

## PCR-REAL TIME POUR IDENTIFIER LES ESPECES DE CREVETTES DANS LES PRODUITS TRANSFORMES

Nadia BESBES <sup>(1)</sup>, Stefano REALE <sup>(2)</sup>, Saloua SADOK <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologie marines, INSTM, centre La Goulette, Port de Pêche 2060, Tunis, TUNISIE,

<sup>(2)</sup> Institut Zooprofilattico sperimentale di Sicilia (IZSSi)

email/ \* nadia.besbes@gmail.com; salwa.sadok@instm.rnrt.tn

### ABSTRACT

During the last decades, we found that traceability has become a key issue for both the food industry and the consumer. In this context, the main aim of our work is the molecular identification of both fresh and processed shrimp by the optimization of DNA extraction and the amplification of the cytochrome b gene sequence by PCR real time. Various extraction methods were tested and the best PCI/SDS one was used and was followed by real-time PCR with a primer pair having a size of 315 bp using bioinformatics tool. The extraction and amplification were evaluated successfully for fresh shrimp and processed products such as shelled, cooked and breaded and located on the Sicilian and Tunisian markets.

### RESUME

Au cours des dernières décennies, la traçabilité est devenue un enjeu primordial aussi bien pour l'industrie agro-alimentaire que pour le consommateur. Dans ce cadre, l'objectif principal de notre travail consiste en l'identification moléculaire des crevettes fraîches et transformées par l'optimisation de l'extraction de l'ADN et de l'amplification de la séquence du gène cytochrome b par PCR en temps réel. Parmi différentes méthodes d'extractions d'ADN testées, le meilleur protocole PCI/SDS a été adopté et a été suivies d'une PCR en temps réel avec un couple d'amorce d'une taille de 315 pb conçu par outil bioinformatique. L'extraction et l'amplification ont été évaluées avec succès pour les produits de crevette fraîche et conditionnée sous forme décortiquée, panée et cuite se trouvant sur les marchés sicilien et tunisien.

### INTRODUCTION :

En Tunisie, les produits de la pêche occupent une place importante sur le plan économique. Leur transformation constitue un secteur potentiellement important à exploiter. Ainsi, dopée par l'innovation, la consommation des produits de la mer sous forme congelée et précuite connaît une croissance régulière et l'évolution des modes de vies ne fera qu'augmenter cette consommation (FAO, 2012). D'autre part, le consommateur est devenu de plus en plus soucieux de sa santé et de la qualité de son alimentation exigeant de connaître la nature et la provenance de son produit; quant à l'industriel il doit se conformer aux exigences et normes internationales qui requièrent également l'étiquetage du produit.

L'étiquetage du poisson et des produits de la pêche avec un autre nom d'espèce (substitution de certaines espèces par d'autres de moindre valeur commerciale) ou la déclaration d'une fausse origine géographique sont des fraudes très courantes dans le secteur halio-alimentaire. Ainsi, la traçabilité est devenue un enjeu primordial aussi bien pour l'industriel agro-alimentaire que pour le consommateur.

Face à cette problématique industrielle et sociétale, il y'a eu une demande accrue pour le développement de techniques qui permettent de garantir la conformité de ces produits aux normes et législations en vigueur.

Dans ce cadre, plusieurs techniques ont été développées comme PCR-RFLP, PCR-AFLP, PCR-SSCP (Pascoal et al., 2011 ; Khamnamtong et al., 2005) pour l'identification des espèces dans les produits de la mer transformés et conditionnés. Cependant la complexité des matrices après traitements (produits congelés, broyés, panés et cuits) rend difficile cette authentification au moyen des analyses morphologiques et des analyses des protéines. Ainsi, des méthodes d'identification basées sur les analyses moléculaires et l'amplification de la région de cyt b ont été développées (Benedict et al., 2013 ; Armani et al., 2015). L'objectif principal de notre travail est de comparer six méthodes d'extraction de l'ADN mitochondriale, l'application des méthodes optimisées pour l'amplification de l'ADN sur les produits de crevette à l'état frais et transformé se trouvant sur le marché Tunisien et Sicilien, et à effectuer une amplification par PCR en temps réel. Le but étant de mettre au point un protocole simple, rapide et fiable pour l'extraction de l'ADN des crevettes

fraîches et transformées. L'ADN extrait doit être de concentration et de pureté suffisante pour permettre l'authentification des espèces par les techniques moléculaires de PCR en temps réel.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Matériel biologique

Les échantillons (15) sont prélevés sur des espèces de crevettes appartenant aux familles des Penaeidae et Pandalidae commercialisés sous différentes formes (frais, décortiqués, surgelés, panés ou entiers), puis conservés à -80°C., parmi lesquelles des produits transformés mal étiquetés se trouvant sur les marchés tunisien et sicilien.

