

N. Faury<sup>1</sup>, Coordinatrice  
P. Geairon<sup>1</sup>, J. Moal<sup>2</sup>, S. Pouvreau<sup>2</sup>, D. Razet<sup>1</sup>, M. Ropert<sup>3</sup>  
P. Soletchnik<sup>1</sup>.

DRV/RST/RA/LCPC/2003-09

14907  
E 500. ANA. A.  
04/12/2008

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE

---

**TABLE RONDE**  
**Les Analyses Biochimiques de PLG**  
**Dans la chair des Coquillages**  
Présentations et discussions  
Ifremer Nantes, le 11 mars 2003

- 1 : Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes  
2 : Laboratoire Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins  
3 : Laboratoire Conchylicole de Normandie

<b>Type de rapport :</b> RST	
<b>Numéro d'identification du rapport :</b> DRV/RST/RA/LCPC/2003-009 <b>Diffusion :</b> libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> <b>Validé par :</b> Adresse électronique : - chemin UNIX : - adresse WWW : <a href="mailto:Nicole.Faury@ifremer.fr">Nicole Faury@ifremer.fr</a>	<b>date de publication</b> Septembre 2003 <b>nombre de pages</b> 75 <b>bibliographie</b> Oui <b>illustration(s)</b> Oui  <b>langue du rapport</b> Français
<b>Titre et sous-titre du rapport :</b> <p style="text-align: center;"><b>Les analyses Biochimiques de Protéines Lipides Glucides dans la chair des coquillages.          Table Ronde, Présentation et Discussion :          Ifremer Nantes , le 11 mars 2003</b></p> <b>Titre traduit :</b> <p style="text-align: center;"><b>Biochemical analyses protein glucids lipids in the flesh of the shells          Workshop, Ifremer Nantes, March 11, 2003.</b></p>	
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b> Faury N., P. Geairon., J. Moal, S. Pouvreau, D. Razet, M. Ropert, P. Soletchnik.	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> DRV/RA/ La Tremblade/LCPC
<b>Collaborateur(s) :</b> nom, prénom	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b>
<b>Organisme commanditaire :</b>	
<b>Titre du contrat :</b>	<b>n° de contrat Ifremer</b>
<b>Organisme(s) réalisateur(s) :</b> nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s) <b>Responsable scientifique :</b>	
<b>Cadre de la recherche :</b> Programme : <span style="float: right;">Convention :</span> Projet : <span style="float: right;">Autres (préciser) :</span> Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	



### Résumé :

Les analyses de Protéines, Lipides et Glucides (PLG) sont régulièrement pratiquées dans les laboratoires appartenant au département Ressources Aquacoles. Les méthodes tout d'abord employées pour les dosages de l'eau de mer ont été transposées au dosage de la chair des coquillages. Après plusieurs années d'utilisation de méthodes reconnues internationalement (Lowry *et al.*, 1951 ; Dubois *et al.*, 1956 ; Marsh et Weinstein, 1966), il convenait de faire un bilan et de réfléchir au bien fondé de leur utilisation.

La table ronde a permis de réunir les chercheurs et techniciens d'Ifremer du département RA (Ressources Aquacoles) et VP (Valorisation des Produits) ainsi que nos partenaires extérieurs (Université de Caen). Différents exposés relatant des expériences anciennes ou récentes (travaux de méthodologie, nouvelles publications...) sont venus en soutien aux discussions. Les représentants du département VP spécialisés en biochimie ont pu apporter un regard critique et novateur en proposant des méthodes nouvelles.

L'accent a été mis sur le fait qu'il convient de bien définir les cadres et objectifs des études et d'éviter de programmer systématiquement l'analyse des PLG. Le dosage est un outil d'aide à la compréhension des phénomènes biologiques à condition de choisir le bon outil.

Le constat est fait de notre incapacité à l'heure actuelle de donner la composition précise de la chair des coquillages alors que l'industrie agroalimentaire est en mesure de le faire. Les méthodes utilisées ont été remises en cause notamment celle du dosage des protéines. La méthode de Lowry peut être remplacée par celle de Bradford ou par l'analyse élémentaire (CHN). Le dosage par la méthode de Kjeldall semble difficile à mettre en œuvre pour un laboratoire réalisant de nombreuses analyses. Le dosage du glycogène doit être amélioré par une précipitation à froid. L'analyse des lipides doit être effectuée sur la chair humide. Une autre méthode par Résonance Magnétique Nucléaire sera à évaluer ultérieurement.

### Abstract :

Proximate biochemical analysis (proteins, lipids and carbohydrates) are performed on a regular basis by the various laboratories from the Aquaculture Resources Directorate. Methods initially developed to analyse hydrological parameters were firstly transferred to assess meat components. It appears now important to review and update the commonly used methods (Lowry *et al.*, (1951), Dubois *et al.*, (1956), Marsh et Weinstein, (1966)), for our specific purposes. A round table was organized to facilitate discussion among researchers and technicians from both Directorates 'Aquaculture Resources' and 'Product Valorization' and external partners, University of Caen. Several communications reviewing former and recent studies were done. Colleagues from the Directorate 'Product Valorization', specialized on biochemical analysis brought new insights on current and new methodologies.

Over the course of the discussion, it was emphasized that while several analysis were carried out on a regular basis, no specific objectives and data treatment have been systematically developed. This should be reformatted accordingly for further programs. It was stated that biochemical analysis were considered as an appropriate tool to facilitate understanding of biological phenomenon assuming appropriate methodologies were used.

It was reported that precise oyster biochemical composition was still difficult to estimate while it is done on a regular basis in other domains such as food industry. The current methods were discussed, with special emphasis on uncertainties resulting from protein analysis. The use of Bradford or CHN methods, rather than Lowry method, would improve significantly estimates. Although of interest, Kjeldall methodology appears difficult to implement at the laboratory level for numerous analysis. Glycogen assessment should be improved by a preliminary treatment using cold precipitation. Lipids analysis should be performed on wet meat rather than on dry meat. In the near future, the MNR methodology should be assessed as a possible alternative method.

**Mots-clés** : composition biochimique, comparaison méthodes, protéines, lipides, carbohydrates, glycogène

**Keywords** proximate biochemical composition, methods comparison, proteins, lipids, carbohydrates, glycogen

1. <i>Introduction</i>	1
2. <i>Bref historique des évolutions de méthodes</i>	2
3. <i>Utilisation au sein d'un laboratoire côtier, exemple du LCPC, de la biochimie PLG de la chair de Crassostrea gigas</i>	6
4. <i>La Biochimie et la Reproduction chez les Ostréidés et Ptériidés: Mes angoisses, Mes peurs, Mes doutes</i>	23
5. <i>Les « grands principes » avant d'entreprendre les dosages</i>	29
6. <i>Discussion 1 : généralités</i>	34
7. <i>Répétabilité, Reproductibilité des Protéines, Lipides, Glucides</i>	36
8. <i>Dosage des Protéines</i>	51
9. <i>Dosage des Glucides Totaux et Glycogène</i>	59
10. <i>La préparation de l'échantillon : le broyage</i>	64
10.1. <i>Broyeur à bille</i>	65
10.2. <i>"Moulin à café"</i>	65
11. <i>Comparaison CHN-Analyses des PLG</i>	68
12. <i>Discussion 2 : la technique</i>	70
13. <i>Conclusion et Perspectives :</i>	73
14. <i>Bibliographie</i>	74

## LISTE DES PARTICIPANTS :

BLOUIN	Frédéric	LCPC La Tremblade
BOUGET	Jean-François	LCB La Trinité
COCHARD	Jean-Claude	LPI Brest
DONNAY	Claire	VP Nantes
FAURY	Nicole	LCPC La Tremblade
GEAIRON	Philippe	LCPC La Tremblade
GUILPAIN	Patrice	LCPC La Tremblade
HEUDE	Clotilde	LBBM Caen
KELLNER	Kristel	LBBM Caen
LE COZ	Jean-René	LPI Brest
LE MOINE	Olivier	LCPC La Tremblade
MOAL	Jeanne	LPI Brest
PERRIN	Armelle	LBBM Caen
POUVREAU	Stéphane	LPI Brest
PROU	Jean	LCPC La Tremblade
RATISKOL	Jacqueline	VP Nantes
RAZET	Daniel	LCPC La Tremblade
ROBERT	Stéphane	LCPC La Tremblade
SEROT	Thierry	VP Nantes
SOLETCHNICK	Patrick	LCPC La Tremblade

Excusés : Costill Katherine, LBBM Caen  
Kopp Joël, Ropert Michel, Simonne Charlotte , LCN Normandie  
Le Gall Patrick, LCM Sète  
Lelong Amandine, INRA St Pée sur Nivelles.



## 1. Introduction

**Nicole Faury**

Les analyses de Protéines, Lipides, Glucides ont été introduites dans les années 70. Pratiquées sur le matériel particulaire en suspension dans l'eau de mer, les méthodes ont été transposées à la chair de coquillages. Elles sont devenues un outil pour la compréhension et l'étude des cycles physiologiques notamment de la période de reproduction des animaux en élevage.

A priori, les méthodes de dosages utilisées par les laboratoires qui travaillent sur des problématiques proches sont les mêmes, peut-être à quelques variantes près. Cependant, on peut faire sans risque un constat : les analyses sont réalisées et interprétées par des techniciens ou chercheurs qui ne sont pas forcément tous experts en Biochimie.

D'autre part, malgré la qualification du personnel, n'y a-t-il pas de dérive méthodologique d'autant qu'il n'existe pas de manuel de référence encore moins de norme.

Quelques questions peuvent se poser :

Le résultat obtenu est-il fiable ?

Qu'elle est sa précision ?

Savons-nous réellement ce que nous dosons ?

A cela, les réponses que nous pouvons apporter sont assez vagues :

Fiabilité = peut-être

Précision = aucune idée

Savons-nous réellement ce que nous dosons : la comparaison est faite par rapport à un étalon qui n'est pas forcément un constituant de l'huître ou des coquillages (ex : albumine de bœuf).

Dans ces conditions, les risques d'erreur d'interprétation des données ne sont pas nuls.

