

Kit PRECICE® K-Freshness Assay

Mesure de l'état de Fraîcheur des Poissons et Produits de la Mer par la "valeur K "

I. Le concept de la "valeur K"

L'ATP (adénosine triphosphate) est le principal vecteur de l'énergie cellulaire. Son contenu est particulièrement important dans les cellules des muscles, où une grande quantité d'ATP est utilisée pour déclencher la contraction musculaire. Dès qu'un animal meurt, la respiration cellulaire s'arrête et il n'y a plus de formation d'ATP. Une fois le stade de rigidité cadavérique (*rigor mortis*) atteint, entre quelques minutes et quelques heures après l'abattage de l'animal, la réserve d'ATP commence à être progressivement et séquentiellement dégradée selon une succession de réactions, comme l'illustre la figure 1



Figure 1: Dégradation post-mortem de l'ATP dans le poisson et formation d'IMP, d'Inosine (Ino) et d'Hypoxanthine (Hx)

La dégradation post-mortem de l'ATP est principalement due à des réactions autolytiques contrôlées par des enzymes endogènes (même si la flore microbienne, lorsqu'elle est suffisamment développée, y contribue aussi). Ceci fait du niveau de dégradation de l'ATP un excellent critère de mesure de la fraîcheur du poisson et de son âge de conservation, avant même que ne commence la phase de détérioration par les micro-organismes et que les techniques traditionnelles correspondantes ne deviennent alors pertinentes.

À la fin des années 1950, une équipe de chercheurs japonais (Saito *et al.*) proposa un nouveau concept, baptisé "Valeur K", pour indiquer la fraîcheur de la chair de poisson. La valeur K est fondée sur la dégradation de l'ATP et la formation des produits qui en résulte, à savoir l'adénosine diphosphate (ADP) et monophosphate (AMP), l'inosine monophosphate (IMP), l'inosine (Ino) et, à son ultime étape, l'hypoxanthine (Hx). La valeur K mesure combien la dégradation de l'ATP a progressé dans le tissu. Elle est exprimée comme le pourcentage des deux derniers produits résultant du catabolisme de l'ATP, c'est à dire Ino et Hx, par rapport à l'ATP et à l'ensemble des composés de dégradation de l'ATP : ATP, ADP, AMP, IMP, Ino and Hx.

Or, chez la plupart des animaux, l'ATP se décompose très rapidement en IMP. Une valeur K simplifiée (généralement appelée valeur Ki) a été très tôt proposée par Karube et al. (1984) et est actuellement considérée comme équivalente à l'équation de la valeur K utilisant à 6 paramètres.

$$K (\%) = \frac{\text{Ino} + \text{Hx}}{\text{IMP} + \text{Ino} + \text{Hx}}$$

La valeur K est reconnue depuis plusieurs décennies comme le plus efficace et le plus objectif indicateur de la fraîcheur du poisson et des produits de la mer, ainsi que des viandes (boeuf, porc, agneau et volaille)

Plus la valeur K est faible, plus le poisson est frais.

II. Principe

Le Kit PRECICE® K-Freshness Assay est un outil enzymatique qui permet de déterminer facilement le niveau de fraîcheur de la chair animale, en particulier du poisson et des produits de la mer, par mesure spectrophotométrique de la valeur K d'échantillons de chair, sur microplaque standard à 96 puits. Le Kit PRECICE® K-Freshness Assay est fondé sur l'utilisation d'enzymes recombinantes originales, impliquées dans le métabolisme des nucléotides, et qui permettent un dosage simple et fiable de l'IMP, de l'Ino et de l'Hx par spectrophotométrie (procédé breveté).

Pour chaque échantillon de poisson, les quantités d'IMP et de l'ensemble IMP + Ino + Hx sont mesurées par absorbance à 340nm. La valeur K value est alors facilement calculée à partir des deux mesures d'absorbance obtenues pour l'échantillon (plus une mesure d'absorbance pour le bruit de fond).

III. Méthode

Sensibilité

Le Kit PRECICE® K-Freshness Assay montre une excellente sensibilité puisque la LID (Limite Inférieure de Détection) et la LIQ (Limite Inférieure de Quantification) sont de 4.5µM et 8.5µM, respectivement. Ainsi, le Kit PRECICE® K-Freshness Assay permet de détecter une dégradation de l'IMP de 4% seulement (c'est à dire une valeur K de 4%).

