Combinaisons utilisées pour le dessin des amorces et des sondes**

	Amorce sens		Amorce anti-sens		Sonde TaqMan
	SP	NSP	SP	NSP	SP
Combinaison 1	X	-	X	-	X
Combinaison 2	X	-	-	X	X
Combinaison 3	-	X	X	-	X
Combinaison 4	-	X	-	X	X
Combinaison Univ	SPE		SPE		SPE

SP : spécifique à l'espèce

Univ : Amorces universelles

NSP : Non spécifique à l'espèce

SPE : Spécifique à l'ensemble des espèces

Le résultat de cette prospection réalisée à l'aide des séquences de gènes sélectionnées précédemment a permis la sélection et le dessin de 36 couples d'amorces associés à une sonde et conçus à partir des gènes du cytochrome b, de la NADH déshydrogénase sous-unité 2, de la cytochrome oxydase sous-unité 1 (COX I), de la cytochrome oxydase sous-unité 2 et de la Rhodopsine RH1 (Tableau VIII page 89). 18 couples ont été obtenus pour le listao, ce qui peut s'expliquer par le fait que le listao est une bonite. De ce fait, les différences morphologiques et donc génétiques sont obtenues plus aisément par rapport aux thons albacore et obèse, d'où l'obtention de couples plus nombreux et pour chacun des gènes mitochondriaux cités précédemment.

Le thon obèse a été l'espèce pour laquelle, il y avait moins de couples amorces/sonde conçus, d'une part à cause de la proximité génétique existant avec les autres espèces de thon et d'autre part, à cause du nombre de séquences

restreintes pour cette espèce commercialement importante, mais finalement génétiquement peu étudiée.

### Tableau VIII : Synthèse des couples amorces/sonde obtenus à partir des gènes mitochondriaux

Cytochrome oxydase sous-unité (Cyt b) ; NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND2) ; Cytochrome oxydase sous-unité 1 (COX I); Cytochrome oxydase sous-unité 2 (COX II) ; Rhodopsine RH1 (Rhod)

		Marqueurs génétiques						Rod	Autres	Total
		Cyt b	ND2	COI	COII	ARNr 16S	ARNr 12S			
Couples amorces/sonde	Listao	6	6	4	2	-	-	-	-	18
	Albacore	-	2	-	7	-	-	-	-	9
	Obèse	-	5	-	-	-	-	1	-	6
	Universels	-	-	-	-	2	1	-	-	3
Total		6	13	4	9	2	1	1	-	36

Les caractéristiques des couples amorces/sonde sont détaillées en Annexe 1 page 141. Les couples amorces/sonde ont été doublement vérifiés, d'une part en examinant leur position en les alignant avec l'ensemble des séquences du gène utilisé, d'autre part en réalisant un BLAST afin de vérifier la spécificité des couples pour les espèces de thon albacore, de thon obèse et de listao.

Les couples d'amorces/sonde ont ensuite été testés sur les extraits d'ADN de tissus crus et de tissus appertisés afin de sélectionner les couples spécifiques les plus adaptés aux trois espèces de l'étude.

## D. Sélection des amorces par PCR en point final

### 1. Sur tissu cru

Les tests préliminaires des amorces ont été effectués par PCR en point final afin de sélectionner les couples d'amorces répondant aux mieux à nos attentes (amplification correcte, bonne taille des fragments, présence de spécificité, absence de fragments aspécifiques...).

Dans un premier temps, les premiers tests ont été réalisés à partir d'ADN extrait de tissu cru, ce qui a permis d'étudier les couples en absence de la dégradation de l'ADN liée à l'appertisation. Les couples d'amorces ont été testés sur les 3 espèces de l'étude. Les résultats ont montré que les couples d'amorces universelles sont

fonctionnels. Dans tous les cas, des produits PCR ayant la taille attendue ont été obtenus. De plus, il n'y avait pas d'amplification aspécifique. Les couples d'amorces spécifiques aux espèces à identifier qui répondaient à nos attentes ont été conservés puis testés sur le tissu appertisé. Toutefois, les tests des couples d'amorces spécifiques à l'espèce n'ont pas permis de différencier les trois espèces de l'étude entre elles.

## **2. Sur tissu appertisé**

Les couples d'amorces sélectionnés à partir des tests réalisés sur tissu cru ont ensuite été testés sur le tissu appertisé. Dans cette étape, nous avons cherché à vérifier si les amorces fonctionnelles sur les tissus crus étaient également opérationnelles sur les tissus appertisés. Une PCR en point final a été réalisée pour les mêmes raisons que précédemment, mais également afin d'apprécier l'impact de l'appertisation (présence ou absence d'amplification pour le tissu appertisé). Les amorces spécifiques à une espèce ont été testées sur les trois espèces de l'étude. Les résultats ont permis de sélectionner les couples d'amorces fonctionnels sur le tissu appertisé.

Toutefois, pour le tissu appertisé, des différences ont été remarquées au niveau de l'intensité des bandes (Figure 21 page 91).

Les amorces spécifiques au listao ont donné des produits PCR de taille attendue pour les trois espèces testées. Cependant, leur intensité était plus faible pour les espèces de thon albacore et obèse. En outre, les amorces spécifiques aux thons albacore et obèse ont donné des bandes de même intensité pour ces deux espèces et des bandes d'intensité plus faible pour le listao, voire une absence d'amplification dans certains cas, ce qui pouvait être lié à la dégradation de l'ADN.

Ces résultats confirment que les amorces fonctionnent car les produits PCR obtenus ont la bonne taille. Cela témoigne de la nécessité d'utiliser des sondes TaqMan pour développer une technique d'identification sans passer par le séquençage. Une étape de contrôle a été effectuée afin de valider les couples d'amorces.

		Espèce de thon						Taille (pb)
		Listao		Albacore		Obèse		
		Naturel	Huile	Naturel	Huile	Naturel	Huile	
Amorces spécifiques	Albacore ND2 2							190
	Obèse ND2 3							173
	Listao Cyt b 5							143
Témoin positif 16S								146
Témoin négatif								0

**Figure 21 : Exemple de produits PCR obtenus pour les amorces testées sur le tissu appertisé**

(après migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2% + BET et révélation aux UV)

Pour cela, les produits PCR ont été séquencés (Figure 22 ci-dessous). Le résultat du séquençage a démontré que l'ensemble des produits de PCR correspondaient bien aux séquences du gène amplifié.

➤ Amorces ALB\_NDII 1

CCAGCGCTTACATCACTTACCCTCTAGTTCCTGTCCCTAGGTGGCCTTCCACCACTCACAGGTTTCATGCCA  
AAATGACTAATCCTGCAAGAACTATCAAAGCAAGATCTAGCCCCGTGGCAACCCTAGCGGCCCTAAGCGCCT  
TACTCAGCCTCTACTTCTACCTGCGACTGTCTACGCAATGACTCTAACCATG

➤ Amorces OBE\_COI 3

CCAGTTCATGCCTGACTTCCAGAAGTCCTCAAGGTTTAGACCTTACAACGGGGCTGATCCTGTCTAC  
TGACAAAAACTCGCCCCCTTCGCCCTCATCTGCAAATCCATCCAACAAACC

➤ Amorces KP\_COI 1

TGCTGGAACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCCTTGCCGGTAACCTGGCTCAGCCGGAGCCTCTGTTGACCTAA  
CTATTTTCTCCCTCCATCTTGCAGGTGTTCTTCAATTCTGGAGCAATTAATTTATTACAACAATTATTAACATG  
AAACCTGCCGCTATCTCCAATACAAACTCCTCTGTTCTGATGAGC

**Figure 22 : Exemple de résultats du séquençage de produits PCR**

ALB\_NDII 1 : couple d'amorces ND2 1 amplifiant une partie de la séquence de la NADH déshydrogénase sous unité 2 et spécifique à l'espèce *Thunnus albacares*, OBE\_COI 3 : couple d'amorces COI amplifiant une partie de la séquence de la cytochrome oxydase sous-unité 1 et spécifique à l'espèce *Thunnus obesus*, KP\_COI 1 : couple d'amorce COI amplifiant une partie de la séquence de la cytochrome oxydase sous-unité 1 et spécifique à l'espèce *Katsuwonus pelamis*. Les produits PCR ont été séquencés et identifiés par la société Genoscreen. Un alignement de la séquence a été réalisé avec les amorces spécifiques représentées en jaune. Les zones contenant les variations interspécifiques correspondant à la sonde TaqMan sont représentées en bleu.

Ainsi, les couples d'amorces opérationnelles sur tissu appertisé ont été conservés pour effectuer les tests en PCR en temps réel.

### **E. Sélection des amorces et des sondes par PCR en temps réel**

Dans cette étape, les sondes TaqMan répondant au mieux à la problématique ont été sélectionnées. Les couples amorces/sonde ont été testés sur les trois espèces de l'étude. Les tests des sondes ont été effectués en premier lieu sur les tissus crus, puis sur les tissus appertisés. Les séquences utilisées pour définir les couples d'amorces/sonde sont répertoriées dans le Tableau IX page 93.

Les résultats présentés dans ce tableau montrent que pour le gène de la COII, des séquences ont été obtenues pour 15 espèces. Aucune séquence n'a été répertoriée pour l'espèce *Thunnus atlanticus*. Pour le gène de la ND2, des séquences ont été obtenues pour 12 espèces sauf pour les espèces *Thunnus atlanticus*, *Sarda orientalis* et *Euthynnus affinis*. Enfin, pour le gène de l'ARN 12S, des séquences ont été obtenues pour 14 espèces sauf pour les espèces *Sarda orientalis* et *Euthynnus affinis*.

Afin de sélectionner les couples amorces/sonde utilisés pour mettre au point les méthodes d'identification et de quantification, il a été nécessaire de tester 7 couples d'amorces/sonde afin d'obtenir une identification spécifique au listao, 9 couples pour le thon albacore et 5 couples pour le thon obèse (sachant que le nombre de couples pour le thon albacore et le thon obèse était limité en raison de la forte proximité génétique entre ces deux espèces).

Ces résultats ont montré que l'un des problèmes rencontrés pour les espèces de thon était lié au fait qu'à l'époque, peu d'informations étaient mises à disposition pour ces espèces.

## Tableau IX : Séquences des ADN mitochondriaux utilisées pour le dessin des amorces et des sondes

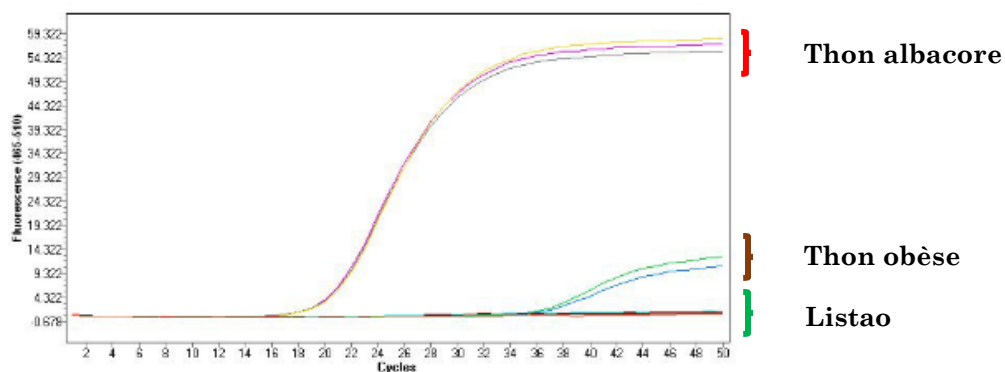
Lorsqu'il n'y a pas de séquence disponible dans les bases de données, la mention p.s (pas de séquence) est indiquée

Espèce de Scombridae	Numéro d'accèsion (GenBank)		
	gène cytochrome c oxydase sous-unité 2 (COII)	gène NADH dehydrogenase sous-unité 2 (ND2)	gène de l'ARNr 12S
<i>Thunnus albacares</i>	AY971768 GU256528.1 JN086153.1 NC_014061.1	GU256528.1 JN086153.1 NC_014061.1	DQ874694.1 GU256528.1 HM003553.1 à HM003555.1 HQ641701.1 JN086153.1 NC_014061.1
<i>Thunnus obesus</i>	GU256525.1 AY971769 JN086152.1 NC_014059.1	GU256525.1 JN086152.1 NC_014059.1	GU256525.1 HQ592316.1 à HQ592318.1 JN086152.1 NC_014059.1
<i>Thunnus alalunga</i>	AB101291.1 GU256526.1 JN086151.1 NC_005317.1	AB101291.1 GU256526.1 JN086151.1 NC_005317.1	AB101291.1 AB176804.1 GU946542.1 GU946543.1 GU946544.1 JN007517.1 à JN007526.1 JN086151.1 NC_005317.1
<i>Thunnus maccoyii</i>	GU256523.1 JN086150.1 NC_014101.1	GU256523.1 JN086150.1 NC_014101.1	GU256523.1 JN086150.1 NC_014101.1
<i>Thunnus orientalis</i>	AB185022.1 GU256524.1 NC_008455.1	AB185022.1 GU256524.1 NC_008455.1	AB185022.1 GU256524.1 KF906721.1 NC_008455.1 NC_008455.1
<i>Thunnus thynnus</i>	AB097669.1 AY302574.2 AY971770 GU256522.1 JN086149.1 NC_004901.2 NC_014052.1	AB097669.1 AY302574.2 DQ854690.1 GU256522.1 JN086149.1 NC_004901.2 NC_014052.1	AB097669.1 AB176805.1 AY302574.2 DQ854647.1 GU256522.1 JN086149.1 KF906720.1 NC_004901.2 NC_014052.1
<i>Thunnus tonggol</i>	HQ425780.1 JN086154.1 NC_020673.1	HQ425780.1 JN086154.1 NC_020673.1	HQ425780.1 JN086154.1 NC_020673.1
<i>Thunnus atlanticus</i>	p.s	p.s	DQ874693.1
<i>Katsuwonus pelamis</i>	AB101290.1 AY971773 GU256527.1 JN086155.1 NC_005316.1	AB101290.1 JN086155.1 GU256527.1	AB101290.1 AB176808.1 DQ874697.1 GU256527.1 HQ592295.1 à HQ592297.1 JN086155.1
<i>Sarda sarda</i>	AY971771.1	EU263832.1 EU263833.1	DQ874691.1
<i>Sarda orientalis</i>	AY971772	p.s	p.s
<i>Sarda chiliensis</i>	p.s	p.s	p.s
<i>Auxis rochei</i>	AB103467.1 AB103468.1 AB105165.1 AY971774.1 NC_005313.1	AB103467.1 AB103468.1 AB105165.1 EU263836.1 NC_005313.1	AB103467.1 AB103468.1 AB176811.1 AB176810.1 AB105165.1 NC_005313.1
<i>Auxis thazard</i>	AB105447.1 NC_005318.1	AB105447.1 EU263837.1 NC_005318.1	AB105447.1 AB176809.1 DQ874692.1 NC_005318.1
<i>Euthynnus affinis</i>	AY971776.1	p.s	p.s
<i>Euthynnus alletteratus</i>	AB099716.1 AY971775.1 NC_004530.1	AB099716.1 NC_004530.1	DQ874698.1 AB176806.1 AB176807.1 NC_004530.1 AB099716.1

p.s = pas de séquence

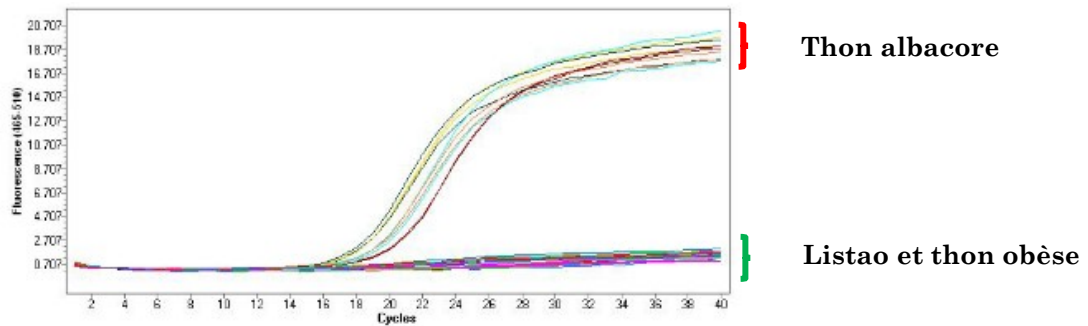
## 1. Le thon albacore

Les couples amorces/sonde spécifiques à l'espèce albacore n'ont pas amplifié les ADN issus de l'espèce listao, ce qui démontre que l'ajout des sondes TaqMan accroît la spécificité à l'espèce albacore. Cependant, pour la plupart des couples, des émissions de fluorescence ont été mesurées pour le thon obèse, confirmant ainsi la proximité existante entre les espèces de thon albacore et obèse. Après analyse de l'allure des courbes de fluorescence, les émissions de fluorescence pour l'espèce du thon obèse pouvaient être considérés comme des artéfacts ou des amplifications aspécifiques, puisque l'allure de la courbe d'amplification ne correspondait pas à une sigmoïde de même intensité que l'espèce albacore (Figure 23 ci-dessous). Cependant, le calcul des concentrations étant lié aux valeurs de Cq, si celles-ci sont trop proches des Cq de l'espèce albacore, il est probable qu'en présence d'un mélange de thons albacore et obèse, cela pourrait induire des erreurs de quantification.



**Figure 23 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Talb\_ND2 1, spécifiques au thon albacore**

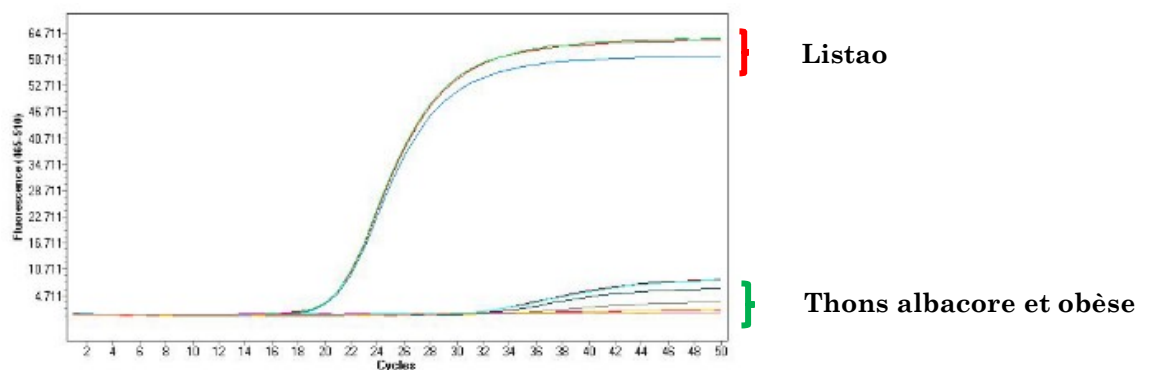
Parmi les différents couples testés, un seul a répondu à l'ensemble des critères. Ce couple a été sélectionné car il permettait de discriminer l'espèce albacore. Il s'agit du couple amorces/sonde « Talb\_COII 6 » dessiné à partir de la séquence du gène de la cytochrome oxydase sous-unité 2 (Figure 24 page 95). Par comparaison, pour identifier le thon albacore, [Lopez et Pardo, \(2005\)](#) ont utilisé un couple d'amorces/sonde du gène de l'ARN 16 S et [Terio et al., \(2010\)](#) ainsi que [Chuang et al., \(2012\)](#) ont utilisé un couple d'amorces/sonde du gène du cytochrome b.



**Figure 24 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Talb\_COII 6 spécifique au thon albacore**

## 2. Le listao

Les tests effectués pour l'espèce listao ont montré que, dans la plupart des cas, il était possible de différencier l'espèce listao des deux autres espèces de l'étude. Cependant, dans certains cas, de faibles émissions de fluorescence ne correspondant pas à une amplification pour les thons albacore et obèse ont été retrouvées (Figure 25 ci-dessous).

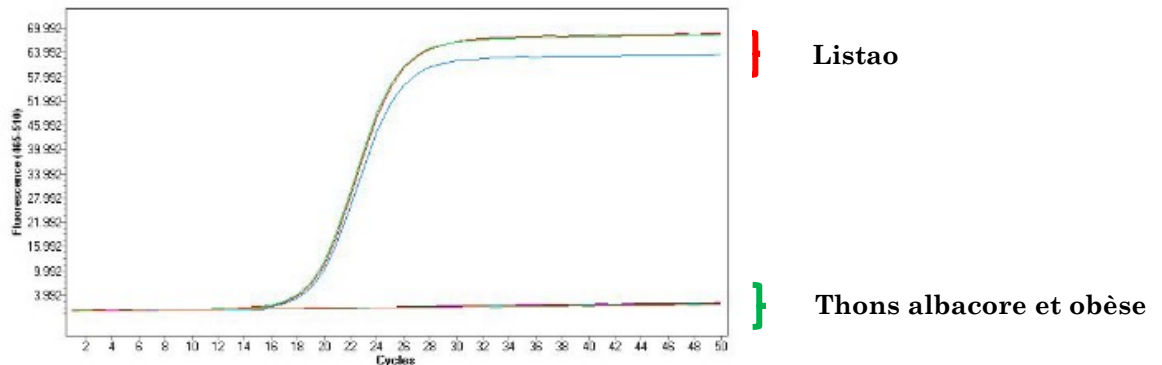


**Figure 25 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Kpel\_COI 1 spécifiques à l'espèce listao**

Ces résultats permettent de montrer que l'ajout des sondes intensifie la spécificité et la sensibilité de la méthode, car seul l'ADN de l'espèce listao est amplifié. Le couple amorce sonde « Kpel\_COII 2 » a été sélectionné, car il répondait le mieux à l'ensemble de nos critères pour le développement d'une méthode d'identification et de quantification de l'espèce listao (Figure 26 page 96). Les études précédentes portant sur la caractérisation du listao par PCR se basaient sur l'utilisation du cytochrome b comme marqueur, qu'il s'agisse de PCR



multiplex (Bottero *et al.*, (2007) ; Michelini *et al.*, (2007)) ou de la méthode FINS (Espiñeira *et al.*, (2009a)).



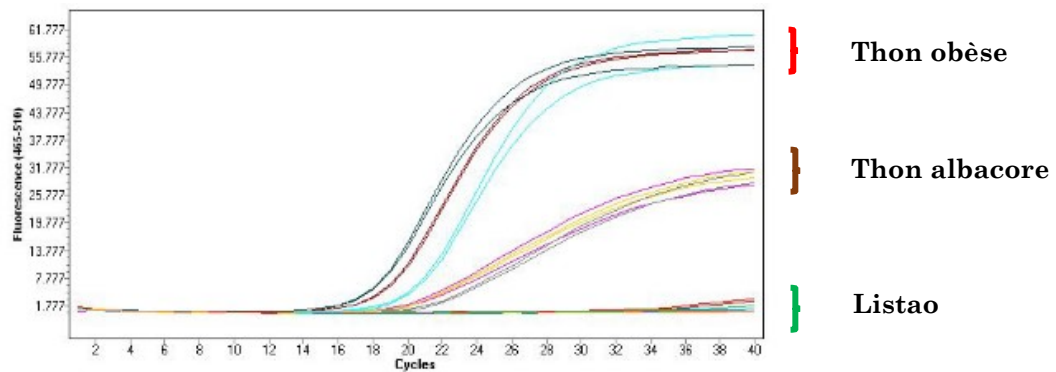
**Figure 26 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Kpel\_COII 2 spécifiques au listao**

### 3. Le thon obèse

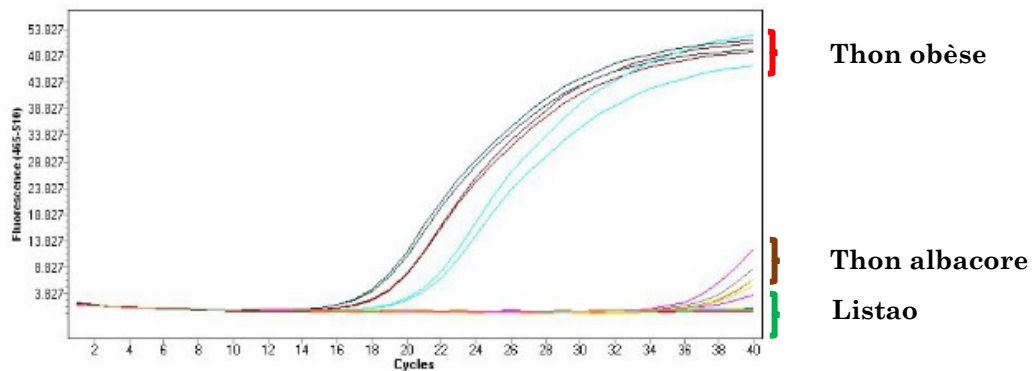
L'identification de l'espèce obèse a été la plus complexe à réaliser. En effet, pour l'ensemble des gènes étudiés, peu de données étaient disponibles et des variations interspécifiques ont été observées uniquement pour le gène de la ND2 et de la Rhodopsine RH1.

Le couple amorces/sonde conçu à partir de la Rhodopsine RH1 n'a pas permis la discrimination du thon obèse, puisque sur tissus crus, il y avait une émission de fluorescence pour les trois espèces testées avec des Cq proches ( $27,4 \pm 2,4$  pour le listao,  $23,3 \pm 0,6$  et pour le thon albacore  $24,1 \pm 2,4$  pour le thon obèse avec six points de mesure par espèce).

Lors des tests des sondes TaqMan spécifiques au thon obèse conçues à partir du gène de la ND2, aucune émission de fluorescence concernant le couple amorces/sonde TaqMan Tobe\_ND2 4 n'a été détectée pour l'espèce listao tandis que des émissions de fluorescence ont été obtenues pour l'espèce albacore ne pouvant pas être considérées comme des artefacts (Figure 27 page 97), d'autant que les Cq étaient proches (en moyenne moins de 3 Cq d'écart). Parmi les différents couples, le couple amorces/sonde « Tobe\_ND2 5 » a été le seul qui permettait de faire une différence significative entre l'espèce albacore et l'espèce obèse (Figure 28 page 97).