S'il y a eu des concertations sur les analyses réalisées sur l'eau lors des journées du GABIM en 1984 (Moal *et al.*, 1985), à ma connaissance cela n'a pas été mené sur les analyses de la chair des coquillages.

Les méthodes que nous utilisons sont reconnues internationalement : Lowry *et al.*, (1951) ou Bradford M.M., (1976); Dubois *et al.*, (1956), Marsh et Weinstein, (1966)... Mais il n'est pas interdit de réfléchir au fait qu'elles sont adaptées ou non à nos besoins. Répondent-elles à nos attentes ?

« Y a t il mieux sur le marché ? »

Nous sommes réunis aujourd'hui pour faire le point. Peut-être remettre en cause certains points méthodologiques ou même fondamentaux quant aux choix des outils.



## 2. Bref historique des évolutions de méthodes

Daniel Razet

Dans les années 70-80, les analyses étaient réalisées sur des chairs fraîches, finement broyées à l'ultra turax par exemple. Les aliquotes étaient de l'ordre du gramme et représentaient donc une proportion importante de l'animal.

Les glucides étaient mesurés par la méthode spectrophotométrique à l'antrone sulfurique. Les protéines étaient évaluées par le biuret. Les lipides étaient alors extraits par un solvant du type xylène et étaient évalués par pesée après séparation des phases et évaporation du solvant.

Tous les résultats étaient exprimés en équivalent glucose pour les glucides, en équivalent albumine de bœuf pour les protéines et en poids pour les lipides.

Dans le même temps vers 1976, les mêmes éléments biochimiques étaient dosés sur la matière organique particulaire de l'eau de mer. Nous mettions donc au point l'analyse des protéines par colorimétrie (méthodes issues des analyses sanguines). Le protocole de Lowry amélioré par nos soins permettait à l'époque de mesurer les protéines particulières. Parallèlement, nous utilisons la méthode de Dubois pour évaluer les glucides. Les lipides particuliers étaient alors dosés après extraction au chloroforme-méthanol et purification selon le protocole décrit par Blight et Dyer (1959). Les mesures spectrophotométriques étaient alors assurées selon la méthode de Marsh et Weinstein. Encore une fois, n'oublions jamais que les résultats étaient toujours exprimés en équivalent glucose pour les glucides, albumine de bœuf pour les protéines et glycérol tripalmitate pour les lipides.

Les analyses de la chair fraîche d'huître étaient lourdes et laborieuses. Le pas a été rapidement franchi d'appliquer ces méthodes pour les particules dans l'eau de mer aux chairs d'huîtres en adaptant les extractions, notamment pour l'étude des bilans énergétiques et des relations entre les compartiments « eau – animal ».

L'extraction est réalisée sur quelques milligrammes de chairs séchées (par étuvage). Le séchage a été ensuite effectué au lyophilisateur.

Les lipides sont dosés depuis déjà une bonne décennie selon le protocole de Marsh et Weinstein après extraction dans un mélange chloroforme méthanol pour assurer une purification décrite par Blight et Dyer.

Les glycoènes sont cristallisés par le l'éthanol absolu depuis un aliquote de la solution ci-dessus. Glucides et glycoènes sont évalués selon la méthode ancestrale de Dubois *et al.*

Les protéines sont mesurées d'après la méthode non moins ancienne de Lowry.

Nous avons amélioré en 1995 avec Phillipe Geairon la méthode de dosage des glucides totaux et glycogène. Les glucides étaient extraits dans du TCA sur les culots d'extraction du dosage des lipides. Les résultats avaient été présentés aux journées conchylicoles de 1997 et décrites dans une excellente revue : les Notes techniques de l'URAPC RIDRV 96-11 La Tremblade. Devant un certain doute quant à l'assez faible quantité de glucides détectés, nous avons réfléchi et avons vérifié la fiabilité des résultats en dosant en parallèle les 2 extraits : le premier sur le culot d'extraction des lipides, le second sur une prise d'essai de chair lyophilisée. Une nette perte de produit (près de la moitié) se produisait en suivant le protocole sur les culots délipidés. La reproductibilité des résultats statistiquement significative (plus de 100 mesures) n'était pas que le fait du hasard.

Nous sommes tous confrontés maintenant à l'utilisation des mêmes méthodes toujours discutables mais ayant au moins le mérite d'exister ; toutes propositions de protocole prêt à l'emploi sont bien sur les bienvenues.

# Les Analyses biochimiques des lipides, glucides et protéines

sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Standardisation des méthodes

Daniel Razet /LCPC/La Tremblade

## Les méthodes utilisées

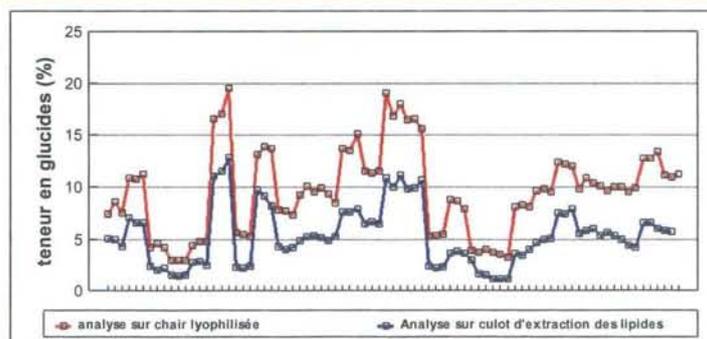
- Lipides (Marsh et Weinstein 1966)
- Glucides (Dubois *et al.* 1956)
- Glycogène (Dubois *et al.* 1956)
- Protéines (Lowry *et al.* 1951)

## 2 méthodes d'analyse des glucides

sur les culots après extraction des lipides

sur un aliquote sec sans traitement initial

## Comparaison des 2 méthodes



### 3. Utilisation au sein d'un laboratoire côtier, exemple du LCPC, de la biochimie PLG de la chair de *Crassostrea gigas* Patrick Soletchnick

#### Introduction

Au Laboratoire Conchylicole de Poitou - Charentes, les protéines, lipides et glucides sont mesurés à partir de la chair sèche de *Crassostrea gigas*, afin d'apporter des informations biologiques sur la qualité (teneur en glycogène, réserve en sucres) et l'état de maturation des cheptels (teneur en lipides). Des mesures sont effectuées depuis 1986 en particulier, année de création du réseau croissance de *Crassostrea gigas* dans le Bassin de Marennes-Oléron. Puis, des analyses ont été effectuées systématiquement sur les cheptels au cours des suivis des mortalités estivales depuis 1996 et pour d'autres programmes également. Les méthodes analytiques ayant été amenées à évoluer ; les deux périodes, avant et après 1996 (date à laquelle le protocole d'analyse des sucres a été modifié) se distinguent donc dans l'analyse des résultats.

#### Résultats

Le taux de glycogène par rapport aux sucres totaux (y) de la chair est lié aux sucres totaux (x) par la relation suivante :

$$Y = 0,107 + 0,268 (\ln X) \qquad R^2 = 46,0$$

Si la teneur en sucre de la chair est inférieure à 2%, le ratio (taux de glycogène/sucres totaux) est de l'ordre de 40%. Si la teneur en sucre de la chair est supérieure à 8 % de la chair, le taux de glycogène dépasse alors les 60% et peut atteindre 95%.

La teneur en sucre est un descripteur qui présente une très forte variabilité entre les individus. Selon les années précédant les cycles de mesures et les conditions trophiques de l'année d'étude, la teneur en sucres totaux peut varier de 2-3% en post ponte à 15-20% du poids sec au cours de l'automne. Ce descripteur, mesuré via un protocole rigoureux, permet de bien caractériser les cheptels (aspect "historique") et les conditions trophiques d'élevage.

Dans le cas du Bassin de Marennes-Oléron, et quels que soient les cheptels étudiés depuis 1986, la teneur en lipides de la chair suit toujours un profil à peu près identique (variations inter annuelles). De 6-8% de lipides en hiver, la teneur en lipides de la chair augmente jusqu'à 14-16% avant la ponte. La ponte (fin juillet - début août) est toujours marquée par une chute de la teneur en lipides de 4 à 8 %. Ce descripteur a permis par exemple de mettre en évidence des décalages de ponte ayant lieu entre les bancs ostréicoles ou sur un même banc, entre des parcs soumis à différents degrés d'émersion.

Comme les 3 autres descripteurs (lipides, glucides et glycogène), la teneur en protéines est mesurée régulièrement sur les cheptels en expérimentation. Ce



descripteur a été très peu utilisé dans les analyses de données et présentations des résultats.

### Conclusion

La teneur en lipides représente un bon indicateur de la maturation dans un bassin comme Marennes-Oléron, pour des cheptels issus de captage naturel. Elle se présente comme un descripteur insuffisant pour comparer des régions ostréicoles différentes (Normandie, Bretagne, Charente...) ou du matériel biologique présentant des profils de maturation contrastés (eg familles génétiques "sensibles" et "résistantes" du programme MOREST). Dans ces cas là, une solution alternative doit être trouvée (eg histologie quantitative). Dans le cas du Bassin de Marennes-Oléron, l'indice de Walne et Mann et l'évolution du poids sec peuvent également constituer une solution alternative au contrôle de la gamétogenèse et à la ponte.

La teneur en sucres de la chair montre des différences inter annuelles fortes. Elle est également associée aux types de cultures (eg plat/table). Les cycles de mise en réserve et utilisation des réserves fluctuent selon les régions et la disponibilité trophique. Depuis 1996, aucune relation de cause à effet n'est établie entre la teneur en glycogène (et ou les sucres totaux) et la mortalité printanière ou estivale de *Crassostrea gigas*.