### Conception des amorces par bio-informatique

Nous avons opté pour la conception des amorces à l'utilisation des logiciels bio-informatiques tels que logiciel BioEdit et logiciel Mega 5 (Tamura et al., 2011) pour l'alignement multiple des différentes séquences et la conception des amorces.

### Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des espèces de crevette à l'état frais et transformé a été effectuée selon la méthode d'extraction (Besbes et al., 2011) Phenol-chloroform-isoamyl alcohol: SDS/PCI avec certaines modifications: , 100 mg de tissus ont subi une digestion dans un tampon A (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS) et 20 µL protéinase K (0.1 mg), L'ADN est extrait en plusieurs étapes avec un mélange PCI. La phase aqueuse finale récupérée est placée dans un nouveau tube eppendorf. Un volume de 10 % v/v d'acétate de sodium 3 M est ajouté afin d'ajuster le pH

de la solution, précipitation avec de l'éthanol absolu glacial (-20°C), ensuite lavage avec l'éthanol glacial 70%, après centrifugation le culot est récupéré, séché et remis en suspension dans 100 µl de TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) et conservé à 4 °C.

### Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN

L'ADN a été quantifié et sa pureté estimée par nanodrop. Les extraits d'ADN reçus obtenus ont été quantifiés par la mesure à la longueur d'onde 260 nm et leurs qualités est estimée à 280 nm qui permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN. Un ADN est considéré pur si le rapport R: 260/280 est compris entre 1,8 et 2 .

### Amplification par PCR en temps réel

Une quantification efficace de l'ADN est effectuée grâce à la méthode par PCR en temps-réel (Juste *et al.*, 2008) qui est basée sur la détection et la quantification d'une molécule fluorescente. Le signal fluorescent est directement proportionnel à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. La méthode de PCR en temps-réel a été effectuée en utilisant la technologie de fluorescence SYBR-Green I.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude, chacun des quinze échantillons analysés a été amplifiés par PCR en temps réel avec succès en utilisant les amorces communes cytpen/Crust (Tableau I). Les fragments de l'ADN du gène de Cyt b ont été amplifiés avec succès.

**Tableau I :** Séquences des amorces pour amplification du gène de Cytb

<b>Cytpen (Fwd)</b>	5'-ATGACAATACCAATTCGTAARTC-3'	600 pb
<b>Crust (Rev)</b>	5'-TGGCTCCCCAGAATGATATTTG-3'	

Après extraction par le protocole optimisé, la concentration et la pureté de l'ADN des différentes espèces de crevettes fraîches et transformées ont été mesurées par nanodrop.

Le tableau II résume les résultats obtenus :

Le tableau II présente un rendement élevé de l'ADN en termes de qualité et quantité pour tous les échantillons de crevette analysés à l'état frais et transformé.

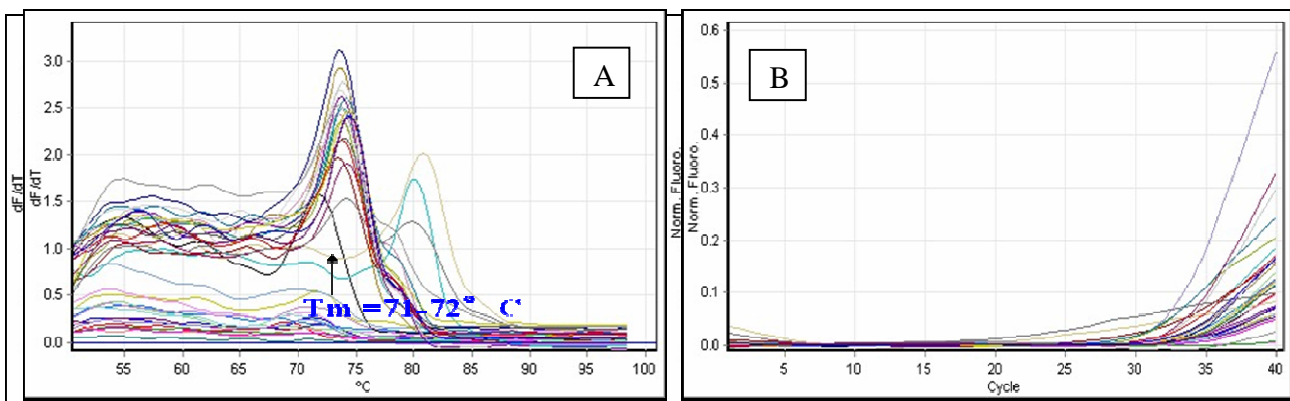
Afin de valider cette méthode de quantification, 15 échantillons de crevettes ont été quantifiés en utilisant la méthode de PCR en temps-réel. Tous les échantillons sont détectables.