**Figure 27 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Tobe\_ND2 4 spécifique au thon obèse émettant de la fluorescence pour le thon albacore**



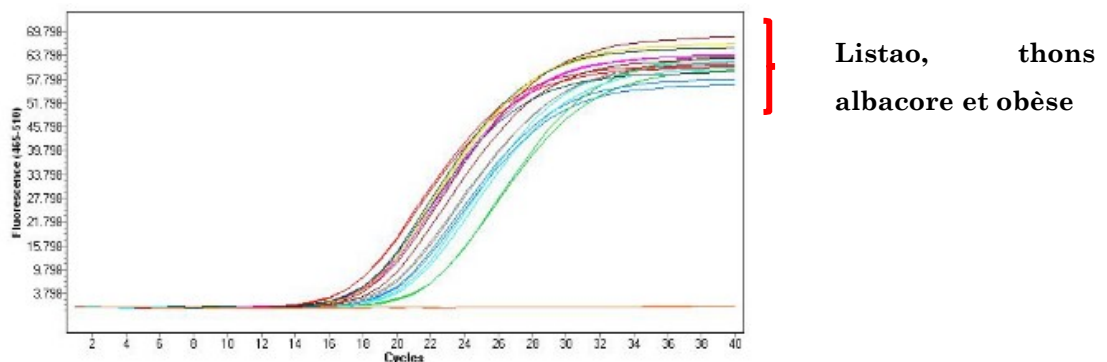
**Figure 28 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan Tobe\_ND2 5 spécifique au thon obèse**

La discrimination du thon obèse et du thon albacore a été menée de front à plusieurs reprises. C'est le cas des études menées par [Terio et al., \(2010\)](#) et [Chuang et al., \(2012\)](#) qui ont utilisé le gène du cytochrome b pour identifier ces deux espèces par la technologie Taqman. D'autres auteurs tels que [Bottero et al., \(2007\)](#) et [Kitaoka et al., \(2008\)](#) ont identifié le thon obèse en utilisant le cytochrome b comme marqueur par la technique PCR multiplex pour les premiers et en utilisant les gènes de l'ATPase 6 et de la sous-unité 3 de la cytochrome oxydase comme marqueurs à l'aide de la méthode FRIP pour les seconds.

#### **4. Les couples amorces/sonde universels**

Enfin, les tests effectués pour les couples amorces/sonde universels reconnaissant l'ensemble des espèces ont montré que tous les couples permettaient d'amplifier l'ensemble des espèces de thon (Figure 29 page 98). Le couple amorces/sonde

« Univ\_12S » basé sur un fragment du gène de l'ARN 12S a été retenu pour la poursuite de l'étude vu le plus grand nombre de séquences disponibles dans les bases de données pour les différentes espèces de scombridés, par rapport au gène de l'ARN 16S. Ce gène a également été utilisé comme gène de référence par [Santaclara et al., \(2015\)](#) pour caractériser différentes espèces de thon dont les thons albacore, obèse et listao mais aussi par [Infante et al., \(2004\)](#) pour caractériser d'autres espèces assimilées au thon (*Auxis thazard* et *Auxis rochei*) et par [Catanese et al., \(2010\)](#) pour caractériser des maquereaux (*Scomber japonicus*, *Scomber australasicus*).



**Figure 29 : Courbes d'amplification obtenues avec le couple amorces/sonde TaqMan universel Univ\_12S sur les 3 espèces de l'étude**

Le travail réalisé en amont a permis de choisir les couples permettant l'amplification de l'ADN de tissus appertisés des 3 espèces de l'étude.

**Tableau X : Séquences des amorces et des sondes TaqMan sélectionnées pour le développement de la méthode d'identification et de quantification**

Gène	Nom	Séquence	Taille (pb)
Cytochrome c oxydase sous-unité 2 (COII)	F_Kpel_COII	CGGACATCAATGATACTGAAGC	134
	R_Kpel_COII	GGATTACTATTCGGTGGTCTGC	
	S_Kpel_COII	6FAM-ACAAGACCTGGCCCCGGTC--BHQ1	
Cytochrome c oxydase sous-unité 2 (COII)	F_Talb_COII	CTTCCTCCTACGCATTCT	198
	R_Talb_COII	CACTATTCGGTGGTCTGCTTC	
	S_Talb_COII	6FAM-ACGAAATCAACGACCCCCATCTAA--BHQ1	
NADH dehydrogenase sous-unité 2 (ND2)	F_Tobe_ND2	CTAGCCACCTCCTGAGCAA	99
	R_Tobe_ND2	GCCAGGTCTTGTGTTGACAGT	
	S_Tobe_ND2	6FAM-TTCTTCTGTCCCTAGGCGGTCTTCCA--BHQ1	
ARNr 12S (12S)	F_Univ_12S	GACTTGGCGGTACTTTAGATCC	107
	R_Univ_12S	TGACGACGGCGGTATATAGG	
	S_Univ_12S	6FAM-AACCGATGACCCCCGTTCAA--BHQ1	

(F : Foward ou amorce sens ; R : Reverse ou amorce anti-sens ; S : sonde ; Kpel : *K. pelamis* ; Talb : *T. albacares* ; Tobe : *T. obesus* ; 6FAM : reporter ou fluorophore 6-fluorescein amidite ; BHQ1 : quencher ou extincteur Black Hole Quencher)

Il s'agit des couples d'amorces/sonde dessinés à partir du gène de la cytochrome oxydase sous-unité 2 (COII) pour le listao et le thon albacore, du gène de la NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND2) pour le thon obèse et du gène de l'ARN 12S pour l'ensemble des espèces (amorces et sonde universelles).

Les couples amorces/sonde sélectionnés pour la poursuite de l'étude sont présentés dans le Tableau X page 98 (la codification a été conservée pour la poursuite des essais).

### **5. Synthèse concernant la sélection des marqueurs**

La sélection des marqueurs et des couples amorces/sonde a été l'étape la plus fastidieuse, tant le nombre d'essais a été important. Ce travail essentiel a permis de sélectionner des couples amorces/sonde opérationnels. En effet, les différents gènes mitochondriaux ont été prospectés pour le développement de la méthode d'identification et de quantification des espèces de thon. Les explorations réalisées pour les 3 espèces de l'étude et 13 autres espèces de Scombridae ont avant tout montré que dans notre cas, l'ensemble des gènes mitochondriaux ne peut être utilisé car un grand nombre de séquences pour certaines espèces était absent dans les bases de données. Cela donne des perspectives de recherches pour le séquençage de gènes mitochondriaux pour les espèces manquantes, comme la *Sarda orientalis* ou la *Sarda chiliensis* d'autant qu'elles peuvent être utilisées pour effectuer des substitutions frauduleuses.

L'étude des variations interspécifiques, permettant la discrimination des trois espèces de l'étude, a montré la proximité génétique qui existe entre les espèces de thon et particulièrement entre le thon obèse et le thon albacore. L'étude des variations intraspécifiques pour toutes les espèces de Scombridae étudiées a montré qu'en dehors de la région de contrôle, les variations intraspécifiques sont assez isolées, mais sont à prendre en compte dans le cadre du développement de méthodes d'identification et de quantification des espèces de thon.

L'étude combinée des variations interspécifiques et intraspécifiques a légitimé la sélection de certains gènes mitochondriaux comme celui du cytochrome b et a aussi permis le criblage de couples amorces/sonde pouvant permettre la discrimination des espèces de listao, albacore et obèse.

Ce travail réalisé a permis de sélectionner 3 couples amorces/sonde. Dans la partie suivante, ces couples sélectionnés ont été étudiés dans le but de prouver qu'ils fournissaient des résultats statistiquement significatifs pour pouvoir développer la méthode d'identification et de quantification des espèces de l'étude.

## F. Identification des espèces de thon

### 1. Développement de la méthode d'identification des espèces de thon

Dans le but de valider d'un point de vue statistique les couples amorces/sonde sélectionnés, ceux-ci ont été testés sur 10 individus par espèce et sur les 3 espèces de l'étude, soit au total sur 30 individus par couple. Les résultats des tests effectués sur les **tissus crus** ont montré l'efficacité des systèmes (amorces/sonde) permettant l'identification des espèces de l'étude. En effet, la sonde spécifique à l'espèce **albacore** émettait de la fluorescence pour les ADN extraits de 10 individus appartenant à l'espèce albacore, alors qu'aucune amplification n'a été obtenue ni pour les 10 individus appartenant à l'espèce obèse ni pour les 10 individus appartenant à l'espèce listao.

De même, le couple spécifique à l'espèce **listao** émettait de la fluorescence lors de l'amplification des ADN extraits de 10 individus appartenant à l'espèce listao, tandis que, pour les 10 individus appartenant à l'espèce obèse et les 10 individus appartenant à l'espèce albacore, il n'y avait pas d'émission de fluorescence.

Enfin, le couple spécifique au thon **obèse** émettait de la fluorescence pour les ADN extraits de 10 individus appartenant à l'espèce obèse. Une émission de fluorescence a aussi été détectée pour l'espèce albacore. Néanmoins, ce résultat permettait de différencier les deux espèces, car pour l'espèce albacore le Cq moyen se situait au-delà du 28<sup>ème</sup> cycle de la PCR alors que pour l'espèce obèse, la moyenne des Cq était de 16.

Enfin, la sonde universelle 12S émettait de la fluorescence pour les 30 individus. Les couples amorces/sonde ont ensuite été éprouvés sur les tissus appertisés. Le premier constat a été que les Cq obtenus à partir des ADN issus des tissus appertisés étaient plus tardifs que les Cq obtenus à partir des tissus crus, pour la même quantité d'ADN et pour une même espèce. Ce résultat montre l'impact de la dégradation de l'ADN liée à la stérilisation. Dans tous les cas, les résultats attendus ont été confirmés, c'est-à-dire, l'obtention de couples amorces/sonde

permettant l'authentification des espèces de l'étude sur tissus appertisés (Tableau XI page 101).

**Tableau XI : Résultats obtenus pour l'identification des espèces**

Espèce	Codification	Amorces/sonde					
		Kpel_COII		Talb_COII		Tobe_NDII	
		Moyenne des Cq	Ecart-type	Moyenne des Cq	Ecart-type	Moyenne des Cq	Ecart-type
<b>K. pelamis</b>	ET1	19,42	0,08	p.v	p.v	p.v	p.v
	ET2	19,68	0,42	p.v	p.v	p.v	p.v
	ET3	20,68	0,12	p.v	p.v	p.v	p.v
	ET4	19,77	1,05	p.v	p.v	p.v	p.v
	ET5	19,12	0,42	p.v	p.v	p.v	p.v
	ET6	20,77	0,64	p.v	p.v	p.v	p.v
	ET7	20,79	0,85	p.v	p.v	p.v	p.v
	ET8	20,81	0,21	p.v	p.v	p.v	p.v
	ET9	20,6	0,12	p.v	p.v	p.v	p.v
	ET10	20,58	0,04	p.v	p.v	p.v	p.v
<b>T. albacares</b>	ET11	p.v	p.v	22,59	0,33	27,95	0,03
	ET12	p.v	p.v	19,7	0,3	28,3	0,47
	ET13	p.v	p.v	19,24	0,01	25,73	0,34
	ET14	p.v	p.v	20,73	0,57	p.v	p.v
	ET15	p.v	p.v	21,81	0,21	25,43	0,49
	ET16	p.v	p.v	24,25	0,17	p.v	p.v
	ET17	p.v	p.v	22	0,27	27,16	0,19
	ET18	p.v	p.v	19,18	0,3	29,44	0,95
	ET19	p.v	p.v	19,46	0,21	27,97	0,4
	ET20	p.v	p.v	21,48	0,11	27,97	0,93
<b>T. obesus</b>	ET21	p.v	p.v	p.v	p.v	23,51	0,08
	ET22	p.v	p.v	p.v	p.v	22,37	0,05
	ET23	p.v	p.v	p.v	p.v	20,46	0,08
	ET24	p.v	p.v	p.v	p.v	21,89	0,24
	ET25	p.v	p.v	p.v	p.v	21,7	0,03
	ET26	p.v	p.v	p.v	p.v	26,01	0,57
	ET27	p.v	p.v	p.v	p.v	22,4	0,06
	ET28	p.v	p.v	p.v	p.v	21,41	0,21
	ET29	p.v	p.v	p.v	p.v	19,87	0,08
	ET30	p.v	p.v	p.v	p.v	21,36	0,23

p.v = pas de valeur ; ET : échantillon de thon

En effet, le couple spécifique à l'espèce **albacore** (Talb\_COII) a permis la discrimination de l'espèce albacore, puisque une amplification pour cette espèce a été détectée avec une moyenne des Cq de  $21,04 \pm 1,38$ , tandis que pour les espèces listao et thon obèse, aucune amplification n'a été détectée.

De même, le couple spécifique pour l'espèce **listao** (Kpel\_COII) a permis l'identification de l'espèce listao avec une moyenne des Cq  $20,22 \pm 0,4$ , alors que pour les espèces albacore et thon obèse, aucune amplification n'a été détectée.

Enfin, Le couple conçu pour l'identification du thon **obèse** (Tobe\_ND2) a permis l'identification de l'espèce obèse avec un Cq moyen de  $22,10 \pm 1,18$ , tandis que pour le listao, aucune amplification n'était détectée. Cependant, des émissions de fluorescence ont été observées pour le thon albacore avec un Cq moyen de  $34,36 \pm 1,05$  avec tout de même des différences qui étaient statistiquement significatives ( $p < 0,001$ ) entre deux espèces. En cas de mélange avec un échantillon inconnu cela pourrait prêter à confusion et l'identification devra être réalisée en testant parallèlement les 3 systèmes d'amorces/sonde.

En conclusion, la démarche appropriée pour l'authentification des espèces consiste à tester l'ensemble des couples amorces/sonde simultanément pour ne pas effectuer une identification incorrecte et à réduire le nombre des cycles de la PCR de 40 à 35.

## **2. Limites et spécificités des amorces et des sondes**

### **Les LOD, LOQ et les efficacités**

Les courbes standards ont été obtenues avec une efficacité de valeur moyenne de  $92,4\% \pm 5,4$  pour le thon obèse, de  $99,8\% \pm 5,9$  pour l'albacore, de  $96,8\% \pm 3,8$  pour le listao et de  $99,9\% \pm 5,1$  pour le gène endogène de l'ARNr 12S. Les limites de détection et de quantification (LOD et LOQ) ont été déterminées à  $0,01 \text{ ng}/\mu\text{L}$  pour les thons albacore et obèse et à  $0,001 \text{ ng}/\mu\text{L}$  pour le listao.

### **Essais sur d'autres espèces de Scombridae**

Dans le but de déterminer la spécificité des couples amorces/sonde spécifiques aux trois espèces de l'étude, ceux-ci ont été testés sur le thon germon (*T. alalunga*), le bonitou (*A. rochei*), la bonite à dos rayé (*S. sarda*), la thonine orientale (*E. affinis*), le thon à nageoires noires (*T. atlanticus*), l'auxide (*A. thazard*) et le maquereau d'Atlantique (*Scomber scombrus*). Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'émission de fluorescence pour ces espèces (Tableau XII page 103). Ces résultats indiquent que, malgré la proximité génétique entre les espèces de thon et les bonites, des couples spécifiques permettent de

discriminer les trois espèces de l'étude par rapport à ces espèces appartenant à la famille des Scombridae.

**Tableau XII : Résultats obtenus pour les tests des couples amorces/sonde sur des espèces de thon, assimilées au thon, et des espèces n'appartenant pas à la famille des Scombridae**

Espèce	Codification	Amorces/sonde					
		Kpel_COII		Talb_COII		Tobe_NDI	
		Moyenne des Cq	Ecart-type	Moyenne des Cq	Ecart-type	Moyenne des Cq	Ecart-type
<i>Thunnus alalunga</i>	AE1	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE2	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE3	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE4	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE5	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE6	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE7	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE8	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE9	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE10	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Auxis rochei</i>	AE11	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Sarda sarda</i>	AE12	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE13	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE14	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE15	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE16	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE17	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Acanthocybium solandri</i>	AE18	p.v	p.v	29,28	0,57	p.v	p.v
	AE19	p.v	p.v	28,70	0,11	p.v	p.v
	AE20	p.v	p.v	35,72	0,06	p.v	p.v
	AE21	p.v	p.v	30,65	2,26	p.v	p.v
	AE22	p.v	p.v	27,92	0,11	p.v	p.v
<i>Euthynnus alletteratus</i>	AE23	19,43	0,02	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Thunnus thynnus</i>	AE24	p.v	p.v	p.v	p.v	20,85	0,23
	AE25	p.v	p.v	p.v	p.v	20,31	0,04
	AE26	p.v	p.v	p.v	p.v	19,70	0,39
	AE27	p.v	p.v	p.v	p.v	20,03	0,02
	AE28	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Thunnus atlanticus</i>	AE29	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE30	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE31	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE32	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Euthynnus affinis</i>	AE33	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE34	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE35	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE36	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Auxis thazard</i>	AE37	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Thunnus tonggol</i>	AE38	p.v	p.v	p.v	p.v	24,79	0,15
<i>Scomber scombrus</i>	AE39	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE40	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE41	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE42	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	AE43	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Parupeneus cinnabarinus</i>	AE44	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Salmo salar</i>	AE45	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Merlangius merlangus</i>	AE46	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Gadus morhua</i>	AE47	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Solea solea</i>	AE48	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Reinhardtius</i>	AE49	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Xiphias gladius</i>	AE50	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Theragra chalcogramma</i>	AE51	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>Pollachius virens</i>	AE52	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v

p.v = pas de valeur : AE : autre espèce



Dans ce même tableau, des émissions de fluorescence ont été détectées pour certaines espèces non spécifiques, ce qui témoigne des limites de la spécificité des couples amorces/sonde. Ces limites sont développées dans les paragraphes suivants.

### **3. Les limites du couple spécifique au thon albacore**

Le test du couple spécifique au thon albacore a montré une émission de fluorescence pour le thazard-bâtard (*A. solandri*) avec une moyenne des Cq de  $30,5 \pm 0,6$  sur tissu cru (Tableau XII page 103). Toutefois, une différence significative ( $p < 0,05$ ) a été obtenue avec l'espèce albacore (Cq moyen de  $18,5 \pm 1,1$  pour l'albacore sur tissu cru) montrant que ces deux espèces pouvaient être différenciées entre elles. *A. solandri* n'était pas initialement incluse parmi les 3 espèces de l'étude et 13 autres espèces de Scombridae ciblées, mais elle a ensuite été ajoutée car elle pourrait être utilisée comme espèce de substitution. Après vérification dans les bases de données, aucune séquence du gène de la cytochrome oxydase sous-unité 2 pour cette espèce n'était répertoriée. Par conséquent, même si cette espèce faisait partie des 16 espèces de départ, elle n'aurait pu être vérifiée qu'au niveau expérimental. De plus, ces valeurs de Cq ont été obtenues à partir de tissu cru et elles peuvent donc être différentes de celles obtenues à partir de tissu appertisé.

Plusieurs questions se posent :

- quel serait le comportement du couple amorces/sonde spécifique au thon albacore testé sur une boîte contenant un mélange de thon albacore et de thazard-bâtard ?
- quel serait le comportement du couple amorces/sonde spécifique au thon albacore testé sur une boîte contenant uniquement du thazard-bâtard ?

En termes d'identification, il n'est pas exclu qu'une boîte contenant du thazard-bâtard émette de la fluorescence pour le couple amorces/sonde spécifique au thon albacore, présentant alors des Cq très tardifs. Ceci pourrait être une limite de la méthode, surtout lorsque le contenu de la boîte est inconnu.

### **4. Les limites du couple spécifique au thon obèse**

Les résultats ont montré que pour le couple spécifique au thon obèse, une émission de fluorescence pour le thon rouge (*Thunnus thynnus*) avec un Cq

moyen de  $20,22 \pm 0,49$  a été détectée sur tissu cru (Tableau XII page 103), alors que le couple spécifique au thon obèse possède un Cq moyen de  $17,9 \pm 1,14$ .

Ce résultat montre la proximité génétique existante entre ces deux espèces ([Unsel et al., \(1995\)](#)). Toutefois, le thon rouge est une denrée rare utilisée exclusivement sous forme crue pour la fabrication de sashimi et de sushi, car il s'agit d'un produit trop coûteux pour être utilisé pour la fabrication de produits appertisés. Le couple spécifique au thon obèse pourrait donc être utilisé pour l'identification et la quantification à partir de produits appertisés. Cependant, il semblerait que le thon rouge pêché hors quota (pêche illicite, non déclarée et non réglementée (INN)) puisse être utilisé dans la fabrication de conserves de thon et alors être ou non mélangé avec du thon obèse et apparaître sous l'étiquette *T. obesus*. Dans notre étude, seuls des échantillons de tissus crus issus de quatre individus de *T. thynnus* ont été analysés pour étudier la spécificité du système d'identification de *T. obesus*. L'analyse des séquences d'ADN a montré que 2 bases sur 26 nucléotides de la sonde de *T. obesus* étaient différentes entre les séquences d'ADN du gène ND2 de *T. obesus* et *T. thynnus*. Lorsque la sonde a été conçue au début de notre étude, nous avions à l'esprit que *T. obesus* se substitue assez souvent à *T. thynnus*, mais pas le contraire, d'autant qu'il n'y a pas de conserves de thon rouge sur le marché français.

Le test du couple spécifique au thon obèse a donné une moyenne des Cq à  $24,79 \pm 0,15$  sur tissu cru pour le thon mignon (*Thunnus tonggol*) (Tableau XII page 103). Toutefois, par rapport aux Cq obtenus pour le thon obèse sur tissu cru il y a une différence significative ( $p < 0,05$ ). Ce résultat montre encore une fois la proximité entre ces espèces de thon. Une des perspectives proposées, sera par exemple, le dessin de couples spécifiques au *T. tonggol* afin d'identifier la présence de cette espèce.

Cependant, ces résultats mériteraient d'être approfondis avec un nombre d'individus plus important, puisqu'un seul individu de cette espèce a pu être collecté.

### **5. Les limites du couple spécifique au listao**

Le couple spécifique à l'espèce listao a donné des émissions de fluorescence avec un Cq moyen de  $19,43 \pm 0,02$  pour la thonine commune (*E. alleteratus*) sur tissu

cru (Tableau XII page 103). Cependant, pour l'espèce listao, un Cq moyen de 13,8 ± 1,7 a été obtenu sur tissu cru avec une différence significative ( $p < 0,05$ ). Par conséquent, ces deux espèces peuvent être différenciées.

## **6. Les espèces manquantes**

La méthode n'a pas pu être éprouvée sur les espèces dont les échantillons étaient absents. Il s'agissait du thon rouge du sud (*Thunnus maccoyii*), du thon rouge du Pacifique (*Thunnus orientalis*), de la bonite de l'océan Indien (*Sarda orientalis*) et de la bonite du Pacifique oriental (*Sarda chiliensis*). Dans le cas des deux *Sarda* non étudiées, l'espèce la plus proche est la bonite à dos rayé (*Sarda sarda*), pour laquelle aucune émission de fluorescence n'a été observée, ce qui est certainement lié au fait que les différences morphologiques et génétiques entre les espèces de thon étudiées et cette espèce sont plus marquées. En effet, les différences génétiques étaient déjà visibles lors de l'étude des variations interspécifiques. Etant donné que les tests n'ont pas pu être réalisés sur toutes les espèces de *Sarda*, le principe de précaution s'applique. Ces espèces font partie des limites de la méthode développée.

## **7. Etude de la spécificité sur d'autres espèces que les scombridés**

Afin de vérifier leur spécificité, les couples spécifiques aux trois espèces de l'étude ont également été testés sur d'autres espèces de poisson pouvant être utilisées en industrie agroalimentaire. Il s'agit du rouget-barbet cinnabare (*Parupeneus cinnabarinus*), du saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), du merlan (*Merlangius merlangus*), du cabillaud (*Gadus morhua*), de la sole commune (*Solea solea*), du flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*), de l'espadon (*Xiphias gladius*), du colin d'Alaska (*Gadus chalcogrammus*) et du lieu noir (*Pollachius virens*). Aucune émission de fluorescence n'a été détectée, ce qui correspondait aux résultats attendus car ces espèces n'appartiennent pas aux espèces de thon ou assimilées aux thons. Ces résultats ont permis de démontrer la spécificité des couples amorces/sonde.

## **8. Synthèse concernant l'identification**

Les résultats obtenus pour la validation statistique des trois couples sélectionnés à la fois sur le tissu cru et le tissu appertisé, pour la méthode d'identification des thons albacore et obèse et du listao ont montré que ces couples pouvaient être

utilisés pour la discrimination des trois espèces de l'étude. Les séquences de gènes utilisées sont celles du gène de la cytochrome oxydase sous-unité 2 (COII) pour le listao et le thon albacore, du gène de la NADH déshydrogénase sous-unité 2 (ND2) pour le thon obèse et du gène de l'ARN 12S pour l'ensemble des espèces (couple universel). Ces trois gènes représentent une démarche innovante, car très peu utilisés pour l'identification des espèces de thon (le gène du cytochrome b étant le plus utilisé).

Ce travail a également confirmé la proximité génétique qui existe entre le thon albacore et le thon obèse, a défini les limites applicables à la méthode et a mis en lumière les adaptations, les démarches à poursuivre ainsi que les perspectives.

En d'autres termes :

- le nombre de cycles de PCR permettant l'identification pourrait être réduit à 35 cycles, au lieu de 40,
- la méthode testée sur des espèces n'appartenant pas aux Scombridae a permis de renforcer la spécificité des 3 couples amorces/sonde pour les trois espèces de l'étude
- ces résultats ont montré la proximité génétique des espèces de Scombridae entre elles. Ceci peut expliquer les possibilités de substitutions volontaires et/ou involontaires. Néanmoins, la méthode d'identification des espèces de thon développée pour les produits appertisés, est fiable et utilisable par les laboratoires d'analyse à destination des industriels.
- les exercices d'intercalibration ont permis de vérifier la transférabilité de la méthode d'identification et les limites de détection, même si la méthode peut être applicable à différents appareils, l'appareil en temps réel LC480 ainsi que le kit spécifique reste de choix pour l'application finale.
- même si le couple permettant de discriminer l'espèce albacore peut être utilisé tel quel, il sera certainement plus efficace une fois retravaillé (modification des températures) afin d'être plus optimal.
- le couple amorces/sonde permettant de discriminer l'espèce obèse émet de la fluorescence pour l'espèce albacore. Au niveau de l'identification, cela n'a pas posé de problèmes pour la discrimination de l'espèce, toutefois il se pourrait que pour la quantification, une interférence soit constatée.

- la méthode développée n'a pas pu être appliquée aux 3 espèces de l'étude et 13 autres espèces de Scombridae ciblées, mais seulement à 12, cela résultant de la difficulté en approvisionnement de certaines espèces dont les *Sarda*. La poursuite des travaux consistera à réaliser les tests sur les espèces manquantes afin d'être exhaustif.