**Analyse biochimique (*protéines, lipides, glucides, glycogène*) de la chair de *C.gigas*.**



**Vision "Utilisateur" - Résultats au LCPC dans le Bassin de Marennes Oléron**

Patrick Soletchnik

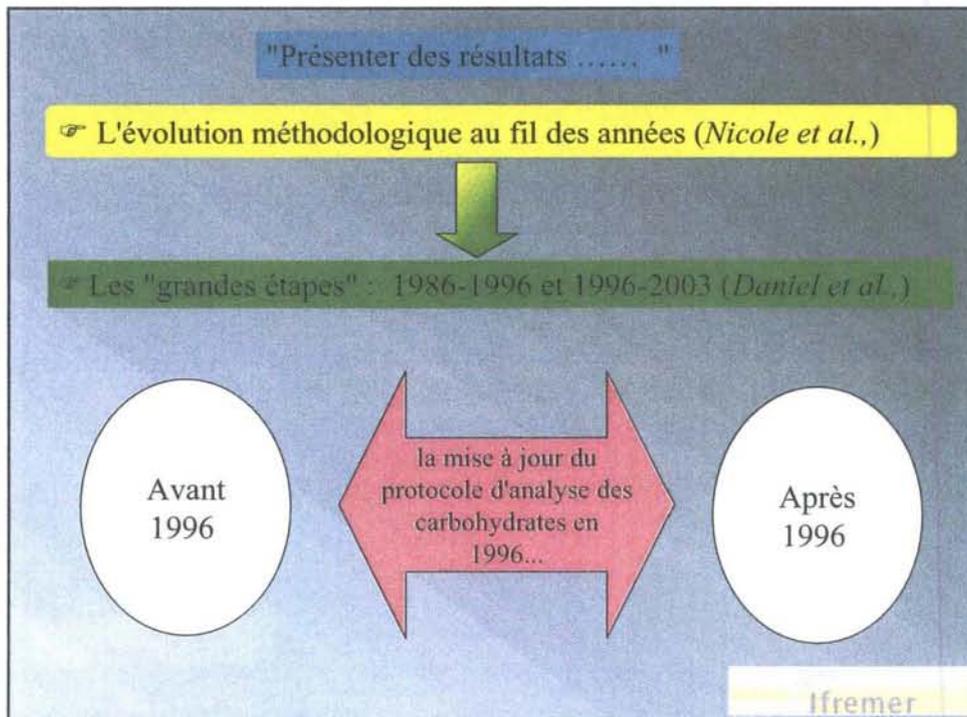
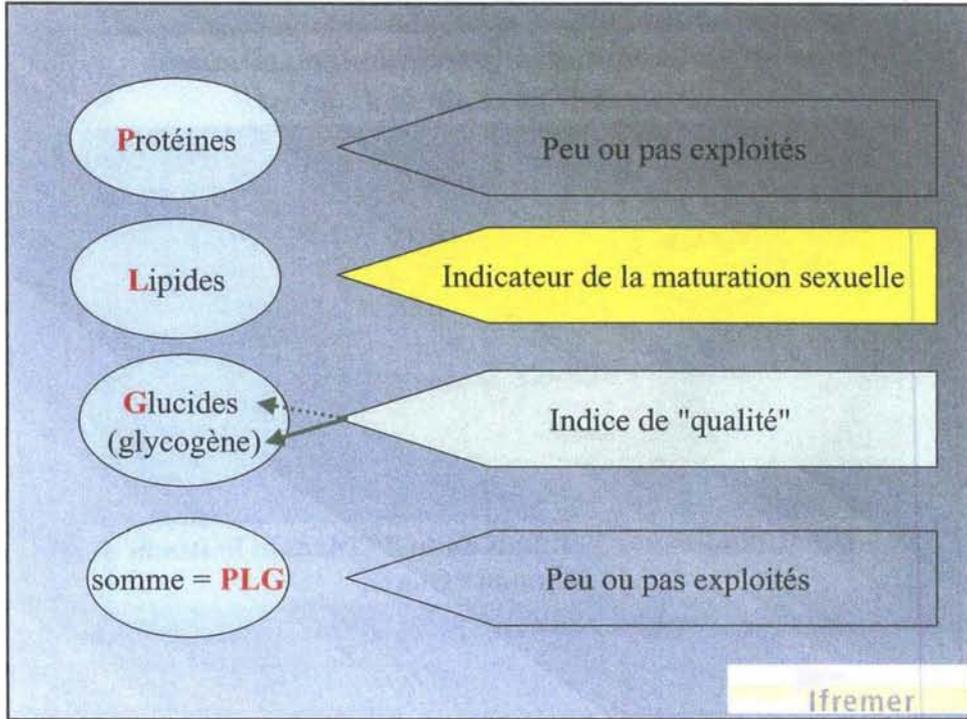
***Exemples d'utilisation des résultats d'analyses PLG au LCPC ...***

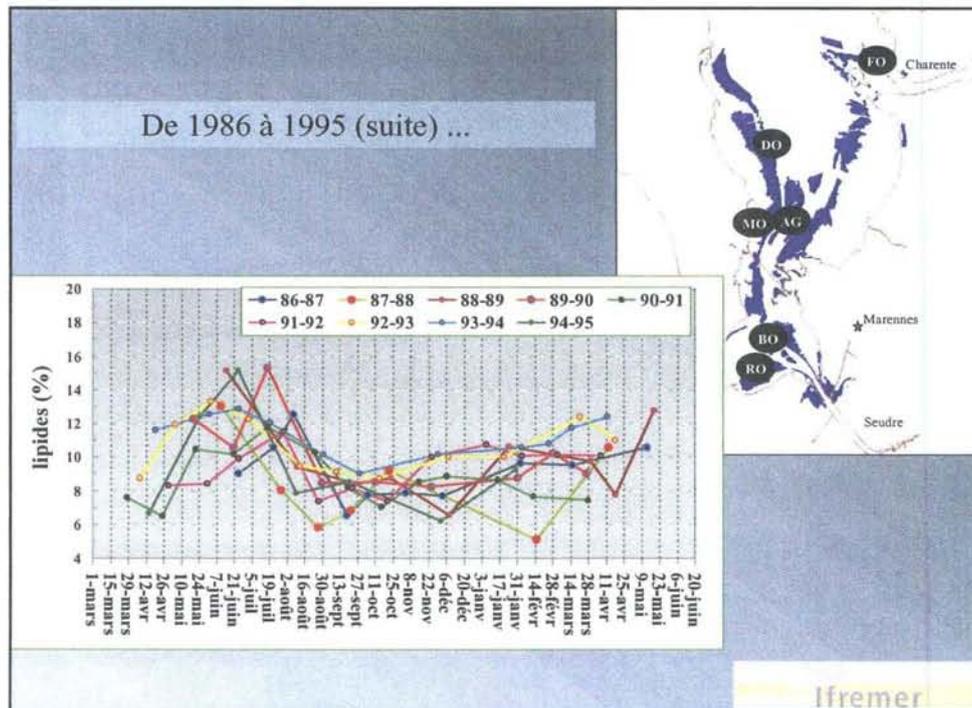
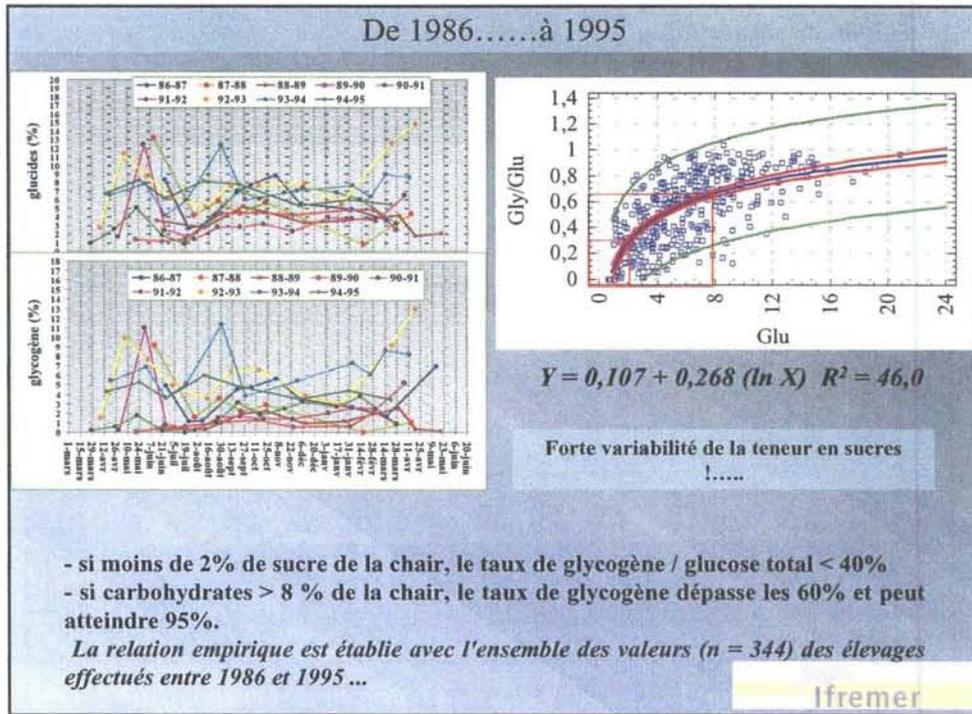
Application : essentiellement : en intra-bassin et sur du matériel biologique "issu du captage naturel"