Etude de la linéarité

La corrélation entre l'absorbance mesurée à 340nm et la concentration en IMP, Ino et Hx d'un échantillon a été étudiée à partir d'un extrait de maquereau auquel de l'IMP, de l'Ino ou de l'Hx a été ajoutée à différentes concentrations connues. Les valeurs d'absorbance obtenues ont été corrigées du "blanc" (correspondant à l'extrait de maquereau sans ajout d'IMP, d'Ino ou de Hx).

Les résultats montrent que l'absorbance mesurée en utilisant le Kit **PRECICE® K-Freshness Assay** est très fortement corrélée aux concentrations d'**IMP**, d'**Ino** et d'**Hx**. L'absorbance est linéaire jusqu'à des concentrations de 100µM d'**IMP**, d'**Ino** et d'**Hx**, avec un coefficient de corrélation (ρ) > 0.998.

Les figures suivantes montrent la linéarité entre l'absorbance mesurée et la concentration d'**IMP** (Fig. 2a), d'**Ino** (Fig. 2b) et d'**Hx** (Fig. 2c).

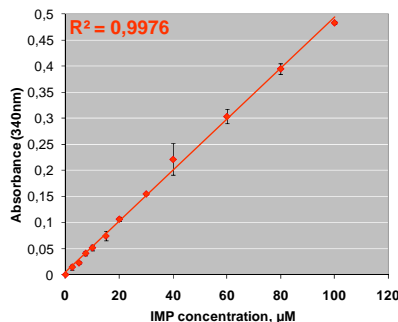


Figure 2a: Linéarité entre l'absorbance et la concentration en IMP dans l'échantillon de poisson

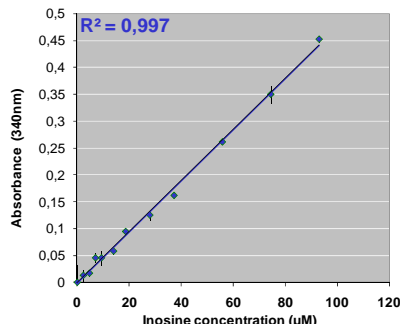


Figure 2b: Linéarité entre l'absorbance et la concentration en inosine dans l'échantillon de poisson

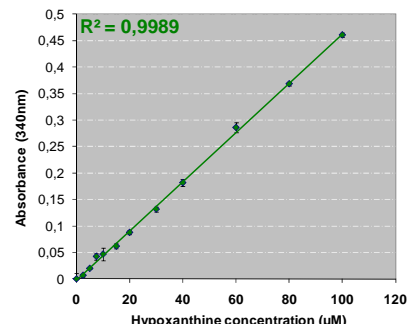


Figure 2c: Linéarité entre l'absorbance et la concentration en hypoxanthine dans l'échantillon de poisson

IV. Contenu du Kit

Un Kit **PRECICE® K-Freshness Assay** standard (une plaque de 96 puits) contient :

- un tube de 15ml contenant un mélange d'enzymes, "**Enzyme mix I**" (**orange**), lyophilisées, pour le dosage d'**IMP**
- un tube de 15ml contenant un mélange d'enzymes, "**Enzyme mix II**" (**blue**), lyophilisées, pour le dosage d'**IMP** + **Ino** + **Hx**
- un tube de 50ml contenant 20ml de tampon de réaction "**Reaction buffer**"
- 3 tubes contenant les cofacteurs (poudre)
- une microplaque transparente (96 puits, à fond rond, Corning, Costar®, réf. 3797)

V. Conservation

Le Kit **PRECICE® K-Freshness Assay** doit être conservé à -20°C avant utilisation. Les mélanges enzymatiques ("**Enzyme mix I**" et "**Enzyme mix II**"), et le tampon de réaction ("**Reaction buffer**") doivent être fraîchement préparés avant de réaliser les essais.

Une fois préparés, réactifs et solutions enzymatiques ne sont plus assez stables pour être conservés.