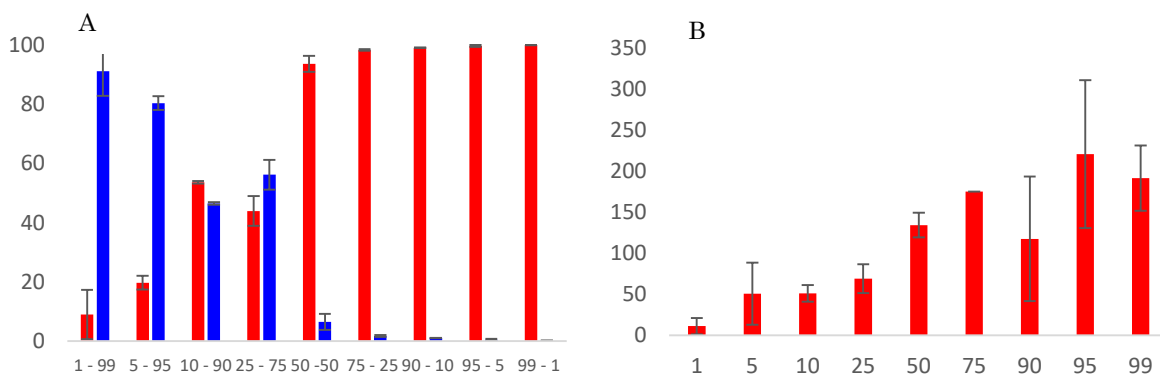
### **G. Quantification des espèces de thon**

Afin de développer la méthode de quantification des trois espèces de l'étude, des boîtes contenant le mélange de deux espèces à différents pourcentages ont été préparées par PFINV. Trois principales stratégies de quantification par PCR en temps réel ont été abordées. La stratégie de quantification développée par l'équipe de [Lopez et Pardo, \(2005\)](#) et dérivée de la méthode des  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ([Livak et Schmittgen, \(2001\)](#)), montrait qu'il était possible de quantifier les espèces *T. alalunga* et *T. albacares* en mélange avec du tissu cru. Cependant, à partir de tissu appertisé, l'effet de la dégradation de l'ADN sur les Cq les a empêchés de quantifier ces deux espèces. Les tests préliminaires réalisés avec les couples amorces/sonde ont donné des résultats similaires à ceux de [Lopez et Pardo, \(2005\)](#), c'est-à-dire l'obtention de valeurs aberrantes liées à la dégradation de l'ADN. Cette stratégie ne pouvait donc pas être appliquée pour le développement de la méthode de quantification. D'autres stratégies de quantification ont été expérimentées. La principale question posée consistait à savoir comment transformer les concentrations obtenues en pourcentages, d'où la mise en place des équations 1, 2 (voir page 73), 3 et 4 (voir page 73) en s'inspirant des travaux préalables d'[Iwobi et al., \(2015\)](#) et de [Druml et al., \(2015\)](#). Ces équations font le rapport des concentrations obtenues à partir de courbe standard pour une espèce et des concentrations obtenues en ADN total. Cependant, les équations 1 et 2 ont été mises en place pour réaliser la quantification absolue ([Heid et al., \(1996\)](#)), en prenant en compte la seconde espèce présente dans la boîte de thon. Tandis que les équations 3 et 4, ont quant à elles été établies à l'aide d'un gène endogène. Ce gène permet de quantifier la présence d'une espèce indépendamment de l'autre espèce présente dans la boîte.

## 1. Listao

La quantification du listao à partir d'un mélange de deux espèces (listao/obèse et listao/albacore) suivant différents pourcentages a échoué. Il n'a pas été possible de quantifier la présence de l'espèce listao en mélange, avec les deux stratégies de quantification (absolue et relative avec standard externe). En effet, pour le listao, les pourcentages calculés étaient bien supérieurs aux valeurs attendues (Figure 30 ci-dessous).

En suivant la méthode basée sur la quantification absolue avec standard externe (Figure 30A), le calcul des pourcentages d'une espèce a été obtenu par rapport à l'autre espèce. De ce fait, si le listao n'était pas correctement quantifié, avec cette stratégie de quantification, la seconde espèce ne pouvait pas être quantifiée. Le listao, étant une bonite (genre *Katsuwonus*), il est possible que des adaptations génétiques spécifiques à cette espèce liées à l'écosystème, au mode de vie, à la croissance ou encore à l'énergie nécessaire pour la respiration, aient pour conséquence un nombre de mitochondries différents par rapport à l'albacore ou l'obèse qui appartiennent au genre *Thunnus*. Ce phénomène peut également être lié à la différence d'accroche entre les amorces.



**Figure 30 : Quantification du listao**

A. Pourcentages obtenus pour le thon obèse et le listao suivant la méthode de quantification absolue avec standard externe (mélange obèse/listao); B. pourcentages obtenus pour le listao suivant la méthode basée sur la quantification relative avec standard externe (mélange listao/albacore); histogramme bleu : valeurs moyennes des pourcentages obtenus pour le thon obèse ; histogrammes rouges : valeurs moyennes des pourcentages obtenus pour le listao

Une seconde hypothèse est basée sur le fait que le couple amorces/sonde spécifique au listao est beaucoup plus « efficace », que les couples amorces/sonde spécifiques aux thons albacore ou obèse. Dans ce cas, les amorces se fixeraient

mieux pour le listao par rapport aux autres couples d'amorces/sonde (le couple universel inclus). D'autre part, si l'ADN utilisé pour les courbes standards est plus dégradé que l'échantillon à tester, il pourrait y avoir dans ce cadre une surestimation du listao.

En suivant la méthode basée sur la quantification relative avec standard externe (Figure 30B), des résultats inexploitablement concernant le listao ont été obtenus. Ceci s'inscrit dans la même logique que la première méthode, puisque cette seconde méthode utilise également le principe des courbes standard.

De ce fait, devant la difficulté à quantifier le listao par rapport aux thons albacore ou obèse, la poursuite de l'étude a consisté à se focaliser sur ces deux dernières espèces génétiquement très proches. De plus, la recherche d'une méthode permettant de quantifier ces deux espèces, s'intègre directement dans la problématique liée à l'utilisation des DCP (dispositifs concentrateurs de poissons) : voir Figure 9 page 39.

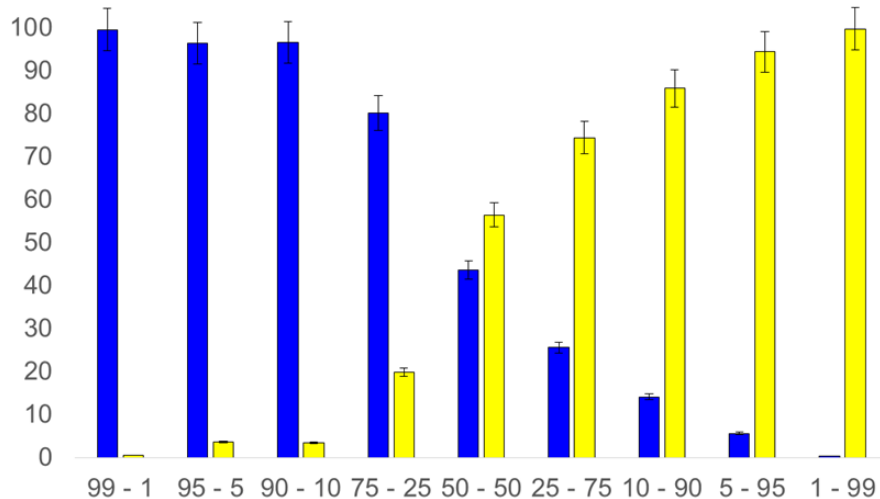
## **2. Thons albacore et obèse**

### **2.1. Méthode basée sur la quantification absolue avec standard externe**

La méthode basée sur la quantification absolue avec standard externe, a pour principe d'établir une courbe standard pour chacun des deux thons albacore ou obèse afin de déterminer les concentrations en ADN de chaque espèce. Cette méthode a été développée en s'inspirant des travaux préalablement entrepris par [Druml et al., \(2015\)](#).

Les pourcentages ont été obtenus suivant les équations 1 et 2 (voir page 73) en partant du principe que ces deux espèces extrêmement proches pouvaient avoir un nombre de mitochondries relativement équivalent.

Ces résultats, qui sont probants, ont montré que la présence du thon albacore par rapport au thon obèse, et vice-versa, pouvait être évaluée dans un mélange contenant de l'albacore et du thon obèse (Figure 31 page 111). Les résultats sont du même ordre de grandeur que les pourcentages réels attendus et le test Chi-2 a permis de démontrer qu'il n'y avait pas de différence significative entre les valeurs obtenues et les valeurs réelles, sauf pour un mélange contenant 50 % de chaque espèce.



**Figure 31 : Quantification (en pourcentage) des mélanges binaires de thons albacore et obèse suivant la méthode de quantification absolue avec standard externe**

Histogramme bleu : valeurs moyennes des pourcentages obtenus pour le thon obèse. Histogramme jaune : valeurs moyennes des pourcentages obtenus pour le thon albacore. Les valeurs reportées en abscisses indiquent les pourcentages théoriques attendus. Les bars d'erreur indiquent les écarts type en quadruplât.

Dans ce cas, il y avait une différence significative entre les valeurs des pourcentages obtenus. Ceci constitue une des limites de la méthode. L'hypothèse de départ était que la concentration en ADN du thon obèse évaluée par la qPCR serait probablement surestimée en présence du thon albacore, car il y avait une émission de fluorescence en présence d'albacore pour le couple amorces/sonde spécifique au thon obèse. Cependant, les concentrations de départ pour l'ensemble des espèces étaient de 10 ng/μL à 100% d'une espèce. Par conséquent, cette surestimation est très faible, puisqu'à partir du cycle 34 (Cq obtenus pour l'albacore), la quantification est inférieure à 0,01 ng/μL (voire 0,001 ng/μL), pour une concentration en ADN total au départ de 10 ng/μL. D'autre part, les résultats confirment que le mode de prélèvement à partir des boîtes et l'étape de mixage est la plus adaptée pour le développement d'une méthode de quantification.

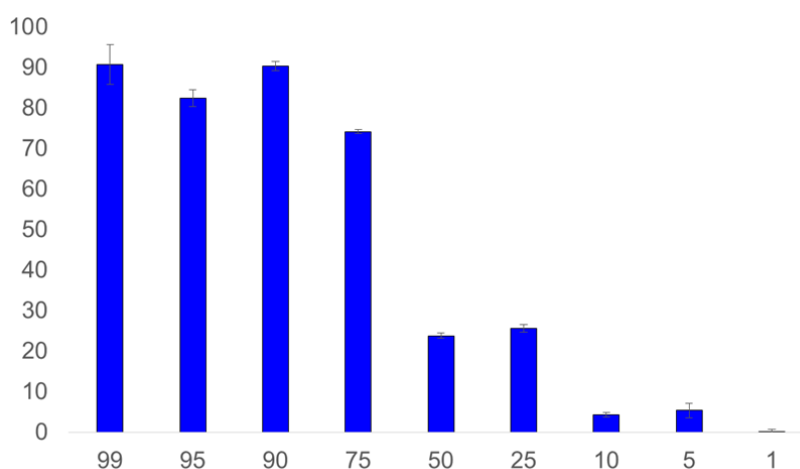
## 2.2. Méthode basée sur la quantification relative avec standard externe

La méthode basée sur la quantification relative avec standard externe a pour but de construire une courbe standard pour le gène cible et une seconde courbe pour le gène endogène ([Iwobi et al., \(2015\)](#)). Ainsi, pour un échantillon inconnu, deux concentrations ont été obtenues, l'une pour le gène cible correspondant à l'espèce et l'autre pour le gène de référence de l'ARN 12S, correspondant à la totalité des



espèces présentes dans le mélange. Le ratio des concentrations réalisées suivant les équations 3 et 4 (voir page 73) a permis d'obtenir les pourcentages pour chaque espèce, ce qui permet de réaliser une normalisation ([Mestdagh et al., \(2009\)](#)).

Les résultats présentés dans la Figure 32 ci-dessous concernent le thon obèse pour un mélange de thon obèse/albacore. Ceux-ci montrent qu'il n'était possible de quantifier l'espèce obèse que pour les pourcentages de 95, 75, 25 et 5%, ce qui montre que cette méthode a ses limites. De même, pour le pourcentage de 50%, les résultats n'étaient pas concluants.



**Figure 32 : Quantification (en pourcentage) du thon obèse suivant la méthode basée sur la quantification relative avec standard externe (mélange obèse/albacore)**

Histogramme bleu : valeurs moyennes des pourcentages obtenus pour le thon obèse. Les valeurs reportées en abscisses indiquent les pourcentages théoriques attendus. Les bars d'erreur indiquent les écarts type en quadruplât.

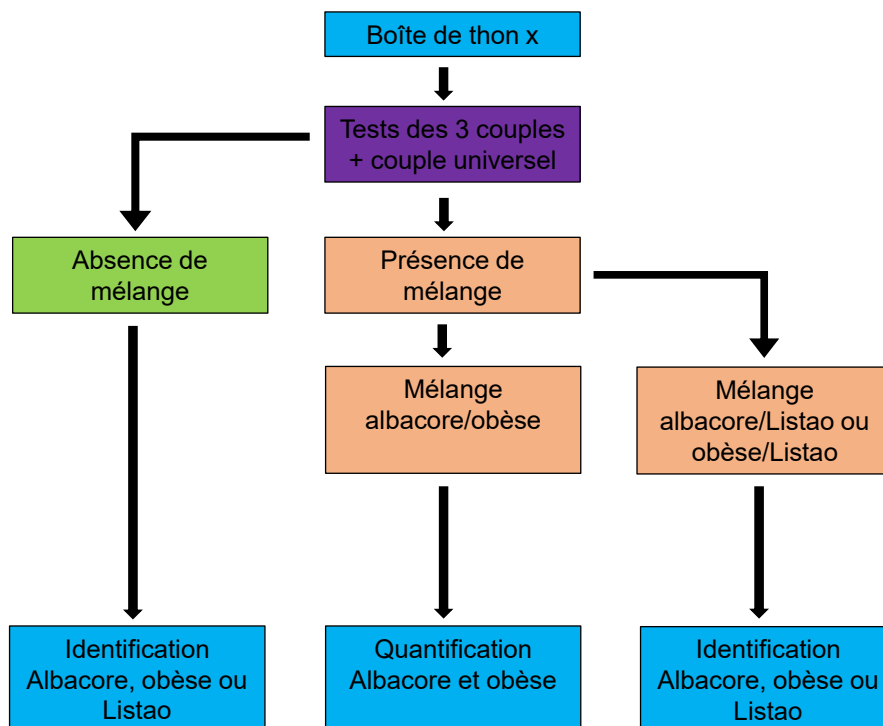
De plus, concernant le thon albacore, il n'a pas été possible de le quantifier à l'aide de cette méthode. Cette stratégie de quantification demande donc à être perfectionnée pour être appliquée à la quantification des espèces de thon. Il serait par exemple intéressant de perfectionner le couple amorces/sonde spécifique à l'espèce albacore. En effet, du fait de la dégradation de l'ADN au cours de l'appertisation, les fragments d'ADN de taille inférieure à la séquence à amplifier par le couple amorces/sonde spécifique à l'albacore peuvent être obtenus. Il serait donc intéressant d'améliorer le couple spécifique à l'albacore en réduisant la taille de l'amplicon (198 pb, voir Tableau X page 98), tout en vérifiant que la spécificité à l'espèce ainsi que l'absence de variation intraspécifique soient

maintenues. Néanmoins, cette piste d'exploration a ses limites dans la mesure où il avait été impossible de dessiner des sondes et des amorces permettant de réduire la taille de cet amplicon car cela ne permettait pas d'obtenir des couples répondant à nos critères. Une autre voie d'exploration pourrait consister à améliorer ce couple amorces/sonde en apportant des modifications aux températures (amorces et sonde) au cours du cycle de PCR afin de l'optimiser.

### 3. Synthèse et conclusion concernant la quantification

Deux méthodes différentes ont été testées pour quantifier les 3 espèces de l'étude en mélange binaire dans une boîte de conserves. La quantification du listao par rapport aux thons albacore ou obèse ne s'est pas couronnée de succès.

Concernant la quantification des thons albacore et obèse en mélange dans une boîte, deux stratégies de quantification ont été testées. Il s'avère que la méthode basée sur la quantification absolue avec standard externe a donné les meilleurs résultats. A l'issue de ce travail, le schéma d'expérimentations suivant (Figure 33 ci-dessous) pourrait être mis en place dans le cadre d'une étude d'identification et de quantification des thons albacore et obèse et du listao.



**Figure 33 : Schéma expérimental à mettre en œuvre pour identifier la présence du listao et des thons albacore et obèse et éventuellement quantifier la présence des thons albacore et obèse en mélange dans une boîte de conserves**

La quantification d'espèces de thon différentes de l'albacore ou de l'obèse n'est pas encore possible car la méthode basée sur la quantification relative avec standard externe nécessite d'être améliorée.

De plus, des travaux antérieurs ont démontré que l'ADN mitochondrial pouvait ne pas être la cible adéquate pour identifier des espèces de thon dans la mesure où certaines d'entre elles présentent des signes évidents d'introggression ([Chow et Kishino, \(1995\)](#) ; [Alvarado Bremer et al., \(1997\)](#) ; [Chow et al., \(2006\)](#) ; [Viñas et Tudela, \(2009\)](#)). De ce fait, des alternatives pourraient être explorées. Il s'agit notamment d'une approche basée sur les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) ([Albaina et al., \(2013\)](#)), mais celle-ci reste de toute façon plus adaptée à des études d'identification des espèces à partir de produits crus qu'à des études de quantification.

#### **H. Application aux produits commerciaux**

Des boîtes du commerce ont été achetées de façon aléatoire dans différents établissements commerciaux de l'agglomération boulonnaise. Les couples amorces/sonde des 3 espèces de l'étude ont été testés sur l'ensemble de ces boîtes correspondant aux échantillons BC1 à BC30 (Tableau XIII page 115).

##### **Boîtes étiquetées listao**

Les tests ont montré que les boîtes étiquetées comme étant du listao (BC1 à BC11) contenaient uniquement du listao. Toutefois, dans le cas de la boîte BC10, un Cq moyen de 29,43 a été mesuré, ce qui suppose qu'il s'agissait soit d'un mélange d'espèces, soit d'un traitement thermique très élevé. La première hypothèse pourrait être résolue en appliquant d'autres méthodes, telles que les NGS. La seconde hypothèse est la plus probable, car rencontrée dans le cas de la fabrication de boîtes de conserves. Dans ce cas, un retard des Cq pour le couple amorces/sonde universel a été constaté.

##### **Boîtes étiquetées thon albacore**

Les boîtes étiquetées comme étant de l'albacore ont montré des résultats différents :

- La présence de mélanges a été constatée étant donné que des Cq ont été obtenus à la fois pour le thon albacore et le listao pour les boîtes BC12 à

BC16. Le listao étant une espèce moins coûteuse que le thon albacore, il est possible que du thon albacore ai été substitué par du listao.

- pour la boîte BC17, des Cq ont été obtenus uniquement pour le thon albacore, ce qui suggère que la boîte ne contenait ni listao ni thon obèse.
- la boîte BC18 ne contenait pas de thon albacore ni de listao, mais du thon obèse. Dans ce cas, nous pouvons supposer qu'il y a eu une confusion entre le thon albacore et le thon obèse.

**Tableau XIII : Présentation des résultats obtenus pour les tests effectués sur les boîtes commerciales**

Espèce	Codification	Amorces/sonde					
		Kpel_COII		Talb_COII		Tobe_NDII	
		Moyenne des Cq	Ecart-type	Moyenne des Cq	Ecart-type	Moyenne des Cq	Ecart-type
<i>K. pelamis</i>	BC1	24,61	0,05	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC2	24,77	0,28	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC3	23,92	0,04	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC4	23,29	0,37	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC5	22,66	0,30	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC6	20,31	0,76	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC7	23,81	0,10	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC8	25,05	0,72	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC9	24,76	0,68	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC10	29,54	0,73	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC11	22,43	1,37	p.v	p.v	p.v	p.v
<i>T. albacares</i>	BC12	29,91	0,40	31,58	0,83	p.v	p.v
	BC13	28,60	0,80	31,43	0,11	p.v	p.v
	BC14	29,43	0,99	28,18	0,85	p.v	p.v
	BC15	25,81	0,24	29,41	0,11	p.v	p.v
	BC16	27,61	1,06	33,35	0,86	p.v	p.v
	BC17	p.v	p.v	34,65	0,08	p.v	p.v
	BC18	p.v	p.v	p.v	p.v	25,54	0,17
	BC19	p.v	p.v	29,60	0,30	p.v	p.v
	BC20	p.v	p.v	32,30	0,17	p.v	p.v
	BC21	p.v	p.v	32,79	0,35	p.v	p.v
<i>T. obesus</i>	BC22	p.v	p.v	p.v	p.v	25,06	0,14
	BC23	p.v	p.v	p.v	p.v	26,45	0,16
	BC24	p.v	p.v	p.v	p.v	24,48	0,19
	BC25	p.v	p.v	p.v	p.v	26,20	1,10
	BC26	p.v	p.v	p.v	p.v	25,60	0,74
<i>T. alalunga</i>	BC27	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC28	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
Inconnue	BC29	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v	p.v
	BC30	22,89	0,06	p.v	p.v	p.v	p.v

p.v = pas de valeur ; BC : boîte du commerce

### Boîtes étiquetées thon obèse

Les boîtes étiquetées comme étant du thon obèse se sont avérées ne contenir que cette espèce.

### Boîtes étiquetées thon germon

Les tests des couples amorces/sonde sur les boîtes étiquetées thon germon (BC27 à BC29) ont montré que pour les couples spécifiques aux trois espèces de l'étude, aucune valeur de Cq n'a été détectée. Ces résultats ont permis de montrer que les trois couples étaient spécifiques et n'amplifiaient pas le thon germon sur tissu appertisé.

### Boîte non identifiée

Enfin, la boîte de thon pour laquelle le nom de l'espèce n'était pas indiqué sur l'étiquette contenait du listao.

### Bilan sur les boîtes de conserves du commerce

Les résultats sont synthétisés dans le Tableau XIV ci-dessous. Ils montrent la présence non seulement d'erreurs d'étiquetage tout comme cela a pu être constaté dans d'autres études ([Bénard-Capelle et al., \(2015\)](#) ; [Gordoa et al., \(2017\)](#)) mais également le mélange d'espèces dans une seule boîte de thon.

Tableau XIV : Résultats synthétiques de l'étude des boîtes commerciales

	Espèce étiquetée	Nombre de boîtes	Marqueurs mitochondriaux		
			Obèse ND2	Albacore COII	Listao COII
Boîtes commerciales	Thon germon	3	✗	✗	✗
	Thon obèse	5	✓	✗	✗
	Listao	11	✗	✗	✓
	Thon albacore	5	✗	✓	✓
		1	✓	✗	✗
		4	✗	✓	✗

✗ : pas de détection par la sonde Taqman spécifique pour le gène cible

✓ : détection par la sonde Taqman spécifique pour le gène cible

■ (rouge) : mélange d'espèces de thon

■ (jaune) : Erreur d'étiquetage

COII : sonde spécifique au gène de la sous-unité 2 de la cytochrome c oxydase

ND2 : sonde spécifique au gène de la sous-unité 2 de la NADH déhydrogénase

# Conclusion et perspectives



Les espèces de thon font partie des espèces de poisson les plus pêchées dans le monde et les plus utilisées pour la fabrication de produits appertisés. Or, au cours de la transformation en filets, les caractéristiques morphologiques externes des différentes espèces sont perdues, ce qui rend leur identification plus complexe et les substitutions involontaires et/ou frauduleuses plus faciles dans les boîtes de conserves. L'ADN, bien que partiellement dégradé au cours de la stérilisation, peut être utilisé pour identifier les différentes espèces de thon dans les produits appertisés. De nombreux auteurs ont développé différentes techniques basées sur l'étude de l'ADN pour la discrimination des espèces de thon, tels que la PCR-RFLP, la PCR-SSCP, ou encore la PCR-FINS. Des études de phylogénie ont également permis de démontrer la proximité génétique entre les espèces de thon et les espèces assimilées au thon. Toutefois, ces méthodes ne pouvaient pas être appliquées pour la quantification des espèces dans les conserves de thon.

L'objectif de ce travail était de mettre en place une méthode de PCR en temps réel permettant à la fois l'identification et la quantification du thon albacore, du thon obèse et du listao dans des produits appertisés. Étant donné la très forte proximité génétique entre les espèces de thon, la technologie de la PCR en temps réel avec l'emploi de sondes TaqMan a été retenue pour atteindre cet objectif.

Les différentes étapes du travail réalisé, telles que la sélection d'une méthode d'extraction de l'ADN adaptée à la problématique, les analyses des polymorphismes nucléotidiques inter- et intraspécifiques ou encore le développement de la PCR quantitative, ont abouti à sélectionner des couples d'amorces/sonde spécifiques aux trois espèces de l'étude. Cette méthode a permis l'identification des thons albacore et obèse ainsi que du listao dans les produits appertisés, mais n'a pas permis d'identifier la présence potentielle d'autres espèces dans les boîtes. Cependant, le travail réalisé sur les alignements des séquences d'ADN permettrait dans un avenir proche de dessiner des amorces et des sondes pour l'ensemble des espèces de thon et des espèces assimilées au thon. Il serait alors intéressant de se focaliser plus particulièrement sur deux autres espèces de thon commercialisées en France telles que le thon germon (*Thunnus alalunga*), pêché au large des côtes bretonnes et *Thunnus Tonggol* qui est distribué en France par le biais des commerces asiatiques. De plus, faute



d'approvisionnement, les espèces *Thunnus maccoyii*, *Thunnus orientalis*, *Sarda orientalis* et *Sarda chiliensis* n'ont pas pu être testées expérimentalement malgré le fait qu'elles puissent être utilisées dans les conserves de thon. Bien que cela semble très compliqué, il serait judicieux de disposer d'échantillons de ces espèces afin de rendre l'étude exhaustive.

Le travail consacré à la quantification a été réalisé suivant différentes approches de PCR en temps réel.

La première méthode basée sur la quantification absolue avec standard externe a permis de quantifier la présence de thon albacore ou obèse, dans un mélange binaire. Ces deux espèces génétiquement proches ont, pour la première fois, pu être quantifiées à partir de tissu appertisé par PCR en temps réel.

La seconde méthode basée sur la quantification relative avec standard externe s'est avérée moins efficace. Seuls des résultats basés sur la quantification du thon obèse ont pu être exploités.

De plus, aucune des deux stratégies de quantification n'a permis de quantifier la présence de listao en mélange binaire.