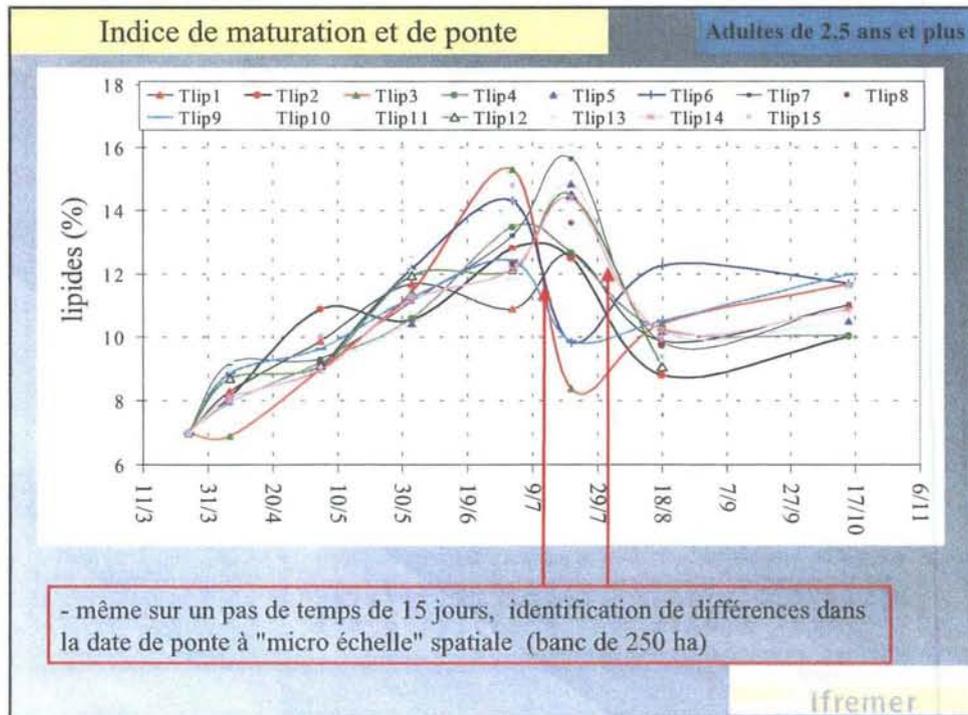
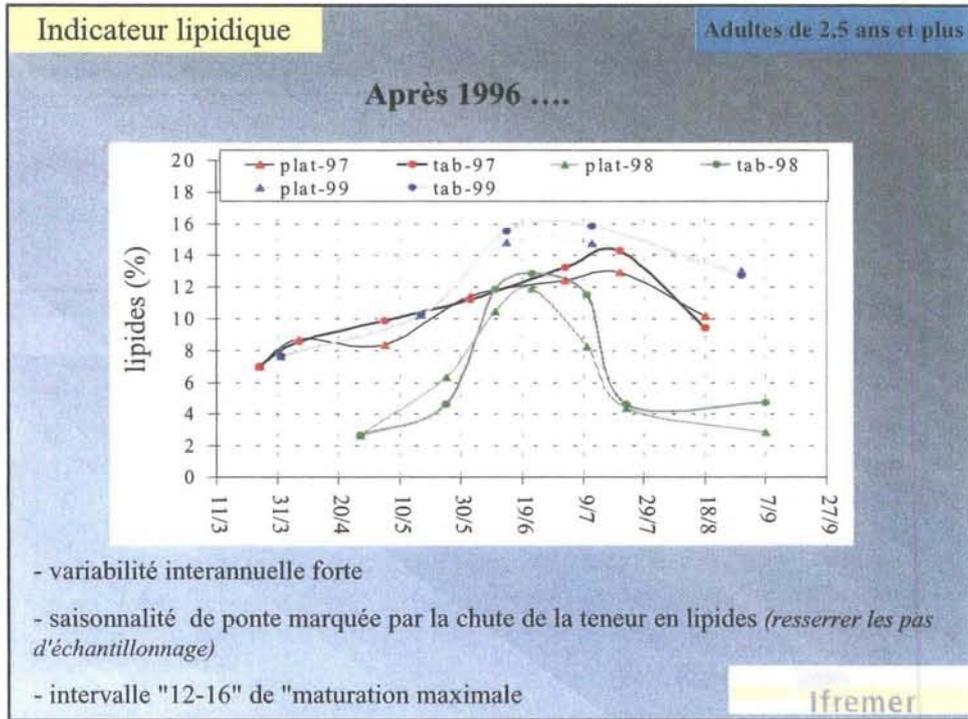
Objectifs au niveau d'un labo côtier comme le LCPC :

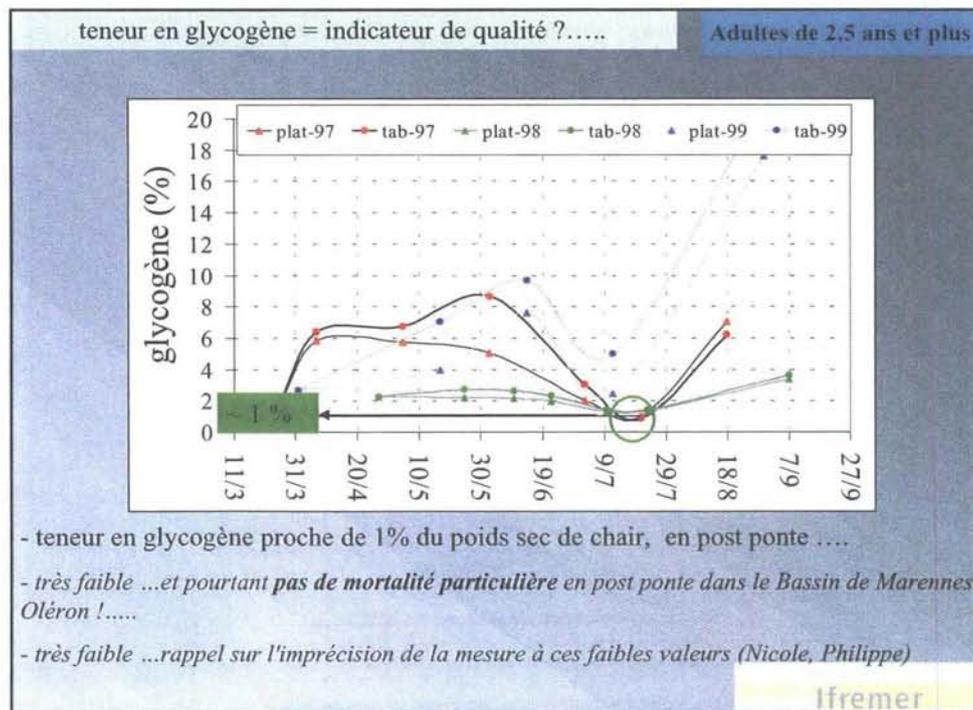
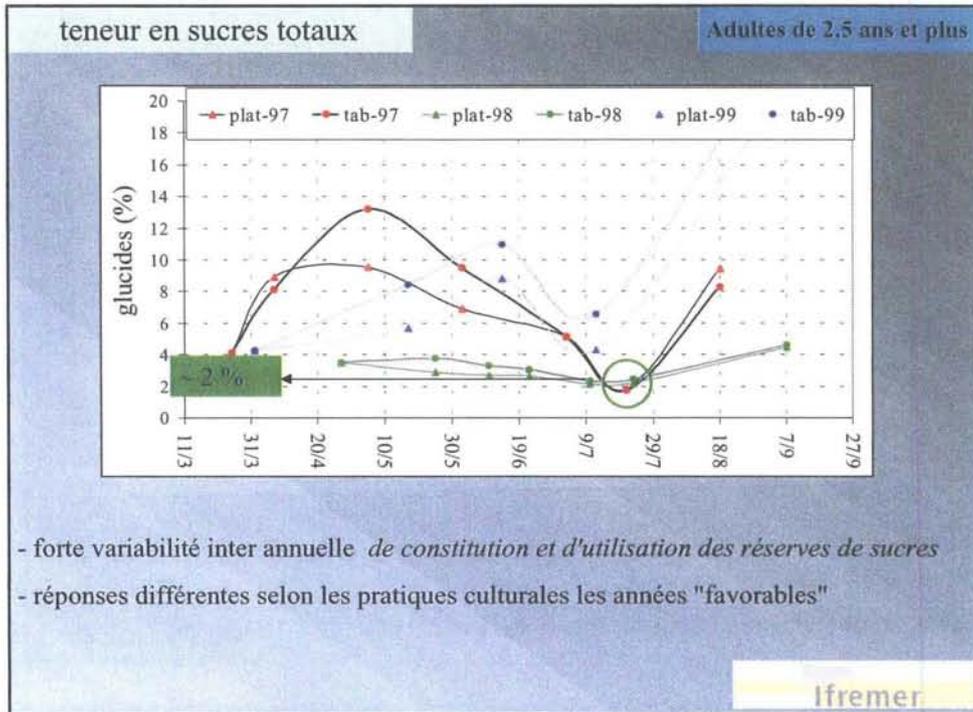
☞ Recherche d'indicateurs de qualité et d'indices de maturation

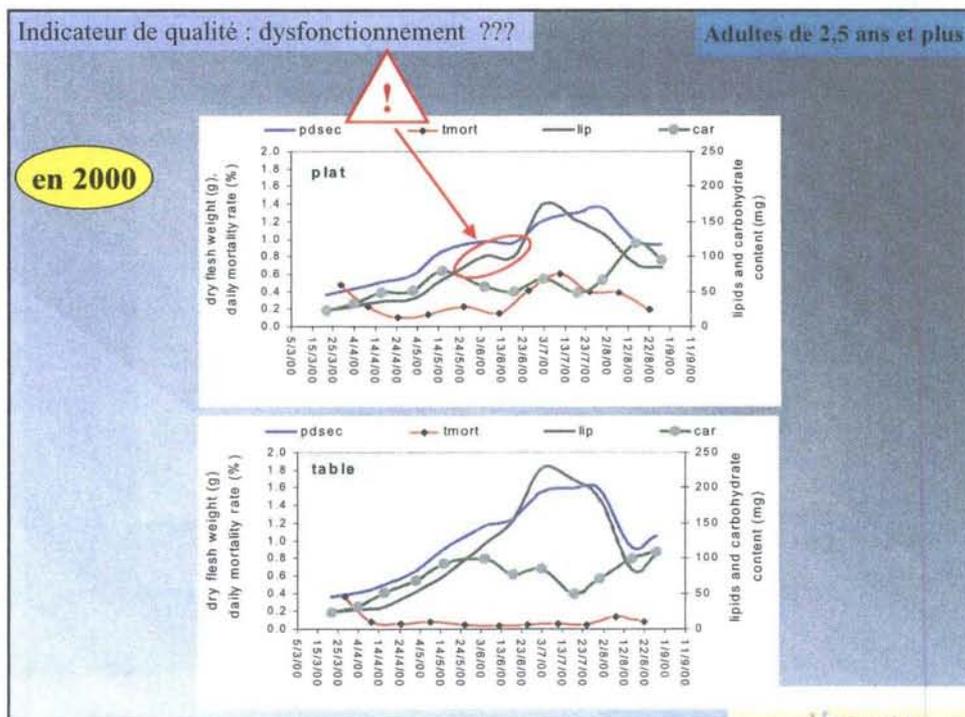
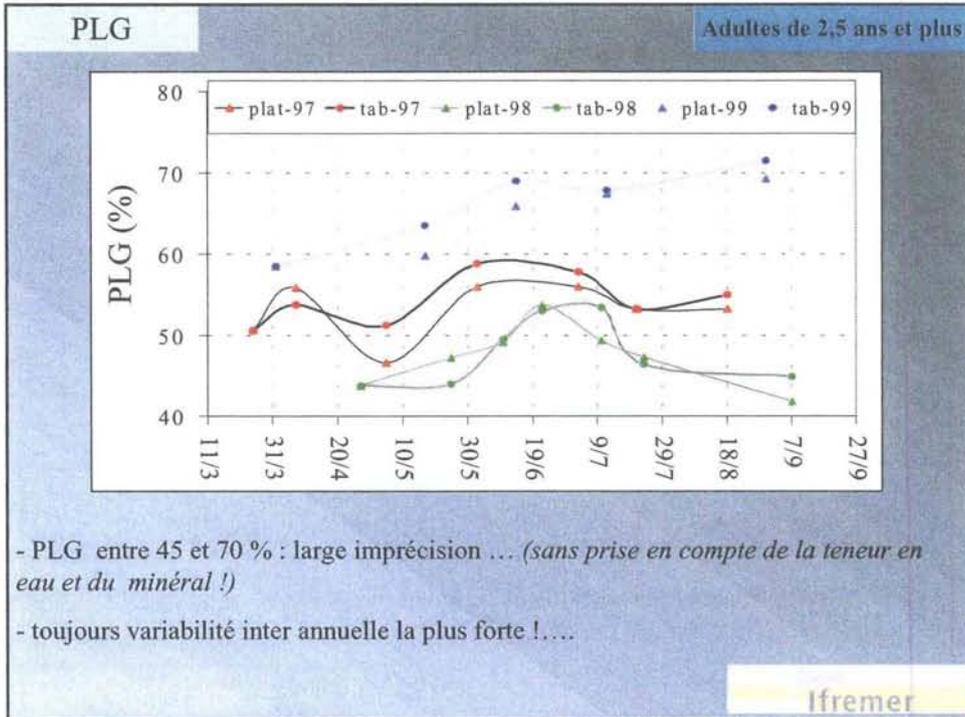
Ifremer