VI. Description de la procédure

Préparation des échantillons

- Prélever 3-4 g de chair dans le muscle du poisson. Placer dans un tube propre et mettre à bouillir 30 mn au bain-marie
- Pipeter 5 µL du liquide translucide obtenu (exsudat) dans 6 puits, sur une demi-colonne annotée (par exemple D1-D6) : les puits des rangées 1 & 2 et 7 & 8 serviront à la mesure du bruit de fond (**Blanc**), les puits des rangées 3 & 4 et 9 & 10 au dosage d'**IMP** et les puits des rangées 5 & 6 11 & 12 au dosage d'**IMP** + **Ino** + **Hx** (voir la Figure 3 pour la préparation de la microplaque et la disposition des différentes séries d'essais).

Préparation de la microplaque

La valeur K de jusqu'à 16 échantillons peut être mesurée en duplicata sur une plaque standard de 96 puits.

Il est fortement conseillé de disposer les extraits d'échantillon de poissons pour la mesure des **Blancs**, de l'**IMP** et de **IMP** + **Ino** + **Hx** comme indiqué sur la Figure 3.

Figure 3: Disposition de 16 échantillons, en duplicata, pour mesure de la valeur K sur une microplaque de 96 puits. Les puits correspondant à l'échantillon 4 sont surlignés en grisé comme illustration d'un essai en duplicata.

	Blank		IMP		IMP + Ino + Hx		Blank		IMP		IMP + Ino + Hx		
Samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Samples
1	A												9
2	B												10
3	C												11
4	D												12
5	E												13
6	F												14
7	G												15
8	H												16

Préparation des mélanges réactionnels

- Verser les contenus des 3 tubes contenant les cofacteurs dans le tube de 50 mL "Reaction buffer". Mélanger doucement en faisant basculer le tube jusqu'à dissolution des cofacteurs.
- A partir de ce tampon de réaction "Reaction buffer" contenant les **cofacteurs** (préparé en i), pipeter 14 mL et verser doucement dans le tube de 15 mL "Enzyme mix I" (**orange**). **Ne pas vortexer**. Mélanger en faisant basculer doucement le tube pour éviter la formation de bulles.
Le mélange Enzyme mix I est maintenant prêt pour doser IMP
- A partir du mélange "Enzyme mix I" (**orange**) préparé en ii), pipeter 7 mL et verser doucement dans le tube de 15 mL "Enzyme mix II" (**blue**). **Ne pas vortexer**. Mélanger en faisant basculer doucement le tube pour éviter la formation de bulles.
Le mélange Enzyme mix II est maintenant prêt pour doser IMP + Ino + Hx
- Dans les puits des rangées 1 & 2 et 7 & 8 préparés pour les mesures des **Blancs** en duplicata, ajouter 200µL / puits de tampon de réaction "Reaction buffer" prélevé de ce qui reste du tube de 50 mL
- Dans les puits des rangées 3 & 4 et 9 & 10 préparés pour le dosage d'IMP, ajouter 200µL / puits du mélange "Enzyme mix I" (**orange**) préparé en ii).
- Dans les puits des rangées 5 & 6 et 11 & 12 préparés pour le dosage d'IMP + Ino + Hx, ajouter 200µL / puits du mélange "Enzyme mix II" (**blue**) préparé en iii).
- Insérer la microplaque dans le lecteur, mettre à agiter 2 mn et laisser incuber à 37°C pendant 60 mn ou à 25°C pendant 90 mn. Vérifier l'absence de bulles d'air dans les puits et lire l'absorbance à 340 nm. Enregistrer les données.

Calcul de la valeur K

Pour chaque essai, K est calculée selon la formule suivante:

$$K\text{-value (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{IMP} + \text{Ino} + \text{Hx}} - \text{Abs}_{\text{IMP}}}{\text{Abs}_{\text{IMP} + \text{Ino} + \text{Hx}} - \text{Abs}_{\text{Blank}}}$$

- où: Abs_{IMP + Ino + Hx} est l'absorbance dans le puits contenant le mélange "Enzyme mix II" pour la mesure de IMP + Ino + Hx
Abs_{IMP} est l'absorbance dans le puits contenant le mélange "Enzyme mix I" pour la mesure d'IMP
Abs_{Blank} est l'absorbance dans le puits contenant le tampon de réaction "Reaction buffer" pour mesurer le bruit de fonds (**Blanc**)