Ces méthodes de quantification ont donc présenté des limites et demandent à être améliorées. Les pistes à envisager concernent le développement de méthodes basées sur l'utilisation de la digital PCR. Cette technologie apparaît plus sensible et plus spécifique que la PCR en temps réel. Des premières expérimentations ont été menées au sein du laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses à Maisons-Alfort. La poursuite de ces travaux pourrait mener à l'obtention d'une méthode de quantification absolue sans standard externe en présence d'un mélange de différents thons dans une boîte de conserves.

L'ensemble de ces travaux de thèse a été valorisé par le biais de présentations orales et écrites à l'occasion de différents congrès (Annexe 2 page 143) ainsi que par un article dans une revue scientifique internationale à comité de lecture ([Bojolly et al., \(2017\)](#)) (Annexe 3 page 145). Enfin, le travail de collaboration entre le laboratoire « Ecosystèmes microbiens et molécules marines pour les biotechnologies » de l'Ifremer de Nantes et l'unité « Biochimie des Produits Aquatiques » de l'ULCO a fait l'objet d'un acte de congrès avec comité de lecture ([Verrez-Bagnis et al., \(2016\)](#)) (Annexe 4 page 177).

L'étude menée pendant cette thèse répondait à une demande locale et nationale en faisant le lien direct entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée. Le développement de méthodes d'identification et de quantification des espèces de thon reste primordial et les outils développés ont été transférés à la Plateforme d'Innovation « Nouvelles Vagues ». La poursuite de ces travaux permettra de continuer à veiller au bon respect de l'étiquetage et de mieux répondre aux besoins d'authentification et de quantification des industriels du secteur.



# Bibliographie



- Abdullah, A. et Rehbein, H.** (2014) Authentication of raw and processed tuna from Indonesian markets using DNA barcoding, nuclear gene and character-based approach. *European Food Research and Technology* **239**, 4, pp 695-706.
- Abdullah, A. et Rehbein, H.** (2015a) Authentication of closely related scombrid, catfish and tilapia species by PCR-based analysis and isoelectric focusing of parvalbumin. *European Food Research and Technology* **241**, 4, pp 497-511.
- Abdullah, A. et Rehbein, H.** (2015b) The differentiation of tuna (family: Scombridae) products through the PCR-based analysis of the cytochrome b gene and parvalbumin introns. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp n/a-n/a.
- Aguilera-Muñoz, A. D. N.** (2008) Authentication of commercial chilean mollusks using ribosomal internal transcribed spacer (its) as specie-specific DNA marker. *Gayana* **72**, 2, pp 178-187.
- Al Rawi, S., Louvet-Vallee, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R. et Galy, V.** (2011) Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* **334**, 6059, pp 1144-7.
- Albaina, A., Iriondo, M., Velado, I., Laconcha, U., Zarraonaindia, I., Arrizabalaga, H., Pardo, M. A., Lutcavage, M., Grant, W. S. et Estonba, A.** (2013) Single nucleotide polymorphism discovery in albacore and Atlantic bluefin tuna provides insights into worldwide population structure. *Animal Genetics* **44**, 6, pp 678-692.
- Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., García, O., Fernández De Simón, L., García-Hirschfeld, J., Sancho, M., De La Rúa, C. et Fernández-Piqueras, J.** (2004) Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci. Int.* **139**, 2-3, pp 141-149.
- Alvarado Bremer, J. R., Naseri, I. et Ely, B.** (1997) Othodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Fish Biology* **50**, 3, pp 540-554.
- Amandè, M. J., Ariz, J., Chassot, E., de Molina, A. D., Gaertner, D., Murua, H., Pianet, R., Ruiz, J. et Chavance, P.** (2010) Bycatch of the European purse seine tuna fishery in the Atlantic Ocean for the 2003–2007 period. *Aquatic Living Resources* **23**, 4, pp 353-362.
- Armbruster, D. A. et Pry, T.** (2008) Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* **29**, Suppl 1, pp S49-52.
- Asensio, L.** (2007) PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 11, pp 558-566.
- Asensio, L., González, I., García, T. et Martín, R.** (2008) Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* **19**, 1, pp 1-8.
- Barcode of Life: identifying Species with DNA Barcoding**, <http://www.barcodeoflife.org/>; consulté le 3 janvier 2016
- Bartlett, S. E. et Davidson, W. S.** (1991) Identification of *Thunnus* tuna species by the Polymerase Chain Reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 2, pp 309-317.

- Bartlett, S. E. et Davidson, W. S.** (1992) FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *BioTechniques* 12, 3, pp 408-11.
- Bauer, T., Weller, P., Hammes, W. P. et Hertel, C.** (2003) The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology* 217, 4, pp 338-343.
- Becker-Andre, M. et Hahlbrock, K.** (1989) Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic acids research* 17, 22, pp 9437-9446.
- Bénard-Capelle, J., Guillonneau, V., Nouvian, C., Fournier, N., Le Loët, K. et Dettai, A.** (2015) Fish mislabelling in France: substitution rates and retail types. *PeerJ* 2, p e714.
- Bogenhagen, D. et Clayton, D. A.** (1974) The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry* 249, 24, pp 7991-7995.
- Bojolly, D., Doyen, P., Le Fur, B., Christaki, U., Verrez-Bagnis, V. et Grard, T.** (2017) Development of a qPCR method for the identification and quantification of two closely related tuna species, bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), in canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, pp 913-920.
- Borgo, R., Souty-Grosset, C., Bouchon, D. et Gomot, L.** (1996) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *J. Food Sci.* 61, 1, pp 1-4.
- Bossier, P.** (1999) Authentication of seafood products by DNA patterns. *J. Food Sci.* 64, 2, pp 189-193.
- Bottero, M. T. et Dalmaso, A.** (2011) Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet. J.* 190, 1, pp 34-38.
- Bottero, M. T., Dalmaso, A., Cappelletti, M., Secchi, C. et Civera, T.** (2007) Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay. *J. Biotechnol.* 129, 3, pp 575-580.
- Botti, S. et Giuffra, E.** (2010) Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: Identification of tuna and other scombrid species in food products. *BMC Biotechnol.* 10, 1, p 1.
- Brock, T. D. et Freeze, H.** (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology* 98, 1, pp 289-297.
- Brown, W. M., George, M. et Wilson, A. C.** (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4, pp 1967-1971.
- Bustin, S. A.** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 2, pp 169-193.
- Bustin, S. A.** (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology* 29, 1, pp 23-39.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. et Wittwer, C. T.** (2009) The MIQE guidelines: minimum information for

- publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **55**, 4, pp 611-622.
- Catanese, G., Manchado, M., Fernández-Trujillo, A. et Infante, C.** (2010) A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products. *Food Chemistry* **122**, 1, pp 319-326.
- Chabrol, R.** (2014) Le marché français du thon en conserve Accédé le 26/12/2016
- Chapela, M. J., Sotelo, C. G., Pérez-Martín, R. I., Pardo, M. Á., Pérez-Villareal, B., Gilardi, P. et Riese, J.** (2007) Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control* **18**, 10, pp 1211-1215.
- Chen, Y.-T. et Hsieh, Y.-H. P.** (2014) A sandwich ELISA for the detection of fish and fish products. *Food Control* **40**, pp 265-273.
- Chow, S. et Inoue, S.** (1993) Intra- and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bull Natl Res Inst Far Seas Fish* **30**, pp 207-225.
- Chow, S. et Kishino, H.** (1995) Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* **41**, 6, pp 741-748.
- Chow, S., Nakagawa, T., Suzuki, N., Takeyama, H. et Matsunaga, T.** (2006) Phylogenetic relationships among *Thunnus* species inferred from rDNA ITS1 sequence. *Journal of Fish Biology* **68**, SUPPL. 1, pp 24-35.
- Chow, S., Okamoto, H., Miyabe, N., Hiramatsu, K. et Barut, N.** (2000) Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Molecular Ecology* **9**, 2, pp 221-227.
- Chuang, P.-S., Chen, M.-I. et Shiao, J.-C.** (2012) Identification of tuna species by a real-time polymerase chain reaction technique. *Food Chem.* **133**, 3, pp 1055-1061.
- Civera, T.** (2003) Species identification and safety of fish products. *Vet Res Commun* **27**, 1, pp 481-489.
- Collette, B. B. et Nauen, C. E.** (1983) dans *Scombrids of the world*, ed., FAO, Rome (Italy).
- Colombo, F., Mangiagalli, G. et Renon, P.** (2005) Identification of tuna species by computer-assisted and cluster analysis of PCR - SSCP electrophoretic patterns. *Food Control* **16**, 1, pp 51-53.
- Corpet, F.** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 22, pp 10881-10890.
- Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latit, S., Guillier, L., Delannoy, S., Fach, P. et Perelle, S.** (2015) A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *Int J Food Microbiol* **201**, pp 17-26.
- Council regulation 1536.** (1992) Council regulation (EEc) n°1536/92 of 9 june 1992 laying down common marketing standards for preserved tuna and bonito. *Council regulation (EEC)* **1536**, L 163/1.
- Dalmasso, A., Civera, T. et Bottero, M. T.** (2006) Biomolecular approaches for the identification of tuna species. *Veterinary Research Communications* **30**, S1, pp 179-181.



- Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Secchi, C. et Bottero, M. T.** (2007) Identification of four tuna species by means of Real-Time PCR and melting curve analysis. *Vet Res Commun* **31**, S1, pp 355-357.
- Dalvit, C., De Marchi, M. et Cassandro, M.** (2007) Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science* **77**, 4, pp 437-449.
- Druml, B., Mayer, W., Cichna-Markl, M. et Hochegger, R.** (2015) Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. *Food Chem* **178**, pp 319-26.
- Ely, B., Stoner, D. S., Bremer, A. J. R., Dean, J. M., Addis, P., Cau, A., Thelen, E. J., Jones, W. J., Black, D. E., Smith, L., Scott, K., Naseri, I. et Quattro, J. M.** (2002) Analyses of nuclear ldhA gene and mtDNA control region sequences of Atlantic northern bluefin tuna populations. *Marine Biotechnology* **4**, 6, pp 583-588.
- Espiñeira, M., Gonzalez-Lavín, N., Vieites, J. M. et Santaclara, F. J.** (2009) Development of a method for the identification of scombroid and common substitute species in seafood products by FINS. *Food Chemistry* **117**, 4, pp 698-704.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Costa, H. et Martínez, I.** (2001) Species identification of formed fishery products and high pressure-treated fish by electrophoresis: a collaborative study. *Food Chemistry* **72**, 1, pp 105-112.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Costa, H., Pérez-Martin, R., Piñeiro-González, C., Craig, A., Mackie, I., Malmheden Yman, I., Ferm, M., Martínez, I., Jessen, F., Smelt, A. et Lutén, J.** (2000) Identification of fish species after cooking by SDS-PAGE and urea IEF: a collaborative study. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 7, pp 2653-2658.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Yman, I. M., Ferm, M., Craig, A., Mackie, I., Jessen, F., Smelt, A. et Lutén, J.** (1999) A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focusing: a collaborative study. *Electrophoresis* **20**, 10, pp 1923-1933.
- FAO** (2014) dans The state of world fisheries and aquaculture, ed.
- Fishbase**, <http://fishbase.mnhn.fr/search.php?lang=French>; consulté le 3 janvier 2016
- FranceAgrimer.** (2011) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- FranceAgrimer.** (2012) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- FranceAgrimer.** (2014) Les filières pêche et aquaculture en France édition avril 2014.
- FranceAgrimer.** (2015) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2014.
- FranceAgrimer.** (2016) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2015.

- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. et Wallace, D. C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National academy of Sciences* 77, 11, pp 6715-6719.
- Gordoa, A., Carreras, G., Sanz, N. et Viñas, J. (2017) Tuna species substitution in the spanish commercial chain: a Knock-On effect. *PLOS ONE* 12, 1, p e0170809.
- Gray, M. W. (1999) Mitochondrial Evolution. *Science* 283, 5407, pp 1476-1481.
- Gribbestad, I. S., Aursand, M. et Martinez, I. (2005) High-resolution <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy of whole fish, fillets and extracts of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) for quality assessment and compositional analyses. *Aquaculture* 250, 1-2, pp 445-457.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D. et Wolff, A. (2007) Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic acids research* 35, 19, p e127.
- Guo, J., Yang, L., Liu, X., Zhang, H., Qian, B. et Zhang, D. (2009) Applicability of the *Chymopapain* gene used as endogenous reference gene for transgenic Huanong No. 1 papaya detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 15, pp 6502-6509.
- Guo, L., Li, M., Zhang, H., Yang, S., Chen, X., Meng, Z. et Lin, H. (2014) Next-generation sequencing of the yellowfin tuna mitochondrial genome reveals novel phylogenetic relationships within the genus *Thunnus*. *Mitochondrial DNA Part A* 27, 3, pp 2089-2090.
- Han, K. et Ely, B. (2002) Use of AFLP analyses to assess genetic variation in *Morone* and *Thunnus* species. *Marine Biotechnology* 4, 2, pp 141-145.
- Hebert, P. D., Cywinska, A. et Ball, S. L. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 270, 1512, pp 313-321.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. et Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 10, pp 986-994.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. et Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology* 10, 4, pp 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. et Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, pp 1026-1030.
- Hold, G. L., Russell, V. J., Pryde, S. E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Sotelo, C. G., Pérez-Martin, R. I., Santos, A. T. et Rosa, C. (2001a) Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. *European Food Research and Technology* 212, 3, pp 385-389.
- Hold, G. L., Russell, V. J., Pryde, S. E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Vidal, R., Rey-Mendez, M., Sotelo, C. G., Pérez-Martin, R. I., Santos, A. T. et Rosa, C. (2001b) Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3, pp 1175-1179.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. et Gelfand, D. H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'->3'

- exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 16, pp 7276-7280.
- Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., Hellemans, J., Kubista, M., Mueller, R. D. et Nolan, T.** (2013) The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clinical chemistry* **59**, 6, pp 892-902.
- Infante, C., Catanese, G., Ponce, M. et Manchado, M.** (2004) Novel method for the authentication of frigate tunas (*Auxis thazard* and *Auxis rochei*) in commercial canned products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 25, pp 7435-7443.
- Iwobi, A., Sebah, D., Kraemer, I., Losher, C., Fischer, G., Busch, U. et Huber, I.** (2015) A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food Chem.* **169**, pp 305-313.
- Jérôme, M., Lemaire, C., Bautista, J. M., Fleurence, J. et Etienne, M.** (2003a) Molecular phylogeny and species identification of sardines. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1, pp 43-50.
- Jérôme, M., Lemaire, C., Verrez-Bagnis, V. et Etienne, M.** (2003b) Direct sequencing method for species identification of canned sardine and sardine-type products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 25, pp 7326-7332.
- Kalinina, O., Lebedeva, I., Brown, J. et Silver, J.** (1997) Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucleic acids research* **25**, 10, pp 1999-2004.
- Kamau, E., Alemayehu, S., Feghali, K. C., Saunders, D. et Ockenhouse, C. F.** (2013) Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. *PloS one* **8**, 8, p e71539.
- Khaksar, R., Carlson, T., Schaffner, D. W., Ghorashi, M., Best, D., Jandhyala, S., Traverso, J. et Amini, S.** (2015) Unmasking seafood mislabeling in U.S. markets: DNA barcoding as a unique technology for food authentication and quality control. *Food Control* **56**, 0, pp 71-76.
- Kitaoka, M., Ichinose, H. et Goto, M.** (2009) Simultaneous visual detection of single-nucleotide variations in tuna DNA using DNA/RNA chimeric probes and ribonuclease A. *Analytical Biochemistry* **389**, 1, pp 6-11.
- Kitaoka, M., Okamura, N., Ichinose, H. et Goto, M.** (2008) Detection of SNPs in fish DNA: Application of the fluorogenic ribonuclease protection (FRIP) assay for the authentication of food contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 15, pp 6246-6251.
- Kumar, G., Kunal, S. P. et Menezes, M. R.** (2012) Genetic stock structure of frigate tuna (*Auxis thazard*) along Indian coast based on PCR-RFLP analyses of mtDNA D-loop region. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **12**, 4.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. et Tamura, K.** (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings Bioinf.* **9**, 4, pp 299-306.
- Kunal, S., Kumar, G., Menezes, M. et Meena, R.** (2013) Mitochondrial DNA analysis reveals three stocks of yellowfin tuna *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788) in Indian waters. *Conserv Genet* **14**, 1, pp 205-213.

- Li, W., Chen, X., Xu, Q., Zhu, J., Dai, X. et Xu, L.** (2015) Genetic Population Structure of *Thunnus albacares* in the Central Pacific Ocean Based on mtDNA COI Gene Sequences. *Biochemical Genetics*.
- Lin, W. F. et Hwang, D. F.** (2007) Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control* **18**, 9, pp 1050-1057.
- Lin, W. F., Shiau, C. Y. et Hwang, D. F.** (2005) Identification of four *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochrome b gene sequence and PCR-RFLP analysis. *J. Food Drug Anal.* **13**, 4, pp 382-387.
- Liu, W. et Saint, D. A.** (2002) A New Quantitative Method of Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Based on Simulation of Polymerase Chain Reaction Kinetics. *Analytical Biochemistry* **302**, 1, pp 52-59.
- Livak, K. J.** (1997) Relative quantitation of gene expression. *ABI Prism 7700 sequence detection system* **2**, pp 1-36.
- Livak, K. J. et Schmittgen, T. D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**.
- Lockley, A. K. et Bardsley, R. G.** (2000a) DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* **11**, 2, pp 67-77.
- Lockley, A. K. et Bardsley, R. G.** (2000b) Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 10, pp 4463-4468.
- López-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I. et Puyet, A.** (2005) Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **339**, 1, pp 73-82.
- López-Piñón, M. J., Insua, A. et Méndez, J.** (2002) Identification of four scallop species using PCP and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. *Marine Biotechnology* **4**, 5, pp 495-502.
- Lopez, I. et Pardo, M. A.** (2005) Application of relative quantification TaqMan real-time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 11, pp 4554-4560.
- Lowenstein, J. H., Amato, G. et Kolokotronis, S.-O.** (2009) The real *maccoyii*: identifying tuna sushi with DNA barcodes – contrasting characteristic attributes and genetic distances. *PLoS ONE* **4**, 11, p e7866.
- Mackie, I.** (1996) dans Food authentication Ashurt, P. R., & Dennis, M. J., Ed. pp 140-170, Blackie Academic and Professional, London.
- Mackie, I. M., Pryde, S. E., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Pérez-Martín, R., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M. et Rehbein, H.** (1999) Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 1, pp 9-14.
- Maldini, M., Nonnis Marzano, F., Fortes, G. G., Papa, R. et Gandolfi, G.** (2006) Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture* **261**, 2, pp 487-494.
- Margulis, L.** (1970) dans Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth, ed.

- Medina, I., Aubourg, S. P. et Pérez Martín, R.** (1997) Species differentiation by multivariate analysis of phospholipids from canned atlantic tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 7, pp 2495-2499.
- Meijerink, J., Mandigers, C., Van de Locht, L., Tönnissen, E., Goodsaid, F. et Raemaekers, J.** (2001) A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics* 3, 2, pp 55-61.
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F. et Vandesompele, J.** (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology* 10, 6, p R64.
- Meyer, A.** (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes* 2, pp 1-38.
- Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Simoni, P., Baraldini, M., De Laude, L. et Roda, A.** (2007) One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of yellowfin (*Thunnus albacares*), bigeye (*Thunnus obesus*), and skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and canned tuna samples. *J. Agric. Food Chem.* 55, 19, pp 7638-7647.
- Miyake, M. P.** (2010) dans Recent developments in the tuna industry: stocks, fisheries, management, processing, trade and markets, ed., Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Molkentin, J., Lehmann, I., Ostermeyer, U. et Rehbein, H.** (2015) Traceability of organic fish – authenticating the production origin of salmonids by chemical and isotopic analyses. *Food Control* 53, pp 55-66.
- Moore, J. C., Spink, J. et Lipp, M.** (2012) Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* 77, 4, pp R118-R126.
- Mueller, S., Handy, S. M., Deeds, J. R., George, G. O., Broadhead, W. J., Pugh, S. E. et Garrett, S. D.** (2015) Development of a COX1 based PCR-RFLP method for fish species identification. *Food Control* 55, 0, pp 39-42.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. et Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 263-273.
- Naaum, A. et Hanner, R.** (2016) dans Seafood authenticity and traceability: A DNA-based perspective, ed., Academic Press.
- Nakamura, I. et Séret, B.** (2002) Field identification key of tunas of the genus *Thunnus*. *Cybium* 26, 2, pp 141-145.
- Nass, S. et Nass, M. M. K.** (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *The Journal of cell biology* 19, 3, pp 613-629.
- Nollet, L. M. et Toldrá, F.** (2009) dans Handbook of seafood and seafood products analysis, ed., CRC Press.
- Pääbo, S.** (1989) Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 6, pp 1939-1943.
- Paine, M. A., McDowell, J. R. et Graves, J. E.** (2007) Specific identification of western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome C

- oxidase subunit I (COI) gene region sequences. *Bulletin of Marine Science* **80**, 2, pp 353-367.
- Paine, M. A., McDowell, J. R. et Graves, J. E.** (2008) Specific identification using COI sequence analysis of scombrid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island. *Ichthyological Research* **55**, 1, pp 7-16.
- Pardo, M. A. et Pérez-Villareal, B.** (2004) Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. *Food Chem.* **86**, 1, pp 143-150.
- Partis, L. et Wells, R. J.** (1996) Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes* **10**, 6, pp 435-441.
- Pedrosa-Gerasmio, I. R., Babaran, R. P. et Santos, M. D.** (2012) Discrimination of juvenile yellowfin (*Thunnus albacares*) and bigeye (*T. obesus*) tunas using mitochondrial DNA control region and liver morphology. *PLoS One* **7**, 4, p e35604.
- Pepe, T., Carpentieri, A., Amoresano, A., Anastasio, A., Ventrone, I., Cortesi, M. L. et Ceruso, M.** (2012) dans Differentiation of four tuna species by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometric analysis, ed., INTECH Open Access Publisher.
- Pepe, T., Ceruso, M., Carpentieri, A., Ventrone, I., Amoresano, A. et Anastasio, A.** (2010) Proteomics analysis for the identification of three species of *Thunnus*. *Veterinary research communications* **34**, 1, pp 153-155.
- Portetelle, D., Haezebroeck, V., Mortiaux, F. et Renaville, R.** (2000) Traçabilité dans la filière animale. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **4**, 4, pp 233-240.
- Quinteiro, J., Santaclara, F. J. et Rehbein, H.** (2008) dans Quality parameters in canned seafood A.G. Cabado, J. M. V., Ed. pp 135-158, Nova Science Publishers, Inc.
- Quinteiro, J., Sotelo, C. G., Rehbein, H., Pryde, S. E., Medina, I., Perez-Martin, R. I., Rey-Mendez, M. et Mackie, I. M.** (1998) Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4, pp 1662-1669.
- Ram, J. L., Ram, M. L. et Baidoun, F. F.** (1996) Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 8, pp 2460-2467.
- Rasmussen, R.** (2001) dans Rapid cycle real-time PCR Ed. pp 21-34, Springer.
- Rasmussen, R. S. et Morrissey, M. T.** (2008) DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **7**, 3, pp 280-295.
- Rasmussen, R. S. et Morrissey, M. T.** (2009) Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **8**, 2, pp 118-154.
- Rastogi, G., Dharne, M. S., Walujkar, S., Kumar, A., Patole, M. S. et Shouche, Y. S.** (2007) Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science* **76**, 4, pp 666-674.

- Ratnasingham, S. H., P.** (2007) BOLD : The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* (2007).
- Règlement CE 104.** (2000) Règlement (CE) n°104/2000 du 17 décembre 1999 portant organisation commune des marchés dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- Règlement CE 1536.** (1992) Règlement (CEE) n°1536/92 du Conseil du 9 juin 1992 fixant les normes communes de commercialisation pour les conserves de thon et de bonite. *Règlement (CE) 1536*, L 163/1.
- Règlement CE 2065.** (2001) Règlement (CE) n°2065/2001 de la commission du 22 octobre 2001 établissant les modalités d'application du règlement (CE) n°104/2000 du conseil en ce qui concerne l'information du consommateur dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- Rehbein, H.** (1990) Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 191, 1, pp 1-10.
- Rehbein, H., Kündiger, R., Pineiro, C. et Perez-Martin, R. I.** (2000) Fish muscle parvalbumins as marker proteins for native and urea isoelectric focusing. *Electrophoresis* 21, 8, pp 1458-1463.
- Rehbein, H., Mackie, I. M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Perez-Martin, R., Quinteiro, J. et Rey-Mendez, M.** (1998) Comparison of different methods to produce single-strand DNA for identification of canned tuna by single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis* 19, 8-9, pp 1381-1384.
- Rehbein, H., Mackie, I. M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martin, R., Quinteiro, J. et Rey-Mendez, M.** (1999) Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chem.* 64, 2, pp 263-268.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P. et Quilici, M. L.** (2010) Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 143, 3, pp 190-197.
- Rodriguez-lazaro, D.** (2003) A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *Journal of Microbiological Methods* 54, 3, pp 381-390.
- Ruijter, J. M., Lorenz, P., Tuomi, J. M., Hecker, M. et Van den Hoff, M. J.** (2014) Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. *Microchimica Acta* 181, 13-14, pp 1689-1696.
- Russell, V. J., Hold, G. L., Pryde, S. E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Sotelo, C. G., Pérez-Martin, R. I., Santos, A. T. et Rosa, C.** (2000) Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 6, pp 2184-2188.
- Rutledge, R. G.** (2004) Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications. *Nucleic Acids Research* 32, 22, pp e178-e178.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. et Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 4839, pp 487-91.
- Sánchez, A., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Perez-Martín, R. I. et Sotelo, C. G. (2009) Identification of european hake species (*Merluccius merluccius*) using real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 9, pp 3397-3403.
- Santaclara, F. J., Espiñeira, M., Cabado, A. G., Aldasoro, A., Gonzalez-Lavín, N. et Vieites, J. M. (2006) Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 22, pp 8461-8470.
- Santaclara, F. J., Velasco, A., Pérez-Martín, R. I., Quinteiro, J., Rey-Méndez, M., Pardo, M. A., Jimenez, E. et Sotelo, C. G. (2015) Development of a multiplex PCR-ELISA method for the genetic authentication of *Thunnus* species and *Katsuwonus pelamis* in food products. *Food Chem.* 180, pp 9-16.
- Satoh, K., Okamoto, H., Fukuda, T., Kenji, N., Sasaki, Y. et Oshima, T. (2010) Accuracy of species identification of yellowfin and bigeye in three canneries of Kingdom of Thailand. *Western and central Pacific fisheries commission Scientific committee sith regular session Nuku'alofa, Tonga*.
- Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H., Aubrey, A. D., Bada, J. et Poinar, H. (2009) New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Res* 37, 10, pp 3215-29.
- Seyhan, D. et Turan, C. (2016) DNA barcoding of Scombrid species in the Turkish marine waters. *DNA* 22, 1.
- Shendure, J. et Ji, H. (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 10, pp 1135-45.
- Smith, P., Conroy, A. et Taylor, P. (1994) Biochemical-genetic identification of northern bluefin tuna *Thunnus thynnus* in the New Zealand fishery. *New Zealand journal of marine and freshwater research* 28, 1, pp 113-117.
- Taanman, J.-W. (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1410, 2, pp 103-123.
- Tanaka, T., Sasaki, T., Amemiya, Y., Takeyama, H., Chow, S. et Matsunaga, T. (2006) Discrimination of DNA mismatches by direct force measurement for identification of tuna species. *Analytica Chimica Acta* 561, 1-2, pp 150-155.
- Taquet, M., Blanc, M., Dagorn, L., Filmalter, J. D., Fonteneau, A., Forget, F., Gaertner, J.-C., Galzin, R., Gervain, P., Goujon, M., Guillotreau, P., Guyader, O., Hall, M., Holland, K., Itano, D., Monteagudo, J.-P., Morales-Nin, B., Reynal, L., Sharp, M., Sokimi, W., Tanetoa, M. et Yen Kai Sun, S. (2011) Artisanal and industrial FADs: a question of scale. Tahiti conference reviews current FAD use and technology. *Fisheries Newsletter* 136, pp 35-45.