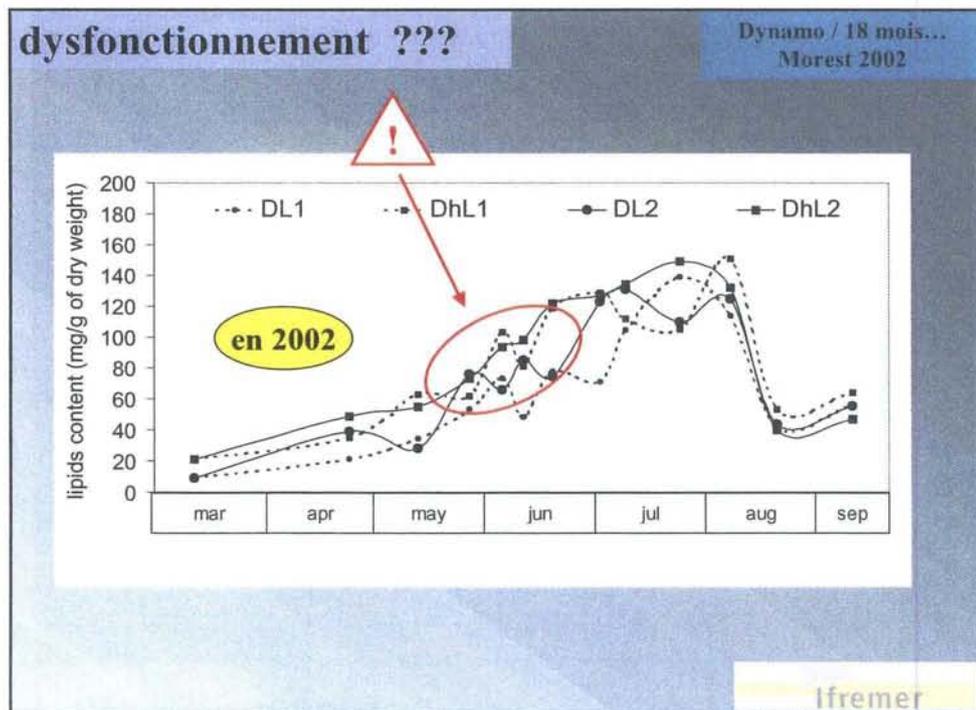
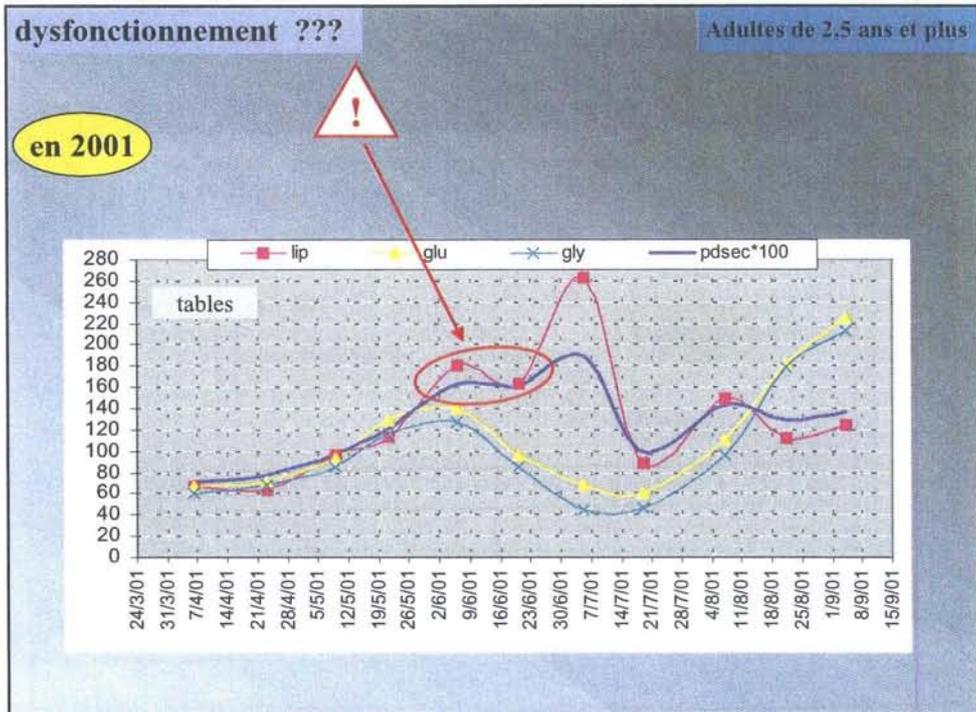


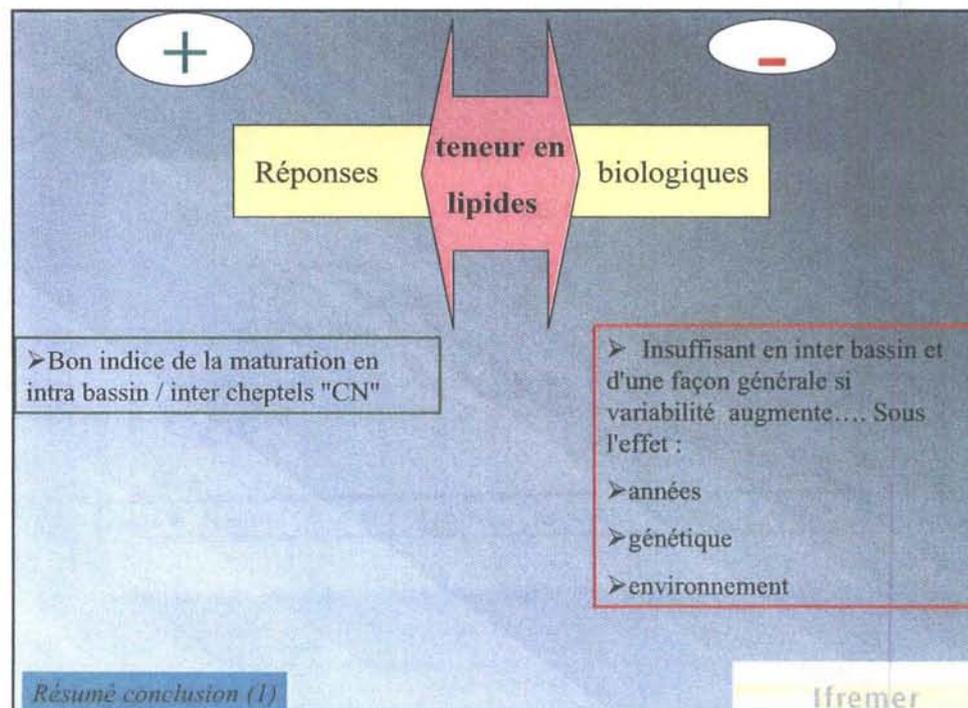
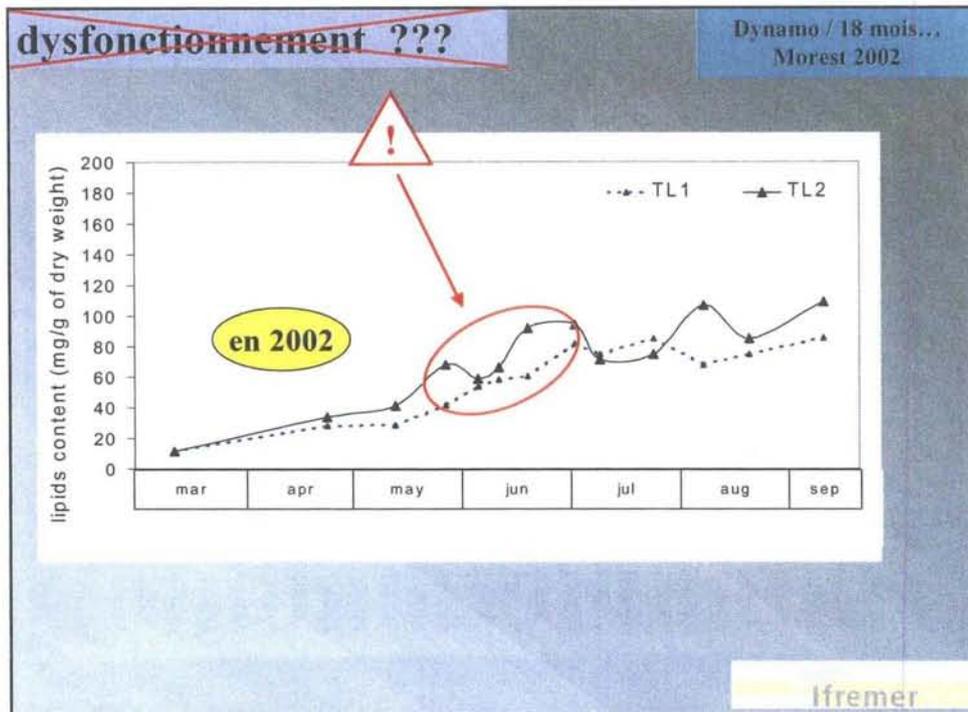