**Tableau II : Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN**

Echantillons	Origine	Concentration ng/µl	A260/A280
<i>Penaeus kerathurus</i>	Tunisie	115.75	1,98
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Tunisie	113,63	1,85
<i>Metapenaeus monoceros</i>	Tunisie	114,85	1,65
<i>Plesionika heterocarpus</i>	Tunisie	110,68	1,82
<i>Plesionika edwardsii</i>	Tunisie	233.2	1,95
<i>Crevette royale surgelée</i>	Tunisie	286.55	2,10
<i>Chevrette surgelée</i>	Tunisie	122.81	1,88
<i>Crevette surgelée</i>	Tunisie	528.96	2,05
<i>Crevettedécortiquée surgelée</i>	Tunisie	115.32	1,84
<i>Crevette cuite</i>	Tunisie	143.79	1,79
<i>Crevette pané</i>	Tunisie	545.36	1,99
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Sicile	123.2	1,97
<i>Crevette congelée</i>	Sicile	178.35	1,88
<i>Crevette décortiquée précuite et congelée</i>	Sicile	124.99	2,05
<i>Crevette décortiquée surgelée</i>	Sicile	254.32	2,07

Nous avons eu des amplifications PCR de crevette avec un Ct moyen de 33 (cycle seuil) et un Tm qui est de l'ordre de 72°C, un exemple de courbe d'amplification est donné dans la figure 1. L'analyse des résultats

montre que les conditions d'amplification ont été optimisées pour ces deux couples d'amorces et nous avons ainsi réussi à amplifier les 15 espèces de crevettes.



**Figure 1 : PCR en temps réel. Courbe de fusion (A) et courbe d'amplification (B)**

## CONCLUSION

La PCR en temps réel avec une détection SYBR Green est un outil sensible, spécifique et susceptible de répondre plus aisément aux problèmes d'identification des produits de la mer transformés et commercialisés et donc à la détection des fraudes sur le marché.

Cette méthode de PCR en temps-réel permet d'obtenir un résultat de quantification rapide en 6 heures environ (traitement de l'échantillon et analyse des données inclus) contrairement à la PCR conventionnelle qui requiert entre 12 heures pour l'obtention des résultats.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3\_08 co-financé par l'UE.

## BIBLIOGRAPHIE

ARMANI A., GUARDONE L., CASTELLANA R.L., GIANFALDONI D., GUIDI A. and CASTIGLIEGO L. (2015). DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the Italian market. *Food Control*. 55: 206-214.

BENEDICT A.M., ROSELYN D.A., MINERVA H.V., SWEEDY KAY L.P., DEMIAN A.W. and MUDJEKEEWIS D.S. (2013). Detection of mislabeled commercial fishery by-products in the Philippines using DNA barcodes and its

implications to food traceability and safety. *Food Control*. 33: 119-125.

- BESBES N, FATTOUCH S., SADOK S. (2011). Comparison of methods in the recovery and amplificability of DNA from fresh and processed sardine and anchovy muscle tissues. *Food. Chem.* 129: 665-671.
- FAO (2012). The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- JUSTE A., THOMMA B, LIEVENS B. (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food. Microbiol* 25: 745-761.
- KHAMNAMTONG B., KLINBUNGA S., MENASVETA P. (2005). Species identification of five Penaeid shrimps using PCR-RFLP and SSCP analyses of 16S ribosomal DNA. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 491-499.
- PASCOAL A., BARROS-VELAZQUEZ J., ORTEA I., CEPEDA A., GALLARDO M.J., CALO-MATA P. (2011). Molecular identification of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) by PCR targeted to the 16S rRNA mtDNA. *Food Chem.* 125: 1457-146.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M. and KUMAR S. (2011) -. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol.* 28: 2731-2739.