- Teletchea, F.** (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19, 3, pp 265-293.
- Terio, V., Di Pinto, P., Decaro, N., Parisi, A., Desario, C., Martella, V., Buonavoglia, C. et Tantillo, M. G.** (2010) Identification of tuna species in commercial cans by minor groove binder probe real-time polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Cell. Probes* 24, 6, pp 352-356.
- Terol, J., Mascarell, R., Fernandez-Pedrosa, V. et Pérez-Alonso, M.** (2002) Statistical validation of the identification of tuna species: Bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5, pp 963-969.
- Than, L. T. L., Chong, P. P., Ng, K. P. et Seow, H. F.** (2015) Detection of medically important *Candida* species by absolute quantitation real-time polymerase chain reaction. *Jundishapur journal of microbiology* 8, 1.
- Tseng, M. C., Shiao, J. C. et Hung, Y. H.** (2011) Genetic identification of *Thunnus orientalis*, *T. thynnus*, and *T. maccoyii* by a cytochrome b gene analysis. *Environmental Biology of Fishes* 91, 1, pp 103-115.
- Unseld, M., Beyermann, B., Brandt, P. et Hiesel, R.** (1995) Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods Appl.* 4, 4, pp 241-243.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. et Rozen, S. G.** (2012) Primer3 new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* 40, 15, pp e115-e115.
- Velasco, A., Sánchez, A., Martínez, I., Santaclara, F. J., Pérez-Martín, R. I. et Sotelo, C. G.** (2013) Development of a Real-Time PCR method for the identification of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Chemistry* 141, 3, pp 2006-2010.
- Verrez-Bagnis, V., Bojolly, D., Cardineau, L., Le Fur, B., Grard, T. et Doyen, P.** (2016) Preliminary development of a probe-based fluorescence melting analysis for quick testing of the presence of more than one scombridae fish species in canned tuna, *46th WEFTA*.
- Viñas, J. et Tudela, S.** (2009) A validated methodology for genetic identification of tuna species (genus *Thunnus*). *PLoS One* 4, 10, p e7606.
- Vogelstein, B. et Kinzler, K. W.** (1999) Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 16, pp 9236-9241.
- Ward, R. D., Elliott, N. G. et Grewe, P. M.** (1995) Allozyme and mitochondrial DNA separation of pacific northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus orientalis* (Temminck and Schlegel), from southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau). *Mar. Freshwater Res.* 46, pp 921-30.
- Ward, R. D., Hanner, R. et Hebert, P. D. N.** (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J. Fish Biol.* 74, 2, pp 329-356.
- Warner, K., Timme, W., Lowell, B. et Hirschfield, M.** (2013) Oceana study reveals seafood fraud nationwide, pp 1-69.
- White, R. A., Blainey, P. C., Fan, H. C. et Quake, S. R.** (2009) Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC genomics* 10, 1, p 116.

- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. et Rasmussen, R. P.** (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 1, pp 130-139.
- Wong, M. L. et Medrano, J. F.** (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 1, p 75.

**Sites Internet utilisés**

<http://agriculture.gouv.fr/quel-bilan-un-apres-le-horsegate>

<http://archimer.ifremer.fr/doc/00115/22657/20383.pdf>

<http://fishbase.mnhn.fr/search.php?lang=French>

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

<http://oceans.greenpeace.fr/petit-navire-gros-degats>

<http://primer3plus.com/>

<http://species-identification.org/>

<http://www.barcodeoflife.org/>

<http://www.fishbol.org/>

<http://www.ifremer.fr/peche/Le-monde-de-la-peche/La-peche/comment/Les-engins/Sennes>

<http://www.laconserve.com/>

<http://www.marinespecies.org/>

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<https://www.vetofish.com/>

[www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)

# Annexes



## Annexe 1 : Présentation des caractéristiques des couples amorces/sonde

Gène	Espèce	Numero d'accension	Nom		Sequence	Melting temperature (°C)	Nom	Sequence	Taille amplicon (pb)
			Forward (sens) / Reverse (anti-sens)						
			Amorces			Sondes			
Cytb	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	DQ197958.1	F_Kp_Cyt b1 (non spécifique) R_Kp_Cyt b1 (spécifique)		cagccttcgctcagtagc gaggttagaacccgtagtagagacc	61,2 58,8	pas de sonde	pas de sonde	143
	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	DQ197958.1	F_Kp_Cyt b2 (non spécifique) R_Kp_Cyt b2 (spécifique)		cagccttcgctcagtagc agccttagaacccgtagtagagacc	61,2 59,7	pas de sonde	pas de sonde	144
	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	DQ197958.1	F_Kp_Cyt b3 (non spécifique) R_Kp_Cyt b3 (non spécifique)		agccttcgctcagtagc gcagatgaagaagaaggagacc	62 58,3	S_Kp_Cyrb3	tcgaaacctccatgccaacg	97
	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	DQ197958.1	F_Kp_Cyt b4 (non spécifique) R_Kp_Cyt b4 (non spécifique)		gccttcgctcagtagc gcagatgaagaagaaggagacc	61,1 58,3	S_Kp_Cyrb4	tcgaaacctccatgccaacg	96
	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	DQ197958.1	F_Kp_Cyt b5 (non spécifique) R_Kp_Cyt b5 (spécifique)		cagccttcgctcagtagc gaggttagaacccgtagtagagacc	61,2 58,8	S_Kp_Cyrb5	tcgaaacctccatgccaacg	143
	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	DQ197958.1	F_Kp_Cyt b6 (non spécifique) R_Kp_Cyt b6 (non spécifique)		ccaccctcctcaacttc tctggcagataatgggcttac	60,5 60,2	S_Kp_Cyrb6	tgacgtagaatacagccttcgacctca	151
	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	HQ945894.1	F_Kp_COI 1 (spécifique) R_Kp_COI 1 (spécifique)		tgctggaacaggttgaacag ggctcacaagaacagagagatt	59,9 59,8	pas de sonde	pas sonde	199
	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	HQ945894.1	F_Kp_COI 2 (spécifique) R_Kp_COI 2 (spécifique)		tgctggaacaggttgaacag acggctcatabaagaacagaggg	59,9 60,3	S_Kp_COI 2	tgcaagggtttcttcaattcttgg	201
	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	HQ945894.1	F_Kp_COI 3 (spécifique) R_Kp_COI 3 (spécifique)		cctctgtctatagcct aaagaattgggtctctccac	60,3 59,4	pas de sonde	pas de sonde	147
	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	HQ945894.1	F_Kp_COI 4 (spécifique) R_Kp_COI 4 (spécifique)		cctctgtctatagcct aaagaattgggtctctccac	60,3 59,4	S_Kp_COI 4	tgctcctccagttcttgcgct	147
<i>Katsuwonus Pelamis</i>	AY971773.1	F_Kp_COI 1 (spécifique) R_Kp_COI 1 (non spécifique)		ggacacataatgatacgaagc ggattacttcggttggctgc	59,6 59,9	pas de sonde	pas de sonde	134	
<i>Katsuwonus Pelamis</i>	AY971773.1	F_Kp_COI 2 (spécifique) R_Kp_COI 2 (non spécifique)		cggacacataatgatacgaagc ggattacttcggttggctgc	59,6 59,9	S_Kp_COI 2	acaagacctggcccccggtc	134	
<i>Thunnus Albacares</i>	AY971768.1	F_Talb_COI 1 (spécifique) R_Talb_COI 1 (non spécifique)		gaaataacgacccccatc ccagggttaagttgtgt	60,1 59,2	pas de sonde	pas de sonde	128	
<i>Thunnus Albacares</i>	AY971768.1	F_Talb_COI 2 (spécifique) R_Talb_COI 2 (non spécifique)		aaatacagacccccatc ccagggttaagttgtgt	59,2 59,2	pas de sonde	pas de sonde	127	
<i>Thunnus Albacares</i>	AY971768.1	F_Talb_COI 3 (spécifique) R_Talb_COI 3 (non spécifique)		caagccccatcaaaa atctgaggagaataagga	60,7 59,7	pas de sonde	pas de sonde	205	
<i>Thunnus Albacares</i>	AY971768.1	F_Talb_COI 4 (non spécifique) R_Talb_COI 4 (non spécifique)		cttccctccacgacttc cactattgggtgctgcttc	60,6 59,7	S_Talb_COI 4	tggaagaatacaagacccccca	198	
<i>Thunnus Albacares</i>	AY971768.1	F_Talb_COI 5 (non spécifique) R_Talb_COI 5 (non spécifique)		cttccctccacgacttc cactattgggtgctgcttc	60,6 59,7	S_Talb_COI 5	atgaaatacaagacccccatctaa	198	
<i>Thunnus Albacares</i>	AY971768.1	F_Talb_COI 6 (non spécifique) R_Talb_COI 6 (non spécifique)		cttccctccacgacttc cactattgggtgctgcttc	60,6 59,7	S_Talb_COI 6	atgaaatacaagacccccatctaa	198	
<i>Thunnus Albacares</i>	AY971768.1	F_Talb_COI 7 (non spécifique) R_Talb_COI 7 (non spécifique)		cttccctccacgacttc cactattgggtgctgcttc	60,6 59,7	S_Talb_COI 7	atgaaatacaagacccccatctaa	198	
<i>Thunnus Albacares</i>	AY971768.1	F_Talb_COI 8 (non spécifique) R_Talb_COI 8 (non spécifique)		cttccctccacgacttc cactattgggtgctgcttc	60,6 59,7	S_Talb_COI 8	atgaaatacaagacccccatctaa	198	

En jaune : couple sélectionné pour l'identification

Gène	Espèce	Numero d'accession	Nom		Amorces		Sondes				
			Forward (sens) / Reverse (anti-sens)	Nom	Sequence	Melting temperature (°C)	Nom	Sequence	Taille amplicon (pb)		
Katsuwonus Pelamis	Katsuwonus Pelamis	AB101290.1	F_Kp_NDII_1 (spécifique)	ataccctgcctcatctcc		59,7	S_Kp_NDII_1	tgcgcgcgcatgctat	140		
			R_Kp_NDII_1 (spécifique)	tcctgtgagtaagcattgg		59,8					
			F_Kp_NDII_2 (spécifique)	ataccctgcctcatctcc		59,7	pas de sonde			140	
			R_Kp_NDII_2 (spécifique)	tcctgtgagtaagcattgg		59,8					
			F_Kp_NDII_3 (spécifique)	cctacgaatgacccaacc		59,5	pas de sonde				111
			R_Kp_NDII_3 (spécifique)	ggagtagcagaggatgttc		60,3					
Katsuwonus Pelamis	Katsuwonus Pelamis	AB101290.1	F_Kp_NDII_4 (spécifique)	catttgcctaatcctcaa		59,9	S_Kp_NDII_4	tcaccaaccaaccacaat	105		
			R_Kp_NDII_4 (spécifique)	gggtttggtttagtcacctc		59,7					
Katsuwonus Pelamis	Katsuwonus Pelamis	AB101290.1	F_Kp_NDII_5 (spécifique)	catttgcctaatcctcaa		59,9	pas de sonde		105		
			R_Kp_NDII_5 (spécifique)	gggtttggtttagtcacctc		59,7					
Katsuwonus Pelamis	Katsuwonus Pelamis	AB101290.1	F_Kp_NDII_6 (spécifique)	accacagcagtagaagca		61	S_Kp_NDII_6	tgcgcgcgcatgctat	148		
			R_Kp_NDII_6 (spécifique)	attattgttggggacagg		59,5					
Thunnus obesus	Thunnus obesus	NC_014059.1	F_Tob_NDII_1 (non spécifique)	ccagttcagcctgactcc		60,7	pas de sonde		121		
			R_Tob_NDII_1 (spécifique)	gggtttggatggatttc		60,2					
Thunnus obesus	Thunnus obesus	NC_014059.1	F_Tob_NDII_2 (non spécifique)	ccagttcagcctgactcc		60,7	S_Tob_NDII_2	ttgacaaaagctgcctcttc	121		
			R_Tob_NDII_2 (spécifique)	gggtttggatggatttc		60,2					
Thunnus obesus	Thunnus obesus	NC_014059.1	F_Tob_NDII_3 (non spécifique)	agcaccactaacctgact		59,9	S_Tob_NDII_3	ctaccataatcactggcactgcac	173		
			R_Tob_NDII_3 (non spécifique)	gacaggatcagccctgtt		60,1					
Thunnus Albacares	Thunnus Albacares	NC_014061.1	F_Talb_NDII_1 (spécifique)	ccagcgttacactactacc		59,8	S_Talb_NDII_1	tggccttcaccactacaggttt	201		
			R_Talb_NDII_1 (non spécifique)	catggtagagcattgctgtagg		60,9					
Thunnus Albacares	Thunnus Albacares	NC_014061.1	F_Talb_NDII_2 (spécifique)	cagccttacactactacc		59,8	S_Talb_NDII_2	tggccttcaccactacaggttt	190		
			R_Talb_NDII_2 (non spécifique)	gtcattgctgtaggacagtcg		59,3					
Thunnus obesus	Thunnus obesus	NC_014059.1	F_Tob_NDII_4 (non spécifique)	ctagccactcctgagcaaa		60,5	S_Tob_NDII_4	ttcttctcctaggcggcttcca	99		
			R_Tob_NDII_4 (non spécifique)	tggcatgaaacctgtagtg		60,7					
Thunnus obesus	Thunnus obesus	NC_014059.1	F_Tob_NDII_5 (non spécifique)	ctagccactcctgagcaaa		60,5	S_Tob_NDII_5	ttcttctcctaggcggcttcca	140		
			R_Tob_NDII_5 (non spécifique)	ggcaggctgttttgacagt		59,2					
Rhod	Thunnus obesus	DQ197915.1	F_Tob_Rhod_1 (non spécifique)	ttcttctgctatggcctct		60	S_Tob_Rhod_1	tcatggctgtgcccctctcgtt	190		
			R_Tob_Rhod_1 (non spécifique)	actcagcgcctgattgt		60,8					
165	UNIVERSELLE	GU946664.1	F_16S_1 (universelle)	ggtagcgaactcactgtctt		59,4	S_16S_2	cccgtgcagaagcagggat	146		
			R_16S_1 (universelle)	agctccatagggcttctcgt		59,4					
12 S	UNIVERSELLE	GU946664.1	F_16S_1 (universelle)	ggtagcgaactcactgtctt		59,4	S_16S_3	cattcagaggcttaactgctccttt	146		
			R_16S_1 (universelle)	agctccatagggcttctcgt		59,4					
12 S	UNIVERSELLE	AB176811.1	F_12S_1 (universelle)	gacttggcggctacttagatcc		59,2	S_12S_1	aaccgatgacccccgttcaa	107		
			R_12S_1 (universelle)	tgaacgacgcggatatagg		60,9					

En jaune, le couple sélectionné pour l'identification des

## Annexe 2 : Valorisation des travaux

### **Articles dans des journaux internationaux à comité de lecture**

Bojolly, D., Doyen, P., Le Fur, B., Christaki, U., Verrez-Bagnis, V. et Grard, T. (2017) Development of a qPCR method for the identification and quantification of two closely related tuna species, bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in canned tuna, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, pp 913-920. (Annexe 3 page 145).

### **Actes de congrès avec comité de lecture**

Verrez-Bagnis, V., Bojolly D., Le Fur, B., Christaki, U., Grard, T. et Doyen, P. (2017) Preliminary development of a probe-based fluorescence melting analysis for quick testing of the presence of more than one Scombridae fish species in canned tuna (WEFTA, 2016 Proceedings), sous presse. (Annexe 4 page 177).

### **Communications orales**

Bojolly, D., Doyen, P., Lefur, B., Christaki, U., Verrez-Bagnis, V. et Grard, T. Développement d'une méthode d'identification et de quantification des espèces de thon dans les produits appertisés par PCR en temps réel (2014), Doctoriales de la Mer ; 9 Octobre 2014, Boulogne-sur-Mer (France).

Bojolly, D., Doyen, P., Lefur, B., Christaki, U., Verrez-Bagnis, V. et Grard, T. Développement d'une méthode d'identification et de quantification des espèces de thon dans les produits appertisés par PCR en temps réel (2014) Journée des doctorants Institut Violette (2014) ; 21 Novembre 2014, Lille (France).

**Bojolly D.**, Verrez-Bagnis, V., Lefur, B., Christaki, U., Grard, T. et Doyen, P. Authentification et quantification d'espèces de thon dans les produits appertisés (2015) 1<sup>er</sup> colloque QSPA (Qualité et sécurité des produits aquatiques) ; 17-19 juin 2015, Boulogne-sur-Mer (France).

Bojolly D., Verrez-Bagnis, V., Lefur, B., Christaki, U., Grard, T. et Doyen, P. Development of a qPCR method for the identification et quantification of *Thunnus obesus*, *Thunnus albacares* et *Katsuwonus pelamis* in canned tuna



(2015) 5<sup>th</sup> Trans Atlantic Fisheries Technology Conference (TAFT) ; 12-15 October 2015, Nantes (France).

**Bojolly D.**, Verrez-Bagnis, V., Lefur, B., Christaki, U., Grard, T. et Doyen, P. Development of a qPCR method for the identification et quantification of *Thunnus obesus*, *Thunnus albacares* et *Katsuwonus pelamis* in canned tuna (2015) Journée des doctorants et post-doctorants Anses ; 19 Novembre 2015, Paris (France).

### ***Communications affichées***

**Bojolly D.**, Verrez-Bagnis, V., Lefur, B., Christaki, U., Grard, T. et Doyen, P. Authentification et quantification d'espèces de thon dans les produits appertisés (2015) 1<sup>er</sup> colloque QSPA (Qualité et sécurité des produits aquatiques) ; 17-19 juin 2015, Boulogne-sur-Mer (France).

Verrez-Bagnis, V., **Bojolly D.**, Lefur, B., Christaki, U., Grard, T. et Doyen, P. Preliminary study for the development of a probe-based fluorescence melting analysis for quick testing of the presence of more than one Scombridae fish species in food products. West European Fish Technologists Association (WEFTA), 12-14 Octobre 2016, Split (Croatie).

**Annexe 3 : Development of a qPCR method for the identification and quantification of two closely related tuna species, bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in canned tuna**



Full title: Development of a qPCR method for the identification and quantification of two closely related tuna species, bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in canned tuna

**Daline Bojolly<sup>a,f,h</sup>, Périne Doyen<sup>a,b,c,d,e</sup>, Bruno Le Fur<sup>h</sup>, Urania Christaki<sup>f</sup>, Véronique Verrez-Bagnis<sup>g</sup>, Thierry Grard<sup>a,b,c,d,e,\*</sup>**

<sup>a</sup>Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV – Institut Charles Viollette, USC Anses – ULCO, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

<sup>b</sup>Univ. Lille, F-59000 Lille, France

<sup>c</sup>Univ. Artois, F-62000 Arras, France

<sup>d</sup>INRA, France

<sup>e</sup>ISA, F-59000 Lille, France

<sup>f</sup>Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, UMR 8187 (ULCO, Lille 1, CNRS), Wimereux, France

<sup>g</sup>Ifremer, F-44300 Nantes, France

<sup>h</sup>PFINV, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

E-mail of each author:

[daline.bojolly@univ-littoral.fr](mailto:daline.bojolly@univ-littoral.fr)

[perine.doyen@univ-littoral.fr](mailto:perine.doyen@univ-littoral.fr)

[bruno.lefur@pfinouvellesvagues.com](mailto:bruno.lefur@pfinouvellesvagues.com)

[urania.christaki@log.cnrs.fr](mailto:urania.christaki@log.cnrs.fr)

[veronique.verrez@ifremer.fr](mailto:veronique.verrez@ifremer.fr)

\*Corresponding author: Thierry Grard

Tel: +33 3 21 99 45 20; Fax: +33 3 21 99 45 08. E-mail address: [thierry.grard@univ-littoral.fr](mailto:thierry.grard@univ-littoral.fr)



## ***Abstract***

Bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and yellowfin tuna (*T. albacares*) are among the most widely used tuna species for canning purpose. Not only is substitution, but also mixing of tuna species is prohibited by the European regulation for canned tuna products. However, as juveniles of bigeye and yellowfin tunas are very difficult to distinguish, unintentional substitutions may occur during the canning process. In this study, two mitochondrial markers from NADH dehydrogenase subunit 2, and cytochrome c oxidase subunit II genes were used to identify bigeye tuna and yellowfin tuna, respectively, utilizing TaqMan qPCR methodology. Two different qPCR based methods were developed to quantify the percentage of flesh of each species used for can processing. The first one was based on absolute quantification using standard curves realized with these two markers; the second one was founded on relative quantification with the universal 12S rRNA gene as the endogenous gene. Based on our results, we conclude that our methodology could be applied to authenticate these two closely related tuna species when used in a binary mix in tuna cans.

**Keywords:** tuna, authentication, quantification, canned products, TaqMan, qPCR, species identification, bigeye tuna (*Thunnus obesus*), yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)

## **Introduction**

Recent years have been marked by various food scandals such as 'Horsegate' (meat adulteration crisis in Europe in 2013), and the results of fish products mislabeling studies [Warner et al., \(2013\)](#) [Bénard-Capelle et al., \(2015\)](#). These events have highlighted the need: to set up an enhanced traceability system to improve quality process in industries; to reinforce consumer protection; and to reduce fraudulent activities. Seafoods are in the 'top ten' food products that are most likely to be subject of fraud [Moore et al., \(2012\)](#). Among these is one of the major marine species captured in 2012 [FAO, \(2014\)](#), tuna, which represents an important economic value in the canning industry. According to the European legislation, mixing of tuna species in tuna cans is strictly forbidden [Council regulation 1536, \(1992\)](#). However, substitutions between tuna species could appear during the filleting and canning process when external morphological characteristics, such as dorsal fins or finlets, are removed and fillets with similar appearance and texture are obtained. Furthermore, difficulties exist in identifying juveniles of bigeye tuna (*Thunnus obesus*, Lowe, 1839) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*, Bonnaterre, 1788) due to their similarity [Nakamura et Séret, \(2002\)](#). Moreover, these two species are often captured together from the same schools, particularly

around the fish aggregation devices (FADs) [Miyake, \(2010\)](#), which are extensively used nowadays, resulting in potential substitutions. It was these observations that led this study to focus on these two particular species.

Several methods have been developed to identify species when the flesh is raw or cooked. Prior to the 1990s, the most used technique was the isoelectric, which focused on proteins (IEF) based on sarcoplasmic protein profiles [Etienne et al., \(2000\)](#). However, sterilization, which takes place during canning process, induces an irreversibly denaturation of proteins [Mackie et al., \(1999\)](#). Furthermore, IEF is sometimes of no value in discriminating fish species within families such as scombridae (mackerels, tunas, and bonitos) [Mackie et al., \(1999\)](#). DNA however, represents a great advantage over proteins as it is stable at high temperatures, is present in all cells of the animal, and is endowed with a greater variability linked to genetic codes [Mackie, \(1996\)](#). Consequently, biomolecular DNA techniques to identify fish species, including tuna species, have been developed for more than 20 years [Unselde et al., \(1995\)](#). DNA degrades during heat treatment into small fragments [Quinteiro et al., \(1998\)](#), but these are nevertheless, informative enough to differentiate even closely related tuna species [Bartlett et Davidson, \(1991\)](#), [Unselde et al., \(1995\)](#). Although the regions of both nuclear DNA (nDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA) can be amplified by a polymerase chain reaction (PCR) [Asensio, \(2007\)](#), mtDNA has preferentially been used for authentication of the species, in particular when the starting sample has suffered intense heat treatments [Borgo et al., \(1996\)](#). Concerning canned tuna, most studies show a preference to mtDNA in relation to nDNA because of its relative abundance and its circular structure, which provides greater resistance to thermal degradation [Borgo et al., \(1996\)](#) [Bossier, \(1999\)](#) [Civera, \(2003\)](#). It has actually been shown that intense heating, as applied in the processing of canned tuna, highly degrades DNA, cleaving it into tiny fragments. The average size of DNA fragments for canned products is between <100 and 360 bp compared to that of  $\leq 20000$  bp for frozen products [Quinteiro et al., \(1998\)](#) [Rasmussen et Morrissey, \(2009\)](#). The mitochondrial gene cytochrome b has been one of the most commonly used for DNA-based fish species identification analysis; used extensively to identify flatfish, gadoids, eels, anchovies, and scombrids [Rasmussen et Morrissey, \(2008\)](#). Nowadays, other genes are also used as markers to differentiate between fish species, like the cytochrome oxidase I (COI) coding gene, which is extensively used in the Barcode of Life project [Hebert et al., \(2003\)](#), and its declination for fish in the Fish Barcode of Life initiative (FISH-BOL) [Ward et al., \(2009\)](#). Nevertheless, a number of studies have shown that the cytochrome oxidase subunit 1 gene was not necessarily the best candidate

to differentiate between species of tuna [Viñas et Tudela, \(2009\)](#); [Pedrosa-Gerasmio et al., \(2012\)](#). A large range of DNA-based methods have been developed to identify scombrid species, mainly using mitochondrial gene fragments as markers [Viñas et Tudela, \(2009\)](#); [Chow et Kishino, \(1995\)](#); [Ram et al., \(1996\)](#); [Michelini et al., \(2007\)](#). Previous studies have used real time PCR with TaqMan probe methods to identify tuna species [Lopez et Pardo, \(2005\)](#); [Chuang et al., \(2012\)](#). However, in most of these studies, real time PCR was mainly used for identification of the different tuna species. According to current knowledge, no method exists to quantify the amount of DNA from bigeye tuna and yellowfin tuna in a mix.