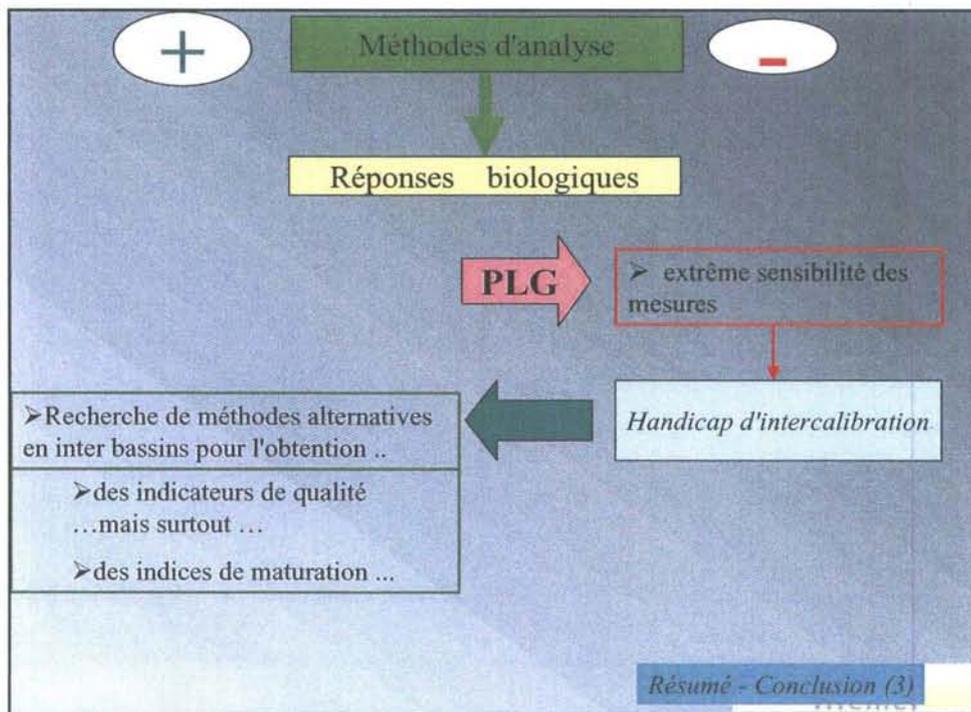
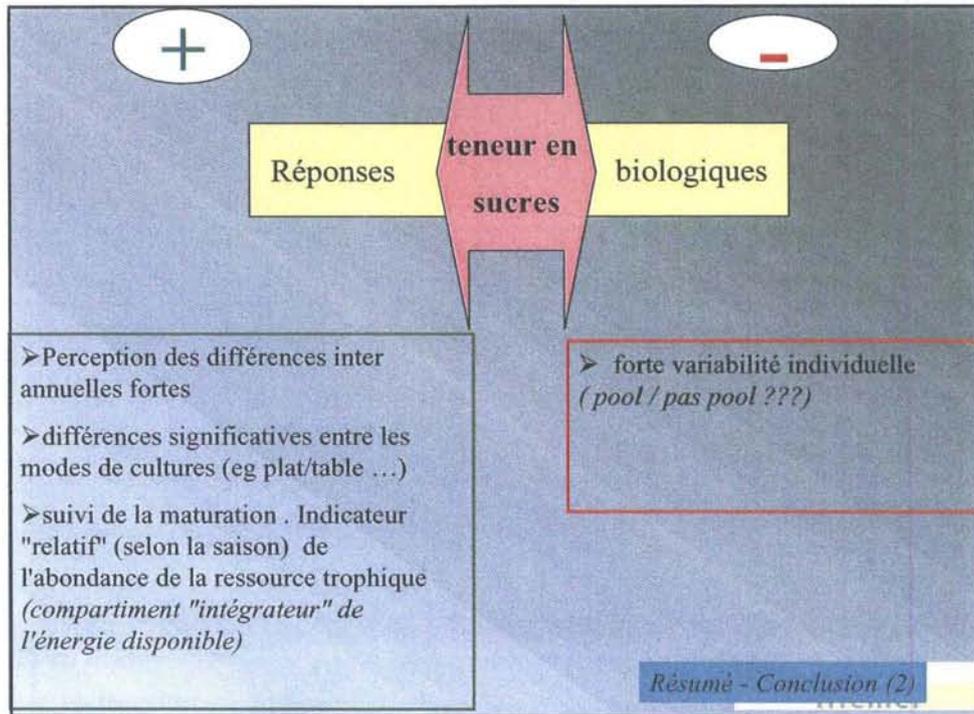












"...jeté en pâture à vos éminences grises voraces !... "

☞ Quid de pool ou pas pool ?

📖 Exploitation des données sur les protéines ?

Σ de chair expliquée par les PLG : de 40 % à 70 % ?!.....

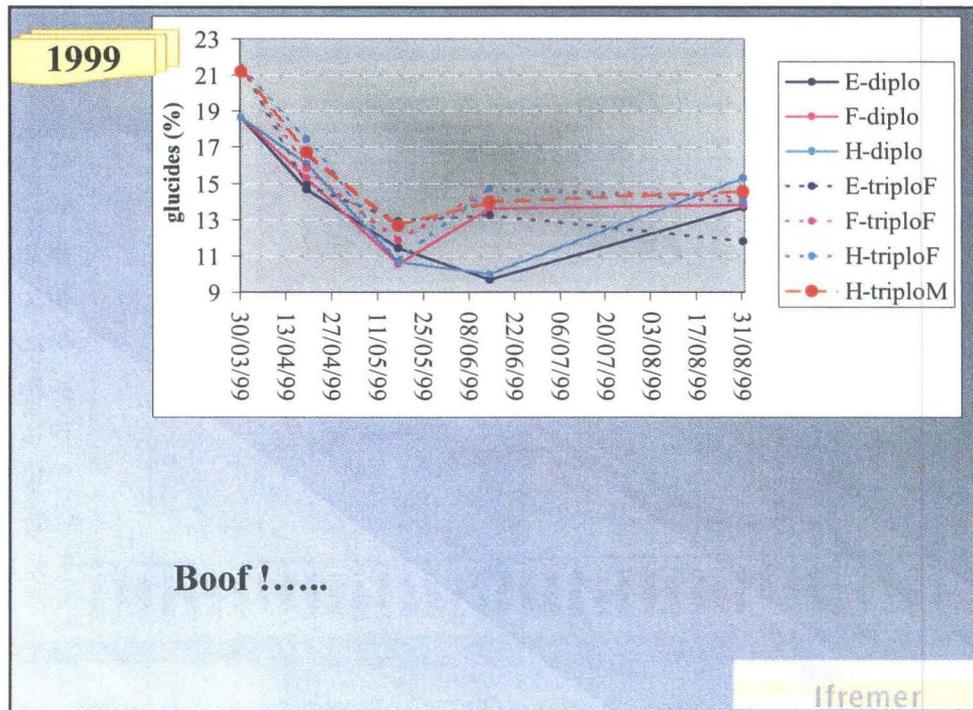
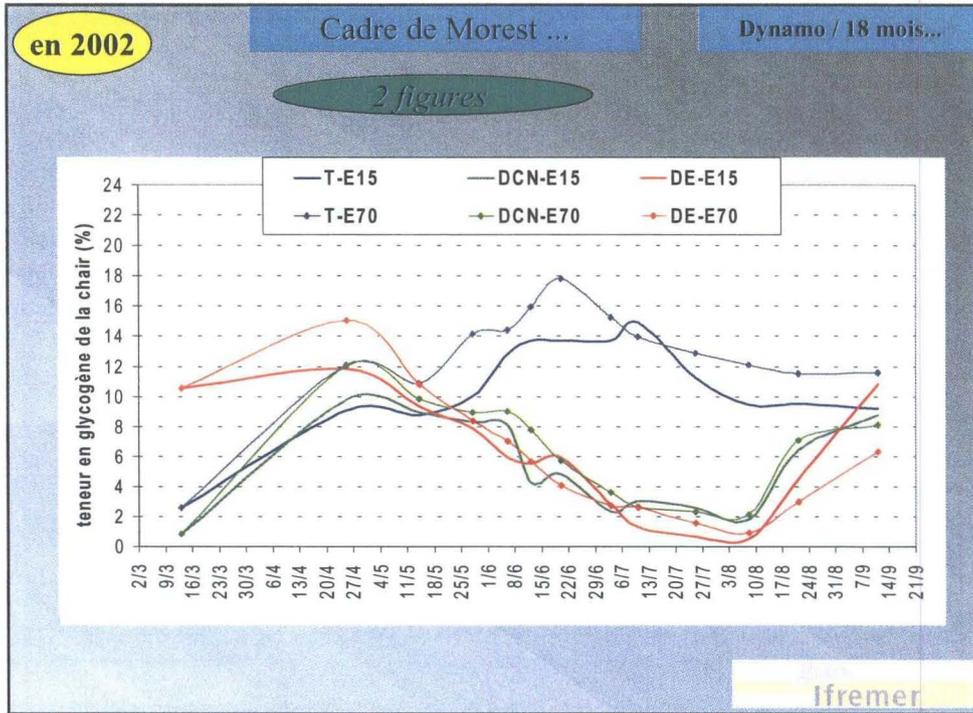
☞ Effort de valorisation justifié ?

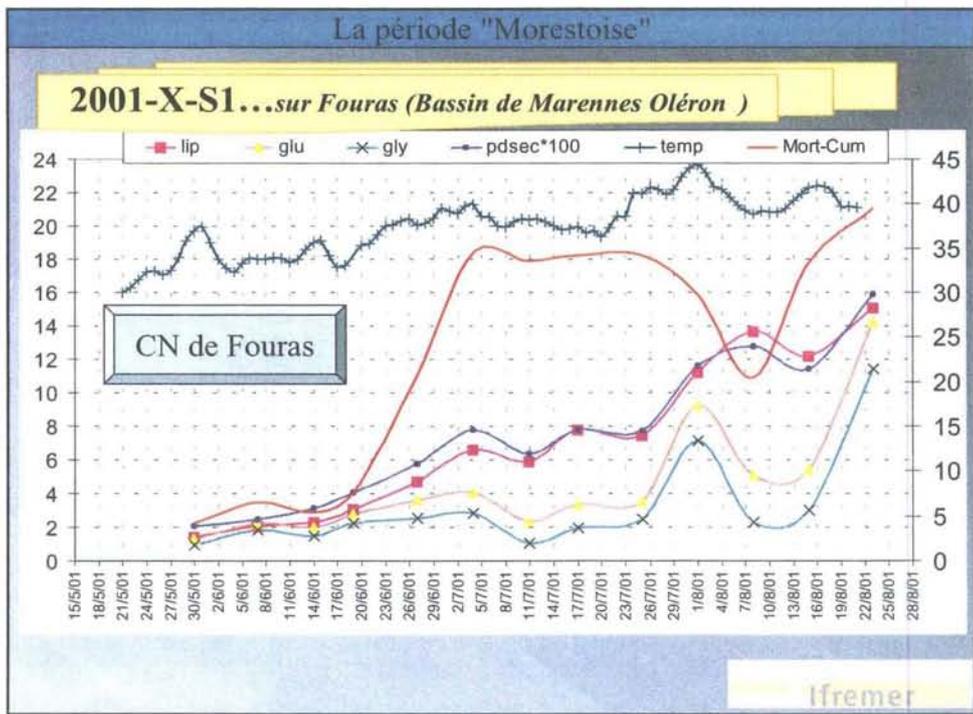
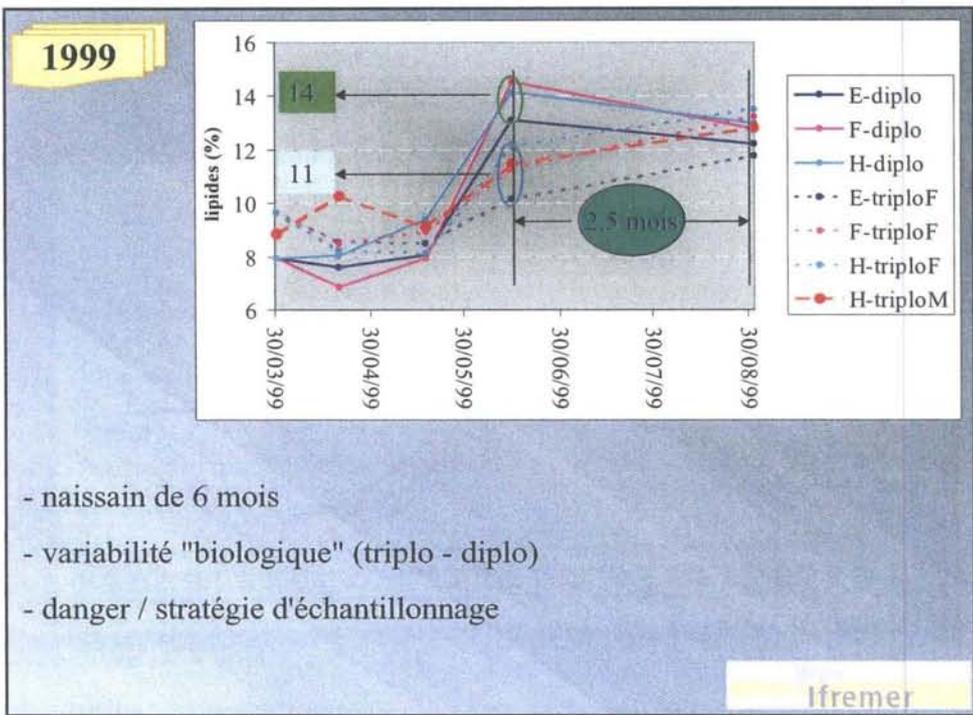
\* ... etc ... etc

Ifremer

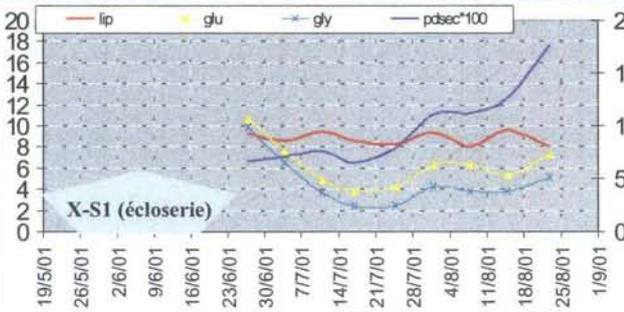
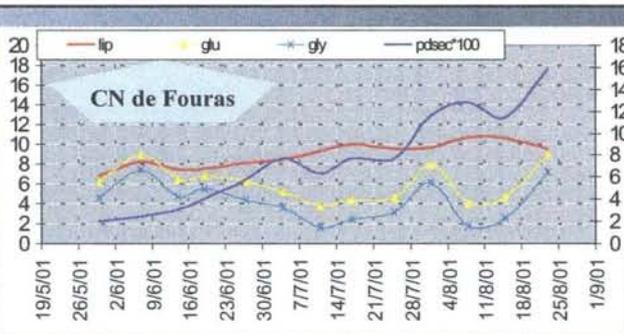
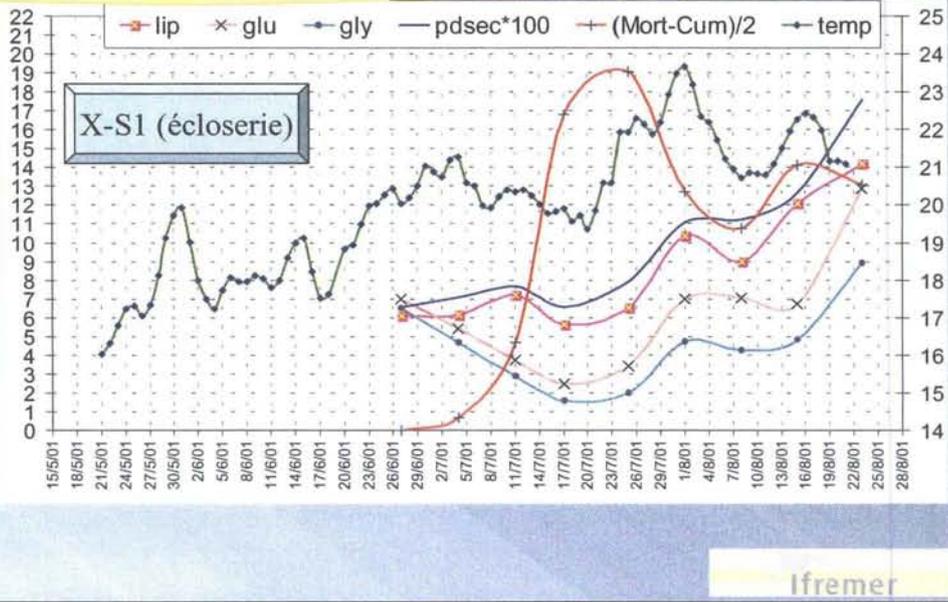
## II aire

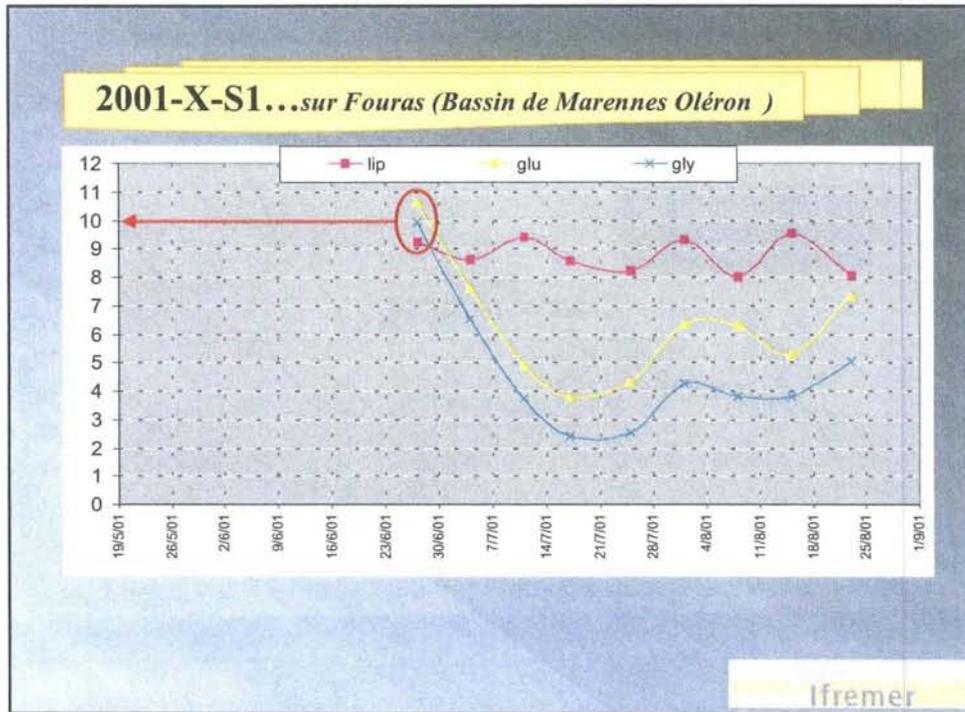
Ifremer





2001-X-S1...sur Fouras (Bassin de Marennes Oléron )





### Conclusion / Discussion

☞ pool ou pas pool : question essentielle !.....est il opportun de lisser la variabilité individuelle ? . Qu'implique réellement une telle attitude ? Les conséquences sont elles "anti scientifiques" ? (Notes techniques de l'URAPC de 1996)

☞ indice de qualité ....boof !....