Thus, the aim of this study was to develop a routine TaqMan-based qPCR method to identify and quantify bigeye tuna and yellowfin tuna in canned products. DNA markers were focused on to distinguish bigeye tuna from yellowfin tuna, which are genetically closely related. The first step of this study was to design a specific TaqMan probe that would allow the identification of these two species. The second step was to develop two comparative quantitative methods to determine the percentage of each of these two species in mixed canned tuna products.

## Materials and methods

### Samples collection

#### *Raw material*

The two species of tuna being studied were purchased from commercial fishing vessels by the 'innovation platform for aquatic products' (Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues, (PFINV), Boulogne sur Mer, France, <http://pfinouvellesvagues.com/?lang=en>). Entire individuals of bigeye tuna and yellowfin tuna were sampled, and originated from the Atlantic, Pacific, and Indian oceans (10 individuals per ocean and per species). Before filleting, individuals were identified according to morphological characters using identification keys from the FAO Species Catalogue [Collette et Nauen, \(1983\)](#). A piece of muscle tissue was sampled from each individuals and was used in the preliminary studies on raw tissue for the development of the primers and TaqMan probe. The remaining fillets were stored at -20°C until DNA extraction. Reference materials of scombrid specimens were provided by tissue collection from the French Research Institute for Exploitation of the Sea (Ifremer: [http://wwz.ifremer.fr/institut\\_eng/](http://wwz.ifremer.fr/institut_eng/)) in order to validate the developed "primers/probe systems".

#### *Canned tuna*



Twenty cans containing either yellowfin tuna or bigeye tuna (10 cans per fish species) were prepared by PFINV using the techniques applied in the canning industry in order to obtain standardized cans. The previously frozen fillets were thawed to a temperature of between 0 and 2°C. Tins (diameter = 55 mm, 1/12 can) were then filled with 80 g of raw flesh and brine. Cans were crimped and sterilized at 116°C to the sterilizing value ( $F_0$ ) for 7 min.

In order to simulate involuntary and voluntary rate substitutions in canned products, tuna cans of different mixtures of tuna fillets were prepared according to the following bigeye tuna/yellowfin tuna ratios: 99/1; 95/5; 90/10; 75/25; 50/50; 25/75; 10/90; 5/95 and 1/99 (e.g. the can containing the mix bigeye tuna/yellow fin tuna 75/25 was made with 75% of bigeye tuna and 25% of yellowfin tuna). For each mix, cans were prepared in quadruplicate by PFINV following the same process.

Finally, 29 commercial tuna cans were purchased randomly from local markets to validate the method. They were labelled as yellowfin tuna (10), bigeye tuna (5), albacore (3) and skipjack tuna (11).

### **DNA Extraction**

Before DNA extraction, brine was removed and tuna flesh was drained on filter paper. Two washing steps were followed: firstly with 70% ethanol, and then secondly with distilled water to eliminate any potential PCR inhibitors. After washing and drying, all flesh contained within the cans was finally homogenized using a mixer (Philips, France).

DNA extraction was performed according to the protocol described by Jérôme *et al.* (2003) [Jérôme \*et al.\*, \(2003a\)](#). Concentration and purity of extracted DNA were determined by measuring the absorbance of the DNA extracts at 260 nm, checking for protein impurities at 280 nm and organic compound contamination at 230 nm using a spectrophotometer (Denovix, La Madeleine, France). The DNA extracts were stored at -20°C until use.

### **Primers and probe design**

Primers and probe sequences were specifically designed to identify bigeye and yellowfin tuna. DNA sequences of different scombrid species were obtained from GenBank (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Alignments of DNA sequences were performed using Multalin software [Corpet, \(1988\)](#), [Kumar \*et al.\*, \(2008\)](#) to find conserved specific sites for species identification and to identify intraspecific variations. Following this study, fragments of the NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene was selected for bigeye tuna identification, and the cytochrome c oxidase subunit 2 (COII) gene for yellowfin tuna identification (Table 1). Moreover, sequence alignments of mitochondrial

12S rRNA gene were realized for the two species and a short 12S rRNA fragment gene (Table 1) was selected to be used as an endogenous gene.

Primers and TaqMan probes (Table 2) were designed using Primer3Plus software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Hydrolysis probes were labeled with carboxyfluorescein fluorescent reporter dye (FAM) on 5'-end and with a quencher (BHQ1) on the 3'-end. Primers and probe were synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany).

### **Quantitative real-time PCR conditions**

PCR reactions were carried out in a total volume of 20  $\mu\text{L}$  containing 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  of DNA template per well, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer, 0.2  $\mu\text{M}$  of probe, 10  $\mu\text{L}$  of PCR LightCycler 480 Probe Master (Roche, France) and RNase/DNase-free distilled water to adjust to the final volume (Roche, France).

PCR assays were performed in the LightCycler 480 thermocycler (Roche, France) under the following conditions: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 min.

Fluorescence data were analyzed using the LightCycler 480 software (LightCycler® SW 1.5.1). Each quantification cycle (Cq) value represented the average of Cq from three replicates.

### **qPCR amplification efficiency and standard curves**

Standard curves were performed with the DNA extracted from standardized cans prepared by PFINV containing only one species: yellowfin tuna or bigeye tuna. Standard curves for each species were the result of mixing DNA from several specimens. Ten-fold dilutions series of bigeye tuna and yellowfin tuna DNA extracts ranging from 100 to 0.01  $\text{ng}/\mu\text{L}$  were utilized to perform qPCR standard curves. PCR amplification efficiency of each primer/TaqMan probe system (ND2, COII and 12S –Table 2) was calculated. Standard curves corresponding to Cq for each DNA dilution were constructed using the Lightcycler 480 software. The linear correlation between Cq and initial concentration of standard samples ( $N_0$ ) is:  $Cq = a \cdot \log(N_0) + b$ , where 'a' is the slope and 'b' is the intercept. Values of amplification efficiency ( $E = (10^{-1/a})$ ) were calculated from the slopes of standard curves. For example, a slope of  $-3.7$  corresponds to a PCR efficiency of:  $10^{-1/-3.7} = 1.86$ , namely, a PCR efficiency of 86%.

### **Quantification methods**

DNA extracted from standardized cans containing binary mixtures of bigeye and yellowfin tunas was used to develop the two quantification methods. Four cans of each mixture

condition were analyzed, and for each can, DNA extracts were performed in quadruplicate. Each DNA extract gave rise to a double PCR analysis. This corresponded to 32 qPCR analysis for each mixture condition.

#### ***Method based on absolute quantification with standard curves***

The amounts of yellowfin tuna ([T.alb]) and bigeye tuna ([T.obe]) DNA in binary mixtures were deduced from the corresponding qPCR standard curves for each species. These measurements were transformed into percentages of one species (% T.alb or % T.obe) according to the following equations:

$$[\text{Total DNA of tuna}] = [\text{T.alb}] + [\text{T.obe}]$$

$$\text{Equation 1: yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) content (\%)} = \frac{[\text{T.alb}]}{[\text{Total DNA of tuna}]} * 100$$

$$\text{Equation 2: bigeye tuna (*Thunnus obesus*) content (\%)} = \frac{[\text{T.obe}]}{[\text{Total DNA of tuna}]} * 100$$

#### ***Method based on relative quantification with an endogenous gene***

For each studied tuna species, two independent standard curves were built in parallel, one was established for the target genes (ND2 or COII) and the other one for the endogenous 12S rRNA gene. Amounts of target and endogenous genes in samples were then extrapolated from the established standard curves. The percentages of each fish species in can samples were obtained following the equations previously used [Iwobi et al., \(2015\)](#):

$$\text{Equation 3: yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) content (\%)} = \frac{[\text{T.alb}]}{[\text{12S rRNA}]} * 100$$

$$\text{Equation 4: bigeye tuna (*Thunnus obesus*) content (\%)} = \frac{[\text{T.obe}]}{[\text{12S rRNA}]} * 100$$

#### **Specificity and sensitivity**

qPCR amplifications of serial dilutions of DNA extracts for the two species were performed to determine the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) values. The calculation of LOD and LOQ were established following those of previous studies [Bustin et al., \(2009\)](#). The LOD was assessed as the lowest amount of tuna-DNA that could be reliably distinguished from the blank matrix, whereas the LOQ was assessed as the lowest concentration at which the amount of tuna-DNA could not be reliably detected.

#### **Statistical Analyses**

Determination coefficients ( $R^2$ ) were calculated and data were analyzed by the chi-square test using PAleontological STatistics (PAST) software (version.3.07) to compare percentages obtained with the real values. Cq values were compared using the independent t-test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

Design of primers and probe from interspecific and intraspecific DNA variation studies

The first step of this work consisted in the development of two specific primer/TaqMan systems to identify and quantify bigeye tuna and yellowfin tuna by qPCR analysis. An interspecific genetic variability study among all mitochondrial molecular markers based on the availability of DNA sequences in GenBank database has been investigated to determine discriminatory regions for specific primer and probe design. Results of multiple mitochondrial DNA sequence alignments including the eight recognized species of *Thunnus* and seven selected bonitos (Table 1) revealed a high degree of similarity between these species as previously related [Bottero et al., \(2007\)](#). Informative sites are limited to only one or two nucleotides per 300 bp sequences due to the low variability in nucleotide sequences between yellowfin tuna and bigeye tuna. This lack of polymorphism makes it difficult to correct species identification with standard PCR methodology. It was necessary to develop a qPCR TaqMan-based methodology to identify the two tuna species and then to quantify the amount of DNA of each of the two tuna species.

Among all mitochondrial genes, only cytochrome c oxidase subunit 2 (COII) and NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) genes (table 1) showed discriminatory regions which would allow the identification of the two tuna species compared to the other scombridae species (data not shown). Informative regions of ND2 and COII were selected for design of primers and probe to respectively identify bigeye tuna and yellowfin tuna. Subsequent investigations of intraspecific variations for these two genes showed no intraspecific variability for bigeye tuna and yellowfin tuna sequences.

Primers and probe that allowed characterization of yellowfin tuna were obtained from the COII gene sequence (AY971768.1), whereas those designed for bigeye tuna identification were obtained from the ND2 gene (NC\_014059.1). The size of each amplicon was 99 bp and 198 bp for bigeye tuna and yellowfin tuna, respectively. The combination of primers and species-specific probe was called the “primers/probe system” (Table 2).

Furthermore, based on 12S rRNA sequences, 'universal' primers, allowing amplification of a common reference gene region, and probe were designed to recognize eight species of *Thunnus* and seven bonitos. Forward and reverse primers and TaqMan probe were designed from the 12S rRNA sequence (AB176811.1) giving a fragment of 107 bp (Table 2).

### Identification of the two tuna species

Many studies have been conducted for the development of identification methods of canned tuna or bonito species. Bartlett and Davidson (1991) were the first authors to develop a molecular method based on DNA sequencing of 307 bp mitochondrial cytochrome b gene to identify four tuna species (*T. thynnus*, *T. obesus*, *T. albacares*, *T. alalunga*) [Bartlett et Davidson, \(1991\)](#). They have further developed the FINS ((Forensically Informative Nucleotide Sequencing) method [Bartlett et Davidson, \(1992\)](#). In the case of canned tuna, short DNA fragments have to be amplified by PCR, because the severe heat treatment during the tuna canning process leads to heavy degradation of DNA [Quinteiro et al., \(2008\)](#). Unseld et al. (1995) showed that it is possible to distinguish between some tuna and bonito species by amplification and sequencing of a short 59 bp DNA fragment (123 bp including primers) of the mitochondrial cytochrome b gene [Unseld et al., \(1995\)](#). Nevertheless, they failed to discriminate bigeye tuna from yellowfin that differed by only one nucleotide in the gene fragment studied. Since sequencing was a relatively long and expensive technique, various methods including the use of PCR coupled to other identification tools have been also used to authenticate tuna and bonito species [Rasmussen et Morrissey, \(2009\)](#); [Pedrosa-Gerasmio et al., \(2012\)](#), [Viñas et Tudela, \(2009\)](#), [Botti et Giuffra, \(2010\)](#). These different PCR methods comprise of the PCR-RFLP [Quinteiro et al., \(1998\)](#); [Pardo et Pérez-Villareal, \(2004\)](#); [Ram et al., \(1996\)](#); [Lin et al., \(2005\)](#); [Lin et Hwang, \(2007\)](#), the PCR SSCP [Rehbein et al., \(1998\)](#), [Rehbein et al., \(1999\)](#), the PCR-ELISA [Santaclara et al., \(2015\)](#), or the RT-PCR [Dalmasso et al., \(2007\)](#); [Chuang et al., \(2012\)](#), [Terio et al., \(2010\)](#). However, all these described methods may be used to identify tuna species, but not to quantify their amount of DNA. A real-time PCR or qPCR methodology based on a fragment of about 100 bp of the 16S rRNA gene [Lopez et Pardo, \(2005\)](#) was first developed in 2005 on canned tuna to identify and quantify two mixed tuna species, albacore and yellowfin tuna.

Our two 'primers/probe systems' were first tested on DNA extracted from raw muscle tissues of the two-targeted species. Specific fluorescence emission was detected for each targeted species at the optimal conditions of qPCR used (T<sub>m</sub> primers, primers and probe concentrations, DNA concentration etc...). In a second step, the two 'primers/probe systems' were tested on DNA extracted from the reference tuna cans containing only one of the two tuna species. A delay of C<sub>q</sub> values for canned tissue DNA versus C<sub>q</sub> values for raw tissue DNA was noticed for the same quantity of DNA, probably due to the impact of sterilization on DNA. These results showed that yellowfin tuna species-specific TaqMan primers and probe could identify yellowfin tuna species in cans. The mean C<sub>q</sub> obtained from primers and probe designed for yellowfin tuna (Tal<sub>b</sub>\_COII) was 21.04 ± 1.38 (mean ± sd). No amplification

was detected with this yellowfin tuna probe tested on bigeye tuna cans. Primers and probe designed for bigeye tuna (Tobe\_ ND2) amplified ND2 sequences of DNA from cans containing bigeye tuna species with an averaged Cq value of  $22.10 \pm 1.18$ . Fluorescence emission for probe designed for bigeye tuna (Tobe\_ ND2) was also observed on DNA extracted from yellowfin tuna cans but with a mean Cq of  $34.36 \pm 1.05$ . These differences between Cq values tested with Chi-square test were statistically significant ( $p < 0.001$ ) and allowed the discrimination between bigeye tuna and yellowfin tuna.

### **Specificity of the two 'primers/probe systems'**

For canned products, standard curves were obtained with an efficiency of  $92.4 \% \pm 5.4$  for bigeye tuna and  $99.8 \% \pm 5.9$  for yellowfin tuna. The LOD and LOQ were evaluated to 0.01 ng/ $\mu$ L for bigeye tuna and yellowfin tuna.

The species-specificity of the two 'primers/probe systems' was also evaluated by testing DNA amplification from raw tissues of the ten following tuna and bonito species: albacore (*Thunnus alalunga*), Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*), longtail tuna (*Thunnus tonggol*), blackfin tuna (*Thunnus atlanticus*), Atlantic bonito (*Sarda sarda*), bullet tuna (*Auxis rochei*), kawakawa (*Euthynnus affinis*), frigate tuna (*Auxis thazard*), little tunny (*Euthynnus alletteratus*), and skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). No fluorescence signal was recorded with DNA templates from albacore, Atlantic bonito, blackfin tuna, bullet tuna, frigate tuna, kawakawa, or little tunny. For Atlantic bluefin tuna, a signal was recorded with the bigeye tuna primer-probe system, with a Cq averaging at  $20.22 \pm 0.49$ , near to that obtained for bigeye tuna (averaged at  $17.9 \pm 1.14$  for raw tissues). However, as Atlantic Bluefin tuna is not used for tuna cans but almost exclusively in sashimi and sushi dishes, this lack of specificity here is not considered to be an issue. For longtail tuna, only one reference sample was tested, and a Cq of  $24.79 \pm 0.15$  was obtained by amplification with the bigeye tuna primers/probe system'. This Cq value was close to the Cq obtained for bigeye tuna ( $17.9 \pm 1.14$  for raw tissues). Due to the lack of other reference samples, this result has not been confirmed yet.

### **Assessment of quantification on standardized mixtures**

A large number of identification techniques are based on mitochondrial genes as molecular markers because mtDNA allows greater sensitivity of the method. However, the problem caused by the use of mitochondrial DNA of one species lies in the fact that there is a variable number of copies of mtDNA according to individual, age, or nature of the extracted tissue (muscle, fin...) [Alonso et al., \(2004\)](#), [Bottero et Dalmasso, \(2011\)](#). Nowadays, two approaches of quantification with real time PCR methodology based on different calculation modes [Livak et](#)

[Schmittgen, \(2001\)](#), [Bustin, \(2000\)](#), [Lopez et Pardo, \(2005\)](#), [Iwobi et al., \(2015\)](#) exist: either relative quantification with an endogenous gene; or absolute quantification. To our knowledge, only one study has been published on the quantification of mixed tuna species in a can [Lopez et Pardo, \(2005\)](#) and, in the particular case of the two closely related species -bigeye and yellowfin tuna- no paper can be found in the literature. In addition to the distinction between these two species, it was necessary to develop qPCR methods for quantifying the presence of a species below a specified threshold. This limit has been set at one percent following the request of the tuna canning industry, which allows discrimination between voluntary substitutions from involuntary substitutions.

This study's methodology was tested on canned mixtures containing different percentages of bigeye tuna and yellowfin tuna species.

#### ***Method based on absolute quantification with standard curves***

The two targeted mitochondrial genes (COII for yellowfin tuna, and ND2 for bigeye tuna) were used for absolute quantification. Standard curves were established for the two tuna species, which allowed the calculating of the DNA quantity for each tuna species, following equations 1 and 2. This method postulated on the fact that amounts of mtDNA were equivalent in these two close species. The resulting percentages were statistically compared with the real values of the standardized mixtures based on the Chi-square test. No significant difference between the percentages experimentally calculated and those of the initial mixtures was shown, except for the results of cans containing 50% of each species (Figure 1).

The results of this study highlighted the efficiency of this approach towards quantifying the presence of bigeye tuna and yellowfin tuna in cans containing mixtures of these two species.

#### ***Method based on relative quantification with an endogenous gene***

Another strategy developed in this study for quantification of species in tuna cans is based on two targeted mitochondrial genes, namely, one species-specific gene for targeted species identification (COII for yellowfin tuna and ND2 for bigeye tuna), and in one endogenous gene - the 12S rRNA gene that can be amplified, irrespective of the tuna species, with the same universal 'primers/probe system'. The calculation of relative quantification based on Cq variation between target and endogenous amplifications could not be used with bigeye tuna and yellowfin tuna samples cooked in cans as previously described by Lopez and Pardo [Lopez et Pardo, \(2005\)](#) on binary mixtures of sterilized tissue of albacore and yellowfin tuna. Lopez and Pardo found error up to 50%, and they concluded [Lopez et Pardo, \(2005\)](#) Lopez et Pardo, (2005) Lopez et Pardo, (2005) Lopez et Pardo, (2005) Lopez et Pardo, (2005) Lopez et Pardo, (2005) Lopez et Pardo, (2005)





labeled as bigeye tuna or albacore tuna. Among the ten commercial cans labeled as yellowfin tuna, five cans were composed of a mixture of yellowfin tuna and skipjack tuna. These results suggest the presence of different species in yellowfin tuna cans, or mislabeling during the production, which the tuna canning industry will have to address.

To conclude, the two 'primers/probe systems' developed in this study have been used to: differentiate bigeye tuna from yellowfin tuna; and quantify them in canned products. Analysis of 29 commercial tuna cans permitted the detection of a labeling error between bigeye tuna and yellowfin tuna. The two quantification methods based on standard curves or endogenous gene allowed the estimating of the level of content of each of the two targeted species in mixtures. The authors consequently suggest the following protocols to discriminate these two very close species: i) identify the presence of one of, or both of the species in tuna cans with primers and the Taqman probe designed in this study, ii) (in the case of the presence of more than one species) quantify the amount of each species using the method based on absolute quantification of these two species with standard curves. The second method based on bigeye tuna relative quantification using 12S rRNA endogenous gene could be used as confirmation. This identification and quantification methodology should help laboratories to contribute to traceability concerning canned tuna in order to obtain responses about substitution or fraud.

## Acknowledgments

This study is a part of the IDThon project supported by the Nord Pas de Calais council and Bpi France. Daline BOJOLLY is grateful to the Nord Pas de Calais council and "Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues" for their financial support of her PhD. The authors acknowledge Stéphanie COPIN and Annick ROBERT-PILLOT for their technical advices in probe construction.

## References

- Abdullah, A. et Rehbein, H.** (2014) Authentication of raw and processed tuna from Indonesian markets using DNA barcoding, nuclear gene and character-based approach. *European Food Research and Technology* **239**, 4, pp 695-706.
- Abdullah, A. et Rehbein, H.** (2015a) Authentication of closely related scombrid, catfish and tilapia species by PCR-based analysis and isoelectric focusing of parvalbumin. *European Food Research and Technology* **241**, 4, pp 497-511.
- Abdullah, A. et Rehbein, H.** (2015b) The differentiation of tuna (family: Scombridae) products through the PCR-based analysis of the cytochrome b gene and parvalbumin introns. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp n/a-n/a.

- Aguilera-Muñoz, A. D. N.** (2008) Authentication of commercial chilean mollusks using ribosomal internal transcribed spacer (its) as specie-specific DNA marker. *Gayana* 72, 2, pp 178-187.
- Al Rawi, S., Louvet-Vallee, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R. et Galy, V.** (2011) Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* 334, 6059, pp 1144-7.
- Albaina, A., Iriondo, M., Velado, I., Laconcha, U., Zarraonaindia, I., Arrizabalaga, H., Pardo, M. A., Lutcavage, M., Grant, W. S. et Estonba, A.** (2013) Single nucleotide polymorphism discovery in albacore and Atlantic bluefin tuna provides insights into worldwide population structure. *Animal Genetics* 44, 6, pp 678-692.
- Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., García, O., Fernández De Simón, L., García-Hirschfeld, J., Sancho, M., De La Rúa, C. et Fernández-Piqueras, J.** (2004) Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci. Int.* 139, 2-3, pp 141-149.
- Alvarado Bremer, J. R., Naseri, I. et Ely, B.** (1997) Othodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Fish Biology* 50, 3, pp 540-554.
- Amandè, M. J., Ariz, J., Chassot, E., de Molina, A. D., Gaertner, D., Murua, H., Pianet, R., Ruiz, J. et Chavance, P.** (2010) Bycatch of the European purse seine tuna fishery in the Atlantic Ocean for the 2003–2007 period. *Aquatic Living Resources* 23, 4, pp 353-362.
- Armbruster, D. A. et Pry, T.** (2008) Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 29, Suppl 1, pp S49-52.
- Asensio, L.** (2007) PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 11, pp 558-566.
- Asensio, L., González, I., García, T. et Martín, R.** (2008) Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19, 1, pp 1-8.
- Barcode of Life: identifying Species with DNA Barcoding**, <http://www.barcodeoflife.org/>; consulté le 3 janvier 2016
- Bartlett, S. E. et Davidson, W. S.** (1991) Identification of *Thunnus* tuna species by the Polymerase Chain Reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 2, pp 309-317.
- Bartlett, S. E. et Davidson, W. S.** (1992) FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *BioTechniques* 12, 3, pp 408-11.
- Bauer, T., Weller, P., Hammes, W. P. et Hertel, C.** (2003) The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology* 217, 4, pp 338-343.
- Becker-Andre, M. et Hahlbrock, K.** (1989) Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic acids research* 17, 22, pp 9437-9446.

- Bénard-Capelle, J., Guillonneau, V., Nouvian, C., Fournier, N., Le Loët, K. et Dettai, A.** (2015) Fish mislabelling in France: substitution rates and retail types. *PeerJ* 2, p e714.
- Bogenhagen, D. et Clayton, D. A.** (1974) The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry* 249, 24, pp 7991-7995.
- Bojolly, D., Doyen, P., Le Fur, B., Christaki, U., Verrez-Bagnis, V. et Grard, T.** (2017) Development of a qPCR method for the identification and quantification of two closely related tuna species, bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), in canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, pp 913-920.
- Borgo, R., Souty-Grosset, C., Bouchon, D. et Gomot, L.** (1996) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *J. Food Sci.* 61, 1, pp 1-4.
- Bossier, P.** (1999) Authentication of seafood products by DNA patterns. *J. Food Sci.* 64, 2, pp 189-193.
- Bottero, M. T. et Dalmaso, A.** (2011) Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet. J.* 190, 1, pp 34-38.
- Bottero, M. T., Dalmaso, A., Cappelletti, M., Secchi, C. et Civera, T.** (2007) Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay. *J. Biotechnol.* 129, 3, pp 575-580.
- Botti, S. et Giuffra, E.** (2010) Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: Identification of tuna and other scombrid species in food products. *BMC Biotechnol.* 10, 1, p 1.
- Brock, T. D. et Freeze, H.** (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology* 98, 1, pp 289-297.
- Brown, W. M., George, M. et Wilson, A. C.** (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4, pp 1967-1971.
- Bustin, S. A.** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 2, pp 169-193.
- Bustin, S. A.** (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology* 29, 1, pp 23-39.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. et Wittwer, C. T.** (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 55, 4, pp 611-622.
- Catanese, G., Manchado, M., Fernández-Trujillo, A. et Infante, C.** (2010) A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products. *Food Chemistry* 122, 1, pp 319-326.
- Chabrol, R.** (2014) Le marché français du thon en conserve Accédé le 26/12/2016
- Chapela, M. J., Sotelo, C. G., Pérez-Martín, R. I., Pardo, M. Á., Pérez-Villareal, B., Gilardi, P. et Riese, J.** (2007) Comparison of DNA extraction

- methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control* **18**, 10, pp 1211-1215.
- Chen, Y.-T. et Hsieh, Y.-H. P.** (2014) A sandwich ELISA for the detection of fish and fish products. *Food Control* **40**, pp 265-273.
- Chow, S. et Inoue, S.** (1993) Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bull Natl Res Inst Far Seas Fish* **30**, pp 207-225.
- Chow, S. et Kishino, H.** (1995) Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* **41**, 6, pp 741-748.
- Chow, S., Nakagawa, T., Suzuki, N., Takeyama, H. et Matsunaga, T.** (2006) Phylogenetic relationships among *Thunnus* species inferred from rDNA ITS1 sequence. *Journal of Fish Biology* **68**, SUPPL. 1, pp 24-35.
- Chow, S., Okamoto, H., Miyabe, N., Hiramatsu, K. et Barut, N.** (2000) Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Molecular Ecology* **9**, 2, pp 221-227.
- Chuang, P.-S., Chen, M.-I. et Shiao, J.-C.** (2012) Identification of tuna species by a real-time polymerase chain reaction technique. *Food Chem.* **133**, 3, pp 1055-1061.
- Civera, T.** (2003) Species identification and safety of fish products. *Vet Res Commun* **27**, 1, pp 481-489.
- Collette, B. B. et Nauen, C. E.** (1983) dans *Scombrids of the world*, ed., FAO, Rome (Italy).
- Collette, B. B., Reeb, C. et Block, B. A.** (2001) Systematics of the tunas and mackerels (Scombridae). *Fish physiology* **19**, pp 1-33.
- Colombo, F., Mangiagalli, G. et Renon, P.** (2005) Identification of tuna species by computer-assisted and cluster analysis of PCR - SSCP electrophoretic patterns. *Food Control* **16**, 1, pp 51-53.
- Corpet, F.** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 22, pp 10881-10890.
- Coudray-Meunier, C., Fraise, A., Martin-Latit, S., Guillier, L., Delannoy, S., Fach, P. et Perelle, S.** (2015) A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *Int J Food Microbiol* **201**, pp 17-26.
- Council regulation 1536.** (1992) Council regulation (EEc) n°1536/92 of 9 june 1992 laying down common marketing standards for preserved tuna and bonito. *Council regulation (EEC)* **1536**, L 163/1.
- Dalmasso, A., Civera, T. et Bottero, M. T.** (2006) Biomolecular approaches for the identification of tuna species. *Veterinary Research Communications* **30**, S1, pp 179-181.
- Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Secchi, C. et Bottero, M. T.** (2007) Identification of four tuna species by means of Real-Time PCR and melting curve analysis. *Vet Res Commun* **31**, S1, pp 355-357.
- Dalvit, C., De Marchi, M. et Cassandro, M.** (2007) Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science* **77**, 4, pp 437-449.

- Druml, B., Mayer, W., Cichna-Markl, M. et Hochegger, R.** (2015) Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. *Food Chem* 178, pp 319-26.
- Ely, B., Stoner, D. S., Bremer, A. J. R., Dean, J. M., Addis, P., Cau, A., Thelen, E. J., Jones, W. J., Black, D. E., Smith, L., Scott, K., Naseri, I. et Quattro, J. M.** (2002) Analyses of nuclear ldhA gene and mtDNA control region sequences of Atlantic northern bluefin tuna populations. *Marine Biotechnology* 4, 6, pp 583-588.
- Espiñeira, M., Gonzalez-Lavín, N., Vieites, J. M. et Santaclara, F. J.** (2009a) Development of a method for the identification of scombroid and common substitute species in seafood products by FINS. *Food Chemistry* 117, 4, pp 698-704.
- Espiñeira, M., González-Lavín, N., Vieites, J. M. et Santaclara, F. J.** (2009b) Development of a Method for the Genetic Identification of Commercial Bivalve Species Based on Mitochondrial 18S rRNA Sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 2, pp 495-502.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Costa, H. et Martínez, I.** (2001) Species identification of formed fishery products and high pressure-treated fish by electrophoresis: a collaborative study. *Food Chemistry* 72, 1, pp 105-112.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Costa, H., Pérez-Martin, R., Piñeiro-González, C., Craig, A., Mackie, I., Malmheden Yman, I., Ferm, M., Martínez, I., Jessen, F., Smelt, A. et Lutén, J.** (2000) Identification of fish species after cooking by SDS-PAGE and urea IEF: a collaborative study. *J. Agric. Food Chem.* 48, 7, pp 2653-2658.
- Etienne, M., Jérôme, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kündiger, R., Yman, I. M., Ferm, M., Craig, A., Mackie, I., Jessen, F., Smelt, A. et Lutén, J.** (1999) A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focusing: a collaborative study. *Electrophoresis* 20, 10, pp 1923-1933.
- FAO** (2014) dans The state of world fisheries and aquaculture, ed.
- Fishbase**, <http://fishbase.mnhn.fr/search.php?lang=French>; consulté le 3 janvier 2016
- FranceAgrimer.** (2011) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- FranceAgrimer.** (2012) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- FranceAgrimer.** (2014) Les filières pêche et aquaculture en France édition avril 2014.
- FranceAgrimer.** (2015) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2014.
- FranceAgrimer.** (2016) Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2015.
- Froese, R. et Pauly, D.** (2000) dans FishBase 2000: Concepts Designs and Data Sources, Vol. 1594, ed., WorldFish.

- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. et Wallace, D. C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National academy of Sciences* 77, 11, pp 6715-6719.
- Gordoa, A., Carreras, G., Sanz, N. et Viñas, J. (2017) Tuna species substitution in the spanish commercial chain: a Knock-On effect. *PLOS ONE* 12, 1, p e0170809.
- Gray, M. W. (1999) Mitochondrial Evolution. *Science* 283, 5407, pp 1476-1481.
- Gribbestad, I. S., Aursand, M. et Martinez, I. (2005) High-resolution <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy of whole fish, fillets and extracts of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) for quality assessment and compositional analyses. *Aquaculture* 250, 1-2, pp 445-457.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D. et Wolff, A. (2007) Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic acids research* 35, 19, p e127.
- Guo, J., Yang, L., Liu, X., Zhang, H., Qian, B. et Zhang, D. (2009) Applicability of the *Chymopapain* gene used as endogenous reference gene for transgenic Huanong No. 1 papaya detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 15, pp 6502-6509.
- Guo, L., Li, M., Zhang, H., Yang, S., Chen, X., Meng, Z. et Lin, H. (2014) Next-generation sequencing of the yellowfin tuna mitochondrial genome reveals novel phylogenetic relationships within the genus *Thunnus*. *Mitochondrial DNA Part A* 27, 3, pp 2089-2090.
- Han, K. et Ely, B. (2002) Use of AFLP analyses to assess genetic variation in *Morone* and *Thunnus* species. *Marine Biotechnology* 4, 2, pp 141-145.
- Hebert, P. D., Cywinska, A. et Ball, S. L. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 270, 1512, pp 313-321.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. et Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 10, pp 986-994.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. et Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology* 10, 4, pp 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. et Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, pp 1026-1030.
- Hold, G. L., Russell, V. J., Pryde, S. E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Sotelo, C. G., Pérez-Martin, R. I., Santos, A. T. et Rosa, C. (2001a) Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. *European Food Research and Technology* 212, 3, pp 385-389.
- Hold, G. L., Russell, V. J., Pryde, S. E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Vidal, R., Rey-Mendez, M., Sotelo, C. G., Pérez-Martin, R. I., Santos, A. T. et Rosa, C. (2001b) Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3, pp 1175-1179.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. et Gelfand, D. H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'->3'

- exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 16, pp 7276-7280.
- Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., Hellemans, J., Kubista, M., Mueller, R. D. et Nolan, T.** (2013) The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clinical chemistry* **59**, 6, pp 892-902.
- Infante, C., Catanese, G., Ponce, M. et Manchado, M.** (2004) Novel method for the authentication of frigate tunas (*Auxis thazard* and *Auxis rochei*) in commercial canned products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 25, pp 7435-7443.
- Iwobi, A., Sebah, D., Kraemer, I., Losher, C., Fischer, G., Busch, U. et Huber, I.** (2015) A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food Chem.* **169**, pp 305-313.
- Jérôme, M., Lemaire, C., Bautista, J. M., Fleurence, J. et Etienne, M.** (2003a) Molecular phylogeny and species identification of sardines. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1, pp 43-50.
- Jérôme, M., Lemaire, C., Verrez-Bagnis, V. et Etienne, M.** (2003b) Direct sequencing method for species identification of canned sardine and sardine-type products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 25, pp 7326-7332.
- Kalinina, O., Lebedeva, I., Brown, J. et Silver, J.** (1997) Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucleic acids research* **25**, 10, pp 1999-2004.
- Kamau, E., Alemayehu, S., Feghali, K. C., Saunders, D. et Ockenhouse, C. F.** (2013) Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. *PloS one* **8**, 8, p e71539.
- Khaksar, R., Carlson, T., Schaffner, D. W., Ghorashi, M., Best, D., Jandhyala, S., Traverso, J. et Amini, S.** (2015) Unmasking seafood mislabeling in U.S. markets: DNA barcoding as a unique technology for food authentication and quality control. *Food Control* **56**, 0, pp 71-76.
- Kitaoka, M., Ichinose, H. et Goto, M.** (2009) Simultaneous visual detection of single-nucleotide variations in tuna DNA using DNA/RNA chimeric probes and ribonuclease A. *Analytical Biochemistry* **389**, 1, pp 6-11.
- Kitaoka, M., Okamura, N., Ichinose, H. et Goto, M.** (2008) Detection of SNPs in fish DNA: Application of the fluorogenic ribonuclease protection (FRIP) assay for the authentication of food contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 15, pp 6246-6251.
- Kumar, G., Kunal, S. P. et Menezes, M. R.** (2012) Genetic stock structure of frigate tuna (*Auxis thazard*) along Indian coast based on PCR-RFLP analyses of mtDNA D-loop region. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **12**, 4.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. et Tamura, K.** (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings Bioinf.* **9**, 4, pp 299-306.
- Kunal, S., Kumar, G., Menezes, M. et Meena, R.** (2013) Mitochondrial DNA analysis reveals three stocks of yellowfin tuna *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788) in Indian waters. *Conserv Genet* **14**, 1, pp 205-213.

- Li, W., Chen, X., Xu, Q., Zhu, J., Dai, X. et Xu, L.** (2015) Genetic Population Structure of *Thunnus albacares* in the Central Pacific Ocean Based on mtDNA COI Gene Sequences. *Biochemical Genetics*.
- Lin, W. F. et Hwang, D. F.** (2007) Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control* 18, 9, pp 1050-1057.
- Lin, W. F., Shiau, C. Y. et Hwang, D. F.** (2005) Identification of four *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochrome b gene sequence and PCR-RFLP analysis. *J. Food Drug Anal.* 13, 4, pp 382-387.
- Liu, W. et Saint, D. A.** (2002) A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical biochemistry* 302, 1, pp 52-59.
- Livak, K. J.** (1997) Relative quantitation of gene expression. *ABI Prism 7700 sequence detection system* 2, pp 1-36.
- Livak, K. J. et Schmittgen, T. D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25.
- Lockley, A. K. et Bardsley, R. G.** (2000a) DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11, 2, pp 67-77.
- Lockley, A. K. et Bardsley, R. G.** (2000b) Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 10, pp 4463-4468.
- López-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I. et Puyet, A.** (2005) Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 339, 1, pp 73-82.
- López-Piñón, M. J., Insua, A. et Méndez, J.** (2002) Identification of four scallop species using PCP and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. *Marine Biotechnology* 4, 5, pp 495-502.
- Lopez, I. et Pardo, M. A.** (2005) Application of relative quantification TaqMan real-time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 11, pp 4554-4560.
- Lowenstein, J. H., Amato, G. et Kolokotronis, S.-O.** (2009) The real *maccoyii*: identifying tuna sushi with DNA barcodes – contrasting characteristic attributes and genetic distances. *PLoS ONE* 4, 11, p e7866.
- Mackie, I.** (1996) dans Food authentication Ashurt, P. R., & Dennis, M. J., Ed. pp 140-170, Blackie Academic and Professional, London.
- Mackie, I. M., Pryde, S. E., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Pérez-Martín, R., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M. et Rehbein, H.** (1999) Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 1, pp 9-14.
- Maldini, M., Nonnis Marzano, F., Fortes, G. G., Papa, R. et Gandolfi, G.** (2006) Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture* 261, 2, pp 487-494.
- Margulis, L.** (1970) dans Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth, ed.



- Medina, I., Aubourg, S. P. et Pérez Martín, R.** (1997) Species differentiation by multivariate analysis of phospholipids from canned atlantic tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 7, pp 2495-2499.
- Meijerink, J., Mandigers, C., Van de Locht, L., Tönnissen, E., Goodsaid, F. et Raemaekers, J.** (2001) A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics* 3, 2, pp 55-61.
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F. et Vandesompele, J.** (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology* 10, 6, p R64.
- Meyer, A.** (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes* 2, pp 1-38.
- Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Simoni, P., Baraldini, M., De Laude, L. et Roda, A.** (2007) One-step triplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of yellowfin (*Thunnus albacares*), bigeye (*Thunnus obesus*), and skipjack (*Katsuwonus pelamis*) tuna DNA from fresh, frozen, and canned tuna samples. *J. Agric. Food Chem.* 55, 19, pp 7638-7647.
- Miyake, M. P.** (2010) dans Recent developments in the tuna industry: stocks, fisheries, management, processing, trade and markets, ed., Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Molkentin, J., Lehmann, I., Ostermeyer, U. et Rehbein, H.** (2015) Traceability of organic fish – authenticating the production origin of salmonids by chemical and isotopic analyses. *Food Control* 53, pp 55-66.
- Moore, J. C., Spink, J. et Lipp, M.** (2012) Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* 77, 4, pp R118-R126.
- Mueller, S., Handy, S. M., Deeds, J. R., George, G. O., Broadhead, W. J., Pugh, S. E. et Garrett, S. D.** (2015) Development of a COX1 based PCR-RFLP method for fish species identification. *Food Control* 55, 0, pp 39-42.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. et Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 263-273.
- Naaum, A. et Hanner, R.** (2016) dans Seafood authenticity and traceability: A DNA-based perspective, ed., Academic Press.
- Nakamura, I. et Séret, B.** (2002) Field identification key of tunas of the genus *Thunnus*. *Cybium* 26, 2, pp 141-145.
- Nass, S. et Nass, M. M. K.** (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *The Journal of cell biology* 19, 3, pp 613-629.
- Nollet, L. M. et Toldrá, F.** (2009) dans Handbook of seafood and seafood products analysis, ed., CRC Press.
- Pääbo, S.** (1989) Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 6, pp 1939-1943.
- Paine, M. A., McDowell, J. R. et Graves, J. E.** (2007) Specific identification of western Atlantic Ocean scombrids using mitochondrial DNA cytochrome C

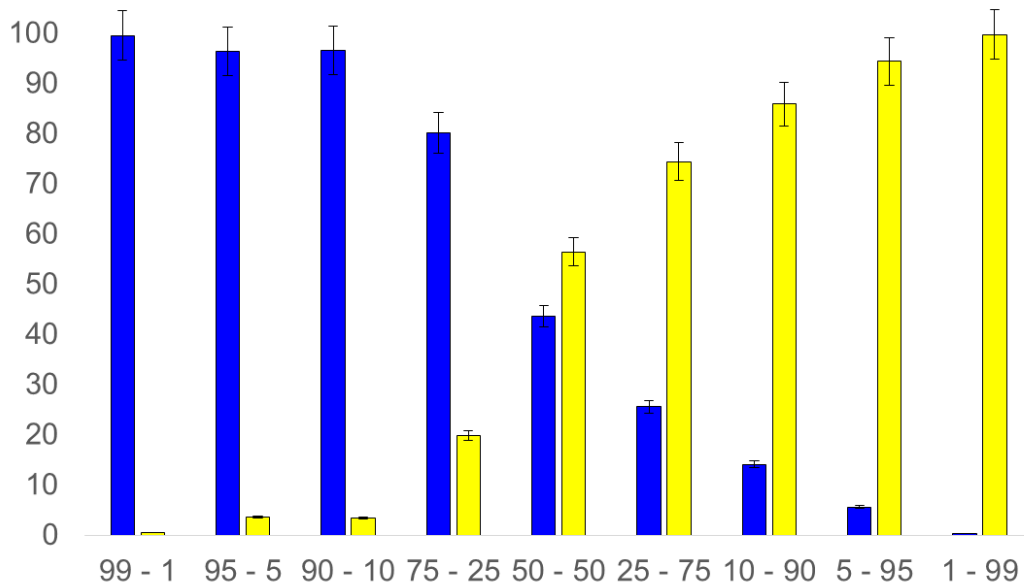
- oxidase subunit I (COI) gene region sequences. *Bulletin of Marine Science* **80**, 2, pp 353-367.
- Paine, M. A., McDowell, J. R. et Graves, J. E.** (2008) Specific identification using COI sequence analysis of scombrid larvae collected off the Kona coast of Hawaii Island. *Ichthyological Research* **55**, 1, pp 7-16.
- Pardo, M. A. et Pérez-Villareal, B.** (2004) Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. *Food Chem.* **86**, 1, pp 143-150.
- Partis, L. et Wells, R. J.** (1996) Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes* **10**, 6, pp 435-441.
- Pedrosa-Gerasmio, I. R., Babaran, R. P. et Santos, M. D.** (2012) Discrimination of juvenile yellowfin (*Thunnus albacares*) and bigeye (*T. obesus*) tunas using mitochondrial DNA control region and liver morphology. *PLoS One* **7**, 4, p e35604.
- Pepe, T., Carpentieri, A., Amoresano, A., Anastasio, A., Ventrone, I., Cortesi, M. L. et Ceruso, M.** (2012) dans Differentiation of four tuna species by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometric analysis, ed., INTECH Open Access Publisher.
- Pepe, T., Ceruso, M., Carpentieri, A., Ventrone, I., Amoresano, A. et Anastasio, A.** (2010) Proteomics analysis for the identification of three species of *Thunnus*. *Veterinary research communications* **34**, 1, pp 153-155.
- Portetelle, D., Haezebroeck, V., Mortiaux, F. et Renaville, R.** (2000) Traçabilité dans la filière animale. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **4**, 4, pp 233-240.
- Quinteiro, J., Santaclara, F. J. et Rehbein, H.** (2008) dans Quality parameters in canned seafood A.G. Cabado, J. M. V., Ed. pp 135-158, Nova Science Publishers, Inc.
- Quinteiro, J., Sotelo, C. G., Rehbein, H., Pryde, S. E., Medina, I., Perez-Martin, R. I., Rey-Mendez, M. et Mackie, I. M.** (1998) Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4, pp 1662-1669.
- Ram, J. L., Ram, M. L. et Baidoun, F. F.** (1996) Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 8, pp 2460-2467.
- Rasmussen, R.** (2001) dans Rapid cycle real-time PCR Ed. pp 21-34, Springer.
- Rasmussen, R. S. et Morrissey, M. T.** (2008) DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **7**, 3, pp 280-295.
- Rasmussen, R. S. et Morrissey, M. T.** (2009) Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **8**, 2, pp 118-154.
- Rastogi, G., Dharne, M. S., Walujkar, S., Kumar, A., Patole, M. S. et Shouche, Y. S.** (2007) Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science* **76**, 4, pp 666-674.

- Ratnasingham, S. H., P.** (2007) BOLD : The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* (2007).
- Règlement CE 104.** (2000) Règlement (CE) n°104/2000 du 17 décembre 1999 portant organisation commune des marchés dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- Règlement CE 1536.** (1992) Règlement (CEE) n°1536/92 du Conseil du 9 juin 1992 fixant les normes communes de commercialisation pour les conserves de thon et de bonite. *Règlement (CE) 1536*, L 163/1.
- Règlement CE 2065.** (2001) Règlement (CE) n°2065/2001 de la commission du 22 octobre 2001 établissant les modalités d'application du règlement (CE) n°104/2000 du conseil en ce qui concerne l'information du consommateur dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture.
- Rehbein, H.** (1990) Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 191, 1, pp 1-10.
- Rehbein, H., Kündiger, R., Pineiro, C. et Perez-Martin, R. I.** (2000) Fish muscle parvalbumins as marker proteins for native and urea isoelectric focusing. *Electrophoresis* 21, 8, pp 1458-1463.
- Rehbein, H., Mackie, I. M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Perez-Martin, R., Quinteiro, J. et Rey-Mendez, M.** (1998) Comparison of different methods to produce single-strand DNA for identification of canned tuna by single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis* 19, 8-9, pp 1381-1384.
- Rehbein, H., Mackie, I. M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martin, R., Quinteiro, J. et Rey-Mendez, M.** (1999) Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chem.* 64, 2, pp 263-268.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P. et Quilici, M. L.** (2010) Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 143, 3, pp 190-197.
- Rodriguez-lazaro, D.** (2003) A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *Journal of Microbiological Methods* 54, 3, pp 381-390.
- Ruijter, J. M., Lorenz, P., Tuomi, J. M., Hecker, M. et Van den Hoff, M. J.** (2014) Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. *Microchimica Acta* 181, 13-14, pp 1689-1696.
- Russell, V. J., Hold, G. L., Pryde, S. E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Sotelo, C. G., Pérez-Martin, R. I., Santos, A. T. et Rosa, C.** (2000) Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 6, pp 2184-2188.
- Rutledge, R. G.** (2004) Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications. *Nucleic Acids Research* 32, 22, pp e178-e178.

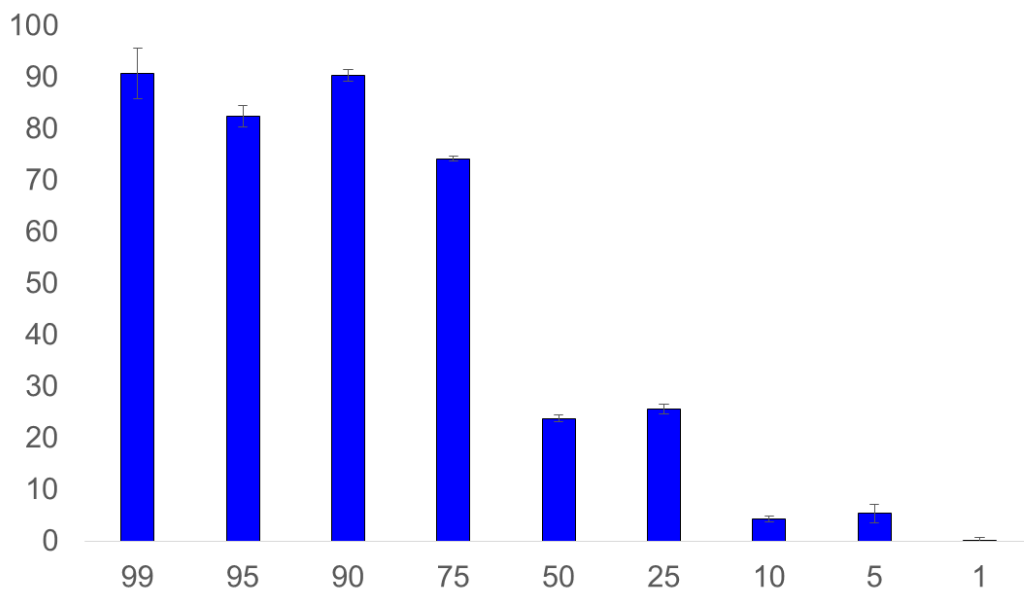
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. et Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 4839, pp 487-91.
- Sánchez, A., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Perez-Martín, R. I. et Sotelo, C. G. (2009) Identification of european hake species (*Merluccius merluccius*) using real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 9, pp 3397-3403.
- Santaclara, F. J., Espiñeira, M., Cabado, A. G., Aldasoro, A., Gonzalez-Lavín, N. et Vieites, J. M. (2006) Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 22, pp 8461-8470.
- Santaclara, F. J., Velasco, A., Pérez-Martín, R. I., Quinteiro, J., Rey-Méndez, M., Pardo, M. A., Jimenez, E. et Sotelo, C. G. (2015) Development of a multiplex PCR-ELISA method for the genetic authentication of *Thunnus* species and *Katsuwonus pelamis* in food products. *Food Chem.* 180, pp 9-16.
- Satoh, K., Okamoto, H., Fukuda, T., Kenji, N., Sasaki, Y. et Oshima, T. (2010) Accuracy of species identification of yellowfin and bigeye in three canneries of Kingdom of Thailand. *Western and central Pacific fisheries commission Scientific committee sith regular session Nuku'alofa, Tonga*.
- Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H., Aubrey, A. D., Bada, J. et Poinar, H. (2009) New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Res* 37, 10, pp 3215-29.
- Seyhan, D. et Turan, C. (2016) DNA barcoding of Scombrid species in the Turkish marine waters. *DNA* 22, 1.
- Shendure, J. et Ji, H. (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 10, pp 1135-45.
- Smith, P., Conroy, A. et Taylor, P. (1994) Biochemical-genetic identification of northern bluefin tuna *Thunnus thynnus* in the New Zealand fishery. *New Zealand journal of marine and freshwater research* 28, 1, pp 113-117.
- Taanman, J.-W. (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1410, 2, pp 103-123.
- Tanaka, T., Sasaki, T., Amemiya, Y., Takeyama, H., Chow, S. et Matsunaga, T. (2006) Discrimination of DNA mismatches by direct force measurement for identification of tuna species. *Analytica Chimica Acta* 561, 1-2, pp 150-155.
- Taquet, M., Blanc, M., Dagorn, L., Filmalter, J. D., Fonteneau, A., Forget, F., Gaertner, J.-C., Galzin, R., Gervain, P., Goujon, M., Guillotreau, P., Guyader, O., Hall, M., Holland, K., Itano, D., Monteagudo, J.-P., Morales-Nin, B., Reynal, L., Sharp, M., Sokimi, W., Tanetoa, M. et Yen Kai Sun, S. (2011) Artisanal and industrial FADs: a question of scale. Tahiti conference reviews current FAD use and technology. *Fisheries Newsletter* 136, pp 35-45.

- Teletchea, F.** (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19, 3, pp 265-293.
- Terio, V., Di Pinto, P., Decaro, N., Parisi, A., Desario, C., Martella, V., Buonavoglia, C. et Tantillo, M. G.** (2010) Identification of tuna species in commercial cans by minor groove binder probe real-time polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Cell. Probes* 24, 6, pp 352-356.
- Terol, J., Mascarell, R., Fernandez-Pedrosa, V. et Pérez-Alonso, M.** (2002) Statistical validation of the identification of tuna species: Bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5, pp 963-969.
- Than, L. T. L., Chong, P. P., Ng, K. P. et Seow, H. F.** (2015) Detection of medically important *Candida* species by absolute quantitation real-time polymerase chain reaction. *Jundishapur journal of microbiology* 8, 1.
- Tseng, M. C., Shiao, J. C. et Hung, Y. H.** (2011) Genetic identification of *Thunnus orientalis*, *T. thynnus*, and *T. maccoyii* by a cytochrome b gene analysis. *Environmental Biology of Fishes* 91, 1, pp 103-115.
- Unseld, M., Beyermann, B., Brandt, P. et Hiesel, R.** (1995) Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods Appl.* 4, 4, pp 241-243.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. et Rozen, S. G.** (2012) Primer3 new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* 40, 15, pp e115-e115.
- Velasco, A., Sánchez, A., Martínez, I., Santaclara, F. J., Pérez-Martín, R. I. et Sotelo, C. G.** (2013) Development of a Real-Time PCR method for the identification of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Chemistry* 141, 3, pp 2006-2010.
- Verrez-Bagnis, V., Bojolly, D., Cardineau, L., Le Fur, B., Grard, T. et Doyen, P.** (2016) Preliminary development of a probe-based fluorescence melting analysis for quick testing of the presence of more than one scombridae fish species in canned tuna, *46th WEFTA*.
- Viñas, J. et Tudela, S.** (2009) A validated methodology for genetic identification of tuna species (genus *Thunnus*). *PLoS One* 4, 10, p e7606.
- Vogelstein, B. et Kinzler, K. W.** (1999) Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 16, pp 9236-9241.
- Ward, R. D., Elliott, N. G. et Grewe, P. M.** (1995) Allozyme and mitochondrial DNA separation of pacific northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus orientalis* (Temminck and Schlegel), from southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau). *Mar. Freshwater Res.* 46, pp 921-30.
- Ward, R. D., Hanner, R. et Hebert, P. D. N.** (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J. Fish Biol.* 74, 2, pp 329-356.
- Warner, K., Timme, W., Lowell, B. et Hirschfield, M.** (2013) Oceana study reveals seafood fraud nationwide, pp 1-69.
- White, R. A., Blainey, P. C., Fan, H. C. et Quake, S. R.** (2009) Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC genomics* 10, 1, p 116.

- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. et Rasmussen, R. P.** (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 1, pp 130-139.
- Wong, M. L. et Medrano, J. F.** (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 1, p 75.



**Figure 1:** Quantification (in percentage) of binary mixtures of bigeye tuna and yellowfin tuna canned samples calculated with the method based on absolute quantification with standard curves. Blue histogram: average values of percentages of bigeye tuna; yellow histogram: average values of percentages of yellowfin tuna. Values on abscissa axis indicate expected theoretical percentages. Error bars indicate standard deviation in quadruplicates.



**Figure 2:** Average values of percentages of bigeye tuna species content processed with different quantities of bigeye tuna and yellowfin tuna calculated with the method based on relative quantification with the 12S rRNA endogenous gene. Values on abscissa axis indicate expected theoretical percentages. Error bars indicate standard deviation in quadruplicates.

**Table 1:** Genbank accession numbers of mitochondrial DNA sequences of cytochrome c oxidase subunit 2 (COII) gene, NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene, and 12S rRNA gene, for 15 scombridae species.

Scombridae species	GenBank accession n°		
	cytochrome c oxidase subunit 2 (COII) gene	NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene	12S rRNA gene
Yellowfin tuna / <i>Thunnus albacares</i>	AY971768 GU256528.1 JN086153.1 NC_014061.1	GU256528.1 JN086153.1 NC_014061.1	DQ874694.1 GU256528.1 HM003553.1 to HM003555.1 HQ641701.1 JN086153.1 NC_014061.1
Bigeye tuna / <i>Thunnus obesus</i>	GU256525.1 AY971769 JN086152.1 NC_014059.1	GU256525.1 JN086152.1 NC_014059.1	GU256525.1 HQ592316.1 to HQ592318.1 JN086152.1 NC_014059.1
Albacore / <i>Thunnus alalunga</i>	AB101291.1 GU256526.1 JN086151.1 NC_005317.1	AB101291.1 GU256526.1 JN086151.1 NC_005317.1	AB101291.1 AB176804.1 GU946542.1 GU946543.1 GU946544.1 JN007517.1 to JN007526.1 JN086151.1 NC_005317.1
Southern bluefin tuna / <i>Thunnus maccoyii</i>	GU256523.1 JN086150.1 NC_014101.1	GU256523.1 JN086150.1 NC_014101.1	GU256523.1 JN086150.1 NC_014101.1
Pacific bluefin tuna / <i>Thunnus orientalis</i>	AB185022.1 GU256524.1 NC_008455.1	AB185022.1 GU256524.1 NC_008455.1	AB185022.1 GU256524.1 KF906721.1 NC_008455.1 NC_008455.1
Northern bluefin tuna / <i>Thunnus thynnus</i>	AB097669.1 AY302574.2 AY971770 GU256522.1 JN086149.1 NC_004901.2 NC_014052.1	AB097669.1 AY302574.2 DQ854690.1 GU256522.1 JN086149.1 NC_004901.2 NC_014052.1	AB097669.1 AB176805.1 AY302574.2 DQ854647.1 GU256522.1 JN086149.1 KF906720.1 NC_004901.2 NC_014052.1
Longtail tuna / <i>Thunnus tonggol</i>	HQ425780.1 JN086154.1 NC_020673.1	HQ425780.1 JN086154.1 NC_020673.1	HQ425780.1 JN086154.1 NC_020673.1
Blackfin tuna / <i>Thunnus atlanticus</i>	KM405517.1	KM405517.1	DQ874693.1
Skipjack tuna / <i>Katsuwonus pelamis</i>	AB101290.1 AY971773 GU256527.1 JN086155.1 NC_005316.1	AB101290.1 JN086155.1 GU256527.1	AB101290.1 AB176808.1 DQ874697.1 GU256527.1 HQ592295.1 to HQ592297.1 JN086155.1
Atlantic bonito / <i>Sarda sarda</i>	AY971771.1	EU263832.1 EU263833.1	DQ874691.1
Orientalis bonito / <i>Sarda orientalis</i>	AY971772	ns	ns
Bullet tuna / <i>Auxis rochei</i>	AB103467.1 AB103468.1 AB105165.1 AY971774.1 NC_005313.1	AB103467.1 AB103468.1 AB105165.1 EU263836.1 NC_005313.1	AB103467.1 AB103468.1 AB176811.1 AB176810.1 AB105165.1 NC_005313.1
Frigate tuna / <i>Auxis thazard</i>	AB105447.1 NC_005318.1	AB105447.1 EU263837.1 NC_005318.1	AB105447.1 AB176809.1 DQ874692.1 NC_005318.1
Kawakawa / <i>Euthynnus affinis</i>	AY971776.1	ns	ns
Little tunny / <i>Euthynnus alletteratus</i>	AB099716.1 AY971775.1 NC_004530.1	AB099716.1 NC_004530.1	DQ874698.1 AB176806.1 AB176807.1 NC_004530.1 AB099716.1

ns : no sequences



**Table 2:** Primer and probe sequences developed in this study for quantitative real-time PCR assays

Target gene	Primer (F or R) and TaqMan probe (P) names	Sequence (5'-3')	Size of fragments (pb)
Cytochrome c oxidase subunit II (COII)	F_Talb_COII R_Talb_COII P_Talb_COII (6-FAM)	5'-CTTCCCTCCCTACGCATTCT-3' 5'-CACTATTCGGTGGTCTGCTTC-3' 5'-(FAM)-ACGAAATCAACGACCCCATCTAA-(BHQ1)-3'	198
NADH dehydrogenase subunit 2	F_Tobe_ND2 R_Tobe_ND2 P_Tobe_ND2 (6-FAM)	5'-CTAGCCACCTCTGAGCAAA-3' 5'-GCCAGGTCTTGTTTGACAGT-3' 5'-(FAM)-TTCTTCTGTCCTAGGCGGTCTTCCA-(BHQ1)-3'	99
12S ribosomal RNA (12S rRNA)	F_Univ_12S R_Univ_12S P_Univ_12S (6-FAM)	5'-GACTTGGCGGTACTTTAGATCC-3' 5'-TGACGACGGCGGTATATAGG-3' 5'-(FAM)-AACCGATGACCCCGTTCAA-(BHQ1)-3'	107

**Annexe 4: Preliminary development of a probe-based fluorescence melting analysis for quick testing of the presence of more than one scombridae fish species in canned tuna**



# Preliminary Development of a Probe-Based Fluorescence Melting Analysis for Quick Testing of the Presence of More Than One Scombridae Fish Species in Canned Tuna

V.Verrez-Bagnis<sup>1\*</sup>, D. Bojolly<sup>2,3</sup>, L. Cardineau<sup>1</sup>, B. Le Fur<sup>3</sup>, T. Grard<sup>2</sup>, and P. Doyen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ifremer, Nantes, France

<sup>2</sup>Institut Charles Viollette, USC Anses – Univ. Littoral Côte d'Opale, Boulogne-sur-Mer, France

<sup>3</sup>Pfi Nouvelles Vagues, Boulogne sur Mer, France

\*Corresponding author: [Veronique.Verrez@ifremer.fr](mailto:Veronique.Verrez@ifremer.fr)

**Abstract-** Scombridae fish are some of the species most consumed worldwide, mainly as tuna and bonito canned products. In Europe, the legislation required that tuna can must contain only one fish species that could be either *Thunnus* genus fish or skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*).

In the aim to quickly distinguish the presence of two or more tuna species in tuna cans, we explored an assay using fluorescence melting curve analysis (FMCA) with a single locked nucleic acid (LNA)-TaqMan probe in its ability to simultaneously detect multiple species. Probe-based FMCA can detect DNA differences based on melting temperature (T<sub>m</sub>). The use of LNA (modified RNA nucleotides with high specificity against native DNA targets) probes improves hybridization specificity between probe and template DNA, and increases T<sub>m</sub> significantly.

Two small regions of the mitochondrial cytochrome b (cytb) (112 bp) and cytochrome oxidase subunit 1 (COI) (82 bp) DNA were selected, and two LNA-TaqMan probes (corresponding to each gene fragment) were designed. The amplification of template DNA by PCR before FMCA is necessary to acquire sufficient signal. Asymmetric PCR was performed to improve the hybridization of the probe on the 3' 5' fragments. Asymmetric PCR followed by FMCA analysis were done directly in a real-time PCR thermocycler.

The two LNA probes were 100% complementary to the target sequence of *Thunnus albacares* giving significantly higher T<sub>m</sub> value (respectively 79°C for cytb and 71°C for COI assays) than for other scombridae species tested (e.g. for skipjack tuna, T<sub>m</sub> value are 71°C for cytb and 46°C for COI). To differentiate *Thunnus* species, skipjack tuna and the other scombrids, the two cytb- and COI-based assays were to be performed.

The results presented here are the first one acquired on DNA template of reference scombridae species and they have to be validated on mixed reference tuna cans, and commercial cans.

**Keywords-** *Thunnus* species, FMCA, adulteration, DNA-based analysis, cytochrome b gene, cytochrome oxidase subunit 1 gene.

## I. INTRODUCTION

Scombridae fish species are among fish species most consumed worldwide and represent high economic value for canning industry. In Europe, the legislation requires that tuna can must contain only one fish species that could be either one of the eight *Thunnus* genus species or skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). The correct identification of these species is important since their economic value is different. In general, fish are filleted and stored frozen before to be delivered to the canning industries, and a morphological identification is then impossible. Therefore, molecular assay based on DNA would be powerful tool for the differentiation of these species. However, the choice of suitable assays is conditioned by the close relationship existing between the tuna species and by the degrading heat temperature during the canning processing.

Probe-based real-time PCR assays have already shown their potential to provide results in identification of tunas in canned products (Lopez and Pardo, 2005; Dalmasso et al. 2007). However, probe-based qPCR has some limitations as a single probe can reveal only one DNA sequence, and a 1 to 2 base pairs probe mismatch can lead to false results. In the case of tuna species mixture in a can, one qPCR assay is unable to reveal the presence of 2 or more tuna species. In 2007, Dalmasso et al. have developed an analysis based melting curve analysis by means of two FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) probes to discriminate *T. thynnus*, *T. albacares*, *T. alalunga* and *T. obesus*. In the same idea, High Resolution Melting Analysis (HRMA) has been developed by Tomás et al. (2016) for the identification of *Gadus morhua* adulteration with *G. macrocephalus* and *G. chalcogrammus* using a short polymorphic region (121 bp). Fluorescence melting curve analysis (FMCA) with a dual labeled locked nucleic acid (LNA) probe has also been proposed as an alternative method to multiplex PCR or sequencing by Ahn et al. (2015) to differentiate two fish species, *Larimichthys crocea* and *L. polyactis*. Indeed, probe-based FMCA can detect DNA differences based on melting temperature (T<sub>m</sub>), which is generated by the thermal denaturation of the probe-target hybrid. Mismatch hybridization(s) between probe and DNA target decreases the T<sub>m</sub>, depending on the number, type and position of mismatch base pair(s). In their study, Ahn et al. (2016) used LNA-modified probes. LNAs are modified RNA nucleotides which give higher hybridization specificity between the probe and template DNA.

In this study, we have tried to develop LNA-based FMCA systems(s) in the final aim to detect with a single assay the presence of different scombridae species in tuna cans.

## II. MATERIEL AND METHODS

### A. Sampling

Reference materials of scombridae specimens were provided by the tissue collection of the French Institute for Sea Exploitation (Ifremer) built in frame of FishTrace (<https://fishtrace.jrc.ec.europa.eu/index.html>) and Labelfish (<http://labelfish.eu/>) European projects. All reference fish were identified by taxonomists.

### B. DNA extraction

Total DNA was extracted from a small piece of tissue (approximately 100 mg) using ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

### C. Short-amplicon primer and probe design

Two small regions of the mitochondrial cytochrome b (cytb) (112 bp) and cytochrome oxidase subunit 1 (COI) (82 bp) DNA were selected, and two LNA-TaqMan probes (corresponding to each gene fragment) were designed.

DNA sequence information on the eight *Thunnus* species and *Katsuwonus pelamis* cytochrome b and cytochrome oxidase subunit 1 were obtained from the National center of Biotechnology Information (NCBI), as well as other scombrid species and aligned using Clustal W multiple alignment using BioEdit software (Hall, 1999).

The primer pairs and LNA-TaqMan probes were designed with Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) using *Thunnus albacares* complete mitochondrion genome sequence (JN086153.1).

Locked Nucleic Acid (LNA™)-TaqMan probes included 33% and 24% LNA nucleotides for respectively, cytb and COI fragments, and were 5'-end labelled with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and 3'-end labelled with Black Hole Quencher® (BHQ1). Primer and probe sequences were detailed in the Table 1.

Table 1. Forward (F) and reverse (R) primers and LNA [+] TaqMan probes (P) sequences

Primers (F and R) and LNA-TaqMan probe (P) names	Sequence (5'-3')
<b>Primers</b>	
FMCA_COI_F	CCCACGAATGAACAACATGA
FMCA_COI_R	CTCCAGCCTCAACTCCTGAA
FMCA_cytb_F	CAAGCCTCCGAAAAACTCAC

FMCA_cytb_R	AGGCCAAGTAGTGAGCCAAA
<b>LNA-TaqMan probes</b>	
FMCA_COI_P	[6FAM]CC[+C][+C][+C]TCTTTCCTTC T[+G]CT[+C][BHQ1]
FMCA_cytb_P	[6FAM]T[+T]GA[+C]CT[+T]CC[+T]A[+ C]CCC[+C][+T]CT[BHQ1]

### D. Fluorescence melting curve analysis

Asymmetric PCR was performed using CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio Rad, France) in a final volume of 20 µL containing 4 µL 5X colorless GoTaq® reaction buffer (Promega), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.05 µM forward primer, 2.5 µM reverse primer, 0.25 µM probe, 1.25 GoTaq® DNA polymerase and 10 ng DNA. Asymmetric PCR was performed for generating single stranded PCR products and improving probe hybridization (Fig 1).

The PCR amplification began with 5 min at 95°C, followed by 50 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 40 sec. In the final cycle the melting curve was obtained by cooling to 25°C and slow heating to 95°C with a controlled temperature transition rate of 0.5°C/5sec. Fluorescence was read every 5 sec. Fluorescence melting peaks were derived from the initial fluorescence (F) versus temperature (T) curves by plotting the negative derivative of fluorescence over temperature versus temperature (-dF/dT versus T plots). Prior FMCA experiments, the amplification ability of the primer sets was confirmed separating PCR products by 3% gel agarose electrophoresis and visualized with GelRed™ (Biotium, USA).

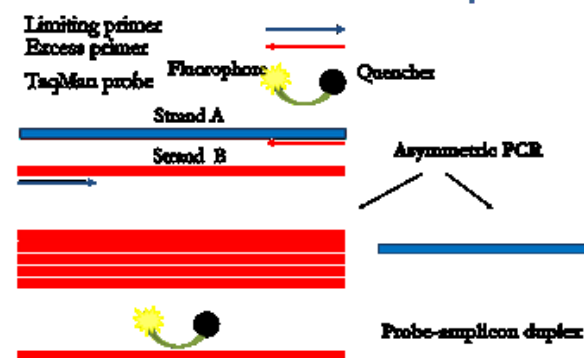


Fig. 1 Schematic representation of asymmetric PCR in the presence of a TaqMan probe

## III. RESULTS AND DISCUSSION

Using the information obtained from NCBI, the designed primer pairs successfully amplified two regions of mitochondrial DNA, cyt b (112 bp) and COI (82 bp).

TaqMan probe is an oligonucleotide consisted in a fluorophore covalently attached to the 5'-end and a quencher at the 3'-end. The randomly coiled

conformation of the TaqMan probe enables fluorescence quenching with a probe already hybridized or digested. As FMCA required excess single-stranded amplification for probe hybridization to generate sufficient FMCA signal, we used asymmetric PCR amplification as recommended by Huang et al. (2011) and Ahn et al. (2016). TaqMan probes were here modified for mismatched base pairs (corresponding to inter-species polymorphism) using locked nucleic acids (LNAs). In the selected regions for LNA-TaqMan probes (20 bp each), respectively 7 and 5 different base pairs were found comparing the different scombrid species sequences for cyt b and COI regions. Due to the genetically closed *Thunnus* species, the choice of DNA markers and probe regions is conditioned. In our two developed systems, some of the tuna species showed similar sequences in the cyt b probe region, and only 1-mismatch in the COI probe region. Consequently, we have chosen to base our methodology on two primer-probe systems. The designed LNA-modified probes were 100% complementary to *T. albacares*. The incompletely match of LNA probes with other species led to a  $T_m$  shift and making FMCA possible as shown on Fig. 2.

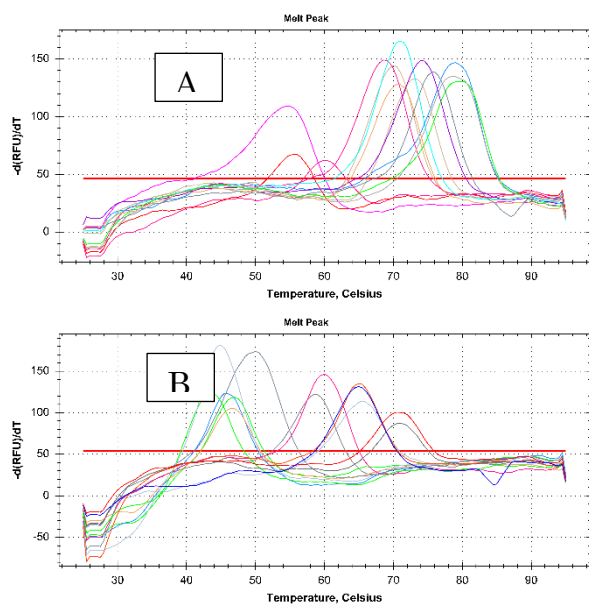


Fig. 2 Fluorescence melting peaks ( $-dF/dT$  versus  $T$  plots) for different reference scombrid species (listed in the Table 2): A corresponds to cyt b LNA-TaqMan probe and B to COI LNA-TaqMan probe

The  $T_m$  of each system (cytb and COI) for the different scombrid species tested are reported in the Table 2. The two LNA-TaqMan probes were totally homologous to *T. albacares* leading to higher melting temperatures ( $79^\circ\text{C}$  for cyt b system and  $71^\circ\text{C}$  for COI assay) than for the other scombrid species (e.g. for skipjack tuna, which is also a fish species that could be labelled as tuna

species in canned products,  $T_m$  values are  $71^\circ\text{C}$  for cyt b assay and  $46^\circ\text{C}$  for COI assay).

As shown on the Table 2, and as predicted by the analysis of the nucleotide sequences, the two systems (cytb and COI) are necessary to further distinguish all the scombrid species tested.

Table 2.  $T_m$  resulting from the calculation of fluorescence melting peaks corresponding to the studied reference scombrid species for cyt b and COI systems

Scientific name	Common name	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ ) Cyt b system	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ ) COI system
<i>Thunnus alalunga</i>	Albacore	76	65
<i>Thunnus albacares</i>	Yellowfin tuna	79	71
<i>Thunnus atlanticus</i>	Blackfin tuna	79	65
<i>Thunnus obesus</i>	Bigeye tuna	71	71
<i>Thunnus thynnus</i>	Atlantic bluefin tuna	79.5	65
<i>Auxis thazard</i>	Frigate tuna	68.5	49.5
<i>Euthynnus affinis</i>	Kawakawa	70	60
<i>Euthynnus alletteratus</i>	Little tunny	73.5	60
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Skipjack tuna	71	46
<i>Sarda sarda</i>	Atlantic bonito	55	46.5
<i>Gymnosarda unicolor</i>	Dogtooth tuna	60	46
<i>Acanthocybium solandri</i>	Wahoo	55.5	46
<i>Allothunnus fallai</i>	Slender tuna	74	44

#### IV. CONCLUSION

The two small regions amplified by the primers using an asymmetric PCR, and the LNA-modified TaqMan probes proved to be good markers for the distinction of the 13 scombrids tested here if used simultaneously. The small sizes of the amplicons (82 bp and 112 bp) developed in this study increase their potential for the future application to detect if more than one fish species is present in canned tuna products.

The present methodology appears as a very promising tool for fast fish authentication. However, some research is required before its application as routine analysis in order to investigate more scombrid individuals (in the view of testing intra-polymorphism), to analyze also other scombrid fish species and teleost species. Moreover, methodology needs to be improved as the developed tests seem to be highly dependent on the DNA polymerase.

#### ACKNOWLEDGMENT

This study is a part of the IDThon project supported by Bpi France.

## REFERENCES

- Ahn, J. J., Kim, Y., Hong, J. Y., Kim, G. W., Kim, S. Y., & Hwang, S. Y. (2016). Probe-based fluorescence melting curve analysis for differentiating *Larimichthys polyactis* and *Larimichthys crocea*. *Food Analytical Methods*, 1-6.
- Tomás, C., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Faria, M. A. (2017). Codfish authentication by a fast Short Amplicon High Resolution Melting Analysis (SA-HRMA) method. *Food Control*, 71, 255-263.
- Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Secchi, C., & Bottero, M. T. (2007). Identification of four tuna species by means of real-time PCR and melting curve analysis. *Veterinary research communications*, 31, 355-357.
- Huang, Q., Liu, Z., Liao, Y., Chen, X., Zhang, Y., & Li, Q. (2011). Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS One*, 6, (4), e19206.
- Lopez, I., & Pardo, M. A. (2005). Application of relative quantification TaqMan real-time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 11, 4554-4560.
- Ahn, J. J., Kim, Y., Lee, S. Y., Hong, J. Y., Kim, G. W., & Hwang, S. Y. (2015). Fluorescence melting curve analysis using self-quenching dual-labeled peptide nucleic acid probes for simultaneously identifying multiple DNA sequences. *Analytical biochemistry*, 484, 143-147.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.

# Abstract

Bigeye tuna (*Thunnus obesus*), yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) are among the most widely used tuna species for canning purposes. Not only substitution but also mixing of tuna species is prohibited by the European regulation for canned tuna products. However, it can be difficult to authenticate the tuna species, due to their high degree of similarity or even when the external morphological characteristics are removed due to filleting before canning. Consequently, involuntary or fraudulent substitutions may occur during the canning process. In this study, the mitochondrial marker from NADH dehydrogenase subunit 2 gene was used to identify bigeye tuna and the mitochondrial marker cytochrome c oxidase subunit II gene was used to identify yellowfin tuna and skipjack tuna, utilizing TaqMan qPCR methodology. Two different qPCR-based methods were developed to quantify the percentage of flesh of each species used for can processing. The first one was based on absolute quantification using standard curves realized with these two markers; the second one was founded on relative quantification with the universal 12S rRNA gene as the endogenous gene. On the basis of our results, we conclude that our methodology could be applied to authenticate the two closely related tuna species (bigeye tuna and yellowfin tuna) when used in a binary mix in tuna cans.

**Keywords:** tuna, authentication, quantification, canned products, TaqMan, qPCR, species identification, bigeye tuna (*Thunnus obesus*), yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*)



# Résumé

Le thon obèse (*Thunnus obesus*), le thon albacore (*Thunnus albacares*) et le listao (*Katsuwonus pelamis*) comptent parmi les espèces de thon les plus utilisées en conserve. Lors de la fabrication de conserves de thon, la substitution d'espèce et/ou le mélange de différentes espèces de thon sont interdits par la réglementation européenne. L'authentification des espèces de thon reste complexe à cause du degré de similitude élevé entre les espèces de thon, ou encore, lorsque les caractéristiques morphologiques externes sont éliminées au cours du filetage et lors de la mise en conserve. Par conséquent, des substitutions involontaires ou frauduleuses peuvent se produire. Dans cette étude, le marqueur mitochondrial du gène de la sous-unité 2 de la NADH déshydrogénase a été utilisé pour identifier le thon obèse et le gène de la sous-unité II de la cytochrome c oxydase a été utilisé pour identifier le thon albacore et le listao en utilisant la PCR en temps réel basée sur la technologie TaqMan. Deux méthodes différentes basées sur la qPCR ont été développées pour quantifier le pourcentage de chair de chaque espèce présente au sein d'une boîte de thon. La première a été basée sur la quantification absolue avec standard externe réalisée avec les deux marqueurs. La seconde a été basée sur la quantification relative avec standard externe avec le gène endogène de l'ARN 12S. Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure que notre méthode peut s'appliquer pour quantifier les deux espèces de thon albacore et obèse génétiquement très proches lorsqu'elles sont utilisées dans un mélange binaire en conserve.

Mots clés : thon, identification, quantification, appertisation, TaqMan, qPCR, thon albacore (*Thunnus albacares*), thon obèse (*Thunnus obesus*), listao (*Katsuwonus pelamis*)