☞ Comparaison inter bassins et variabilité plus grande du matériel biologique >> utiliser des indicateurs plus précis de la maturatio sexuelle

☞ Nécessité de développer un effort supplémentaire dans la valorisation ?

☞ L'évolution méthodologique au fil des années (*Nicole et al.*)

☞ Les "grandes étapes" : 1986-1996 et 1996-2003

- le réseau croissance à partir de 1986
- la mise à jour du protocole d'analyse des carbohydrates en 1996...
- Évolution méthodologique et perception de la grande sensibilité des méthodes d'analyses (*cf Nicole-Philippe*)
  - > difficulté d'obtenir des séries historiques "qualifiées"
  - > soucis dans l'intercalibration entre labos
  - > quasi impossibilité de comparer historiquement et géographiquement des résultats (niveau international)
  - > [lip] : problème récemment rencontré dans MOREST (later)...

Ifremer

☞ *présentation pas du tout exhaustive...*

☞ *analyses des données et valorisation tout à fait imparfaite et incomplète à l'heure actuelle*

☞ *quelques exemples d'application ayant donné lieu à publis*

Ifremer

#### **4. La Biochimie et la Reproduction chez les Ostréidés et Ptériidés: Mes angoisses, Mes peurs, Mes doutes**

**Stéphane Pouvreau**

Cet exposé cherchait à (1) rappeler les objectifs d'une analyse biochimique; (2) poser les problèmes et les questions qui peuvent émaner lors de l'interprétation de données biochimiques et (3) évaluer les limites de cette méthode en terme d'interprétation biologique et proposer des voies alternatives.

Les objectifs généralement liés à la réalisation d'analyse biochimique chez les mollusques marins sont les suivants : connaître la composition des aliments ou de la chair d'un organisme, en déduire des sources de nourriture potentielle, identifier les organes et les types de réserves, suivre la croissance et la gamétogenèse, cerner les phénomènes d'émission de gamètes, puis plus généralement analyser les transferts d'énergie entre l'animal et le milieu afin de paramétrer ou valider des modèles.

Le problème majeur réside dans le fait que généralement l'analyse biochimique sous-estime le contenu énergétique des tissus biologiques par rapport à des approches de type calorimétriques (parfois jusqu'à 30 % dans la chair, et encore plus dans la matière organique détritique). Donc toute approche quantitative (bilan énergétique, modélisation de croissance) à partir de données biochimiques est à éviter, tout au moins à vérifier. Par ailleurs, chez certains bivalves, la composition biochimique est fonction du sexe, et par conséquent, l'utilisation des moyennes sans discernement de la sex-ratio est non licite et peut masquer des phénomènes en terme de dynamique temporelle (suivi de gamétogenèse). Dans certains cas, un indice de condition peut donc apporter autant voir plus d'information qu'un suivi biochimique, et coûte moins cher.

Ces lacunes nécessitent donc d'évaluer d'autres méthodes (notamment RMN-IRM), et on peut aussi se poser la question suivante : quels types d'analyse sont réalisés en routine dans les laboratoires agro-alimentaire lors de l'évaluation de la composition proximale d'un aliment, que donnerait notre méthode d'analyse dans ce cas ?

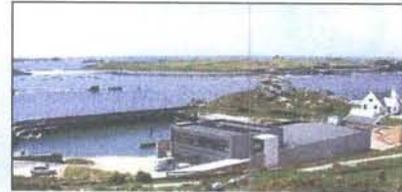
Groupe de Travail Biochimie  
- Nantes 11 mars 2003 -



## La Biochimie et la Reproduction chez les Ostréidés et Pteriidés: Mes angoisses, Mes peurs, Mes doutes

Stéphane Pouvreau

IFREMER  
UMR PE<sup>TM</sup>  
"Physiologie & Écophysiologie des  
Mollusques Marins"  
Site Expérimental d'Argenton  
Presqu'île du Vivier  
29840 Argenton en Landunvez



ifremer

## Composition biochimique et objectifs



➤ **Quels sont nos objectifs quand on fait des analyses biochimiques générales (PLG) ?**

- ❖ Connaître la composition des aliments
- ❖ Connaître la composition de la chair
- ❖ Identifier des organes et des types de réserves
- ❖ Suivre la croissance et la reproduction
- ❖ En déduire des sources de nourriture
- ❖ Analyser des transferts entre l'animal et le milieu
- ❖ Paramétriser ou valider des modèles

➤ **Il s'agit d'objectif quantitatif ou qualitatif**

ifremer



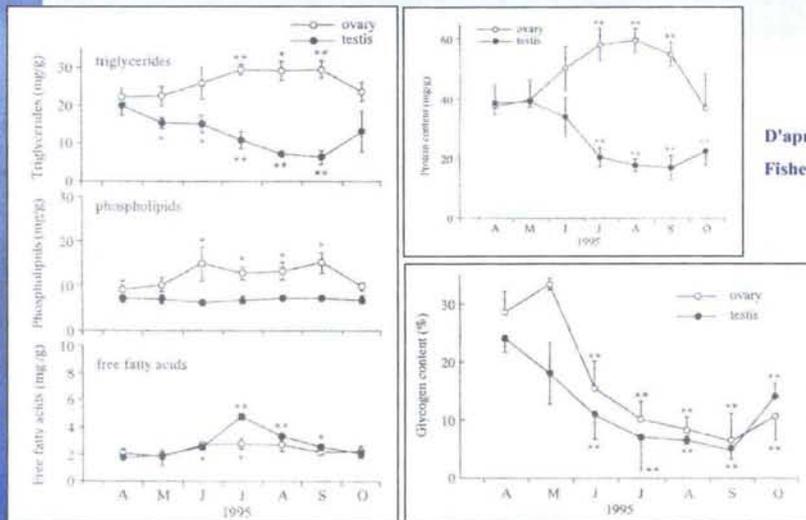
## Composition biochimique et bioénergétique

Espèce	Protein	Carbo-hydrates	Lipid	Total / PSSC	Conversion J/mg	Energy J/mg	Perte	Remarques	Auteurs
<i>C. gigas</i>	17	29	13	59	14			Gonade hors repro	Li et al. 2000
	27	23	21	71	19			Gonade femelle	
	9	23	7	39	9			Gonade mâle	
	53	6	11	70	18	20	10-30 %		Heral & Deslous-Paoli, 1983
	7	31	12	49	11			Huître entière	Whyte et al. 1990
	55	7	8	69	17		15%		Deslous-Paoli & Herat, 1988
<i>P. margaritifera</i>	55	6	8	69	17	21	20%	Huître entière	Pouvreau et al. 1999
<i>C. fornicata</i>	42	21	5	68	15	22	31%	Chair entière	Deslous-Paoli & Herat, 1986

- Sous-estimation jusqu'à 30 % de matière, confirmée par les approches calorimétriques
- Pourquoi ?, c'est quoi ces 30 % ?



## Composition biochimique et sexe



D'après Li et al., (2000)  
Fisheries science, 66: 502-508

- Biochimie = Fonction du sexe ?
- Si oui, attention à l'utilisation des moyennes sans discernement du sex-ratio
- NRJ M < NRJ F donc pbs en terme de besoin et de croissance ?

## Composition biochimique et MOP

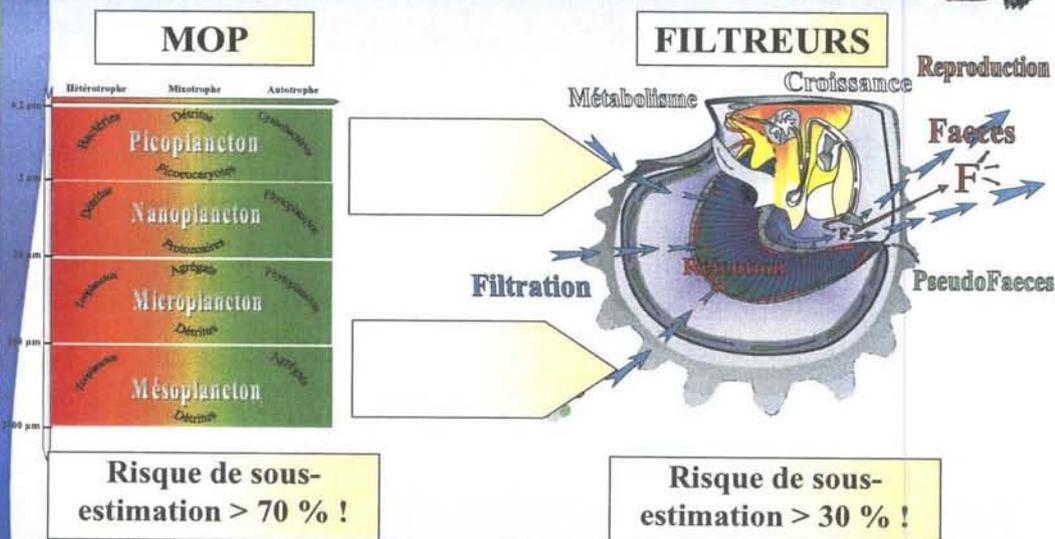


Type	Protein	Carbo-hydrates	Lipid	Total / MOP	Remarques	Auteurs
MOP Subartic bay	43	8	5	56	Bloom	Navarro et Thompson (1995)
	13	1	3	17	Hors Bloom	
MOP Tropical Lagon	9	6	7	22	Annuel	Pouvreau et al. (1999)
MOP Temperate bay	10	4	6	20	Annuel	Deslou-Paoli & Heral (1984)

Ifremer

- Sous-estimation très élevée de la MOP jusqu'à 80 %
- Pourquoi ?
- Quid de la représentativité de cette mesure ?

## Composition biochimique et modélisation



Ifremer

- Impossibilité d'utiliser les PLG, comme unité de base en modélisation

## Composition biochimique et diversité des méthodes\*



Ifremer

	Colorimétrie ou Spectrophotométrie	Fluorimétrie ou Chromatographie	Gravimétrie	Autres	Étalonnage
<b>Protéines</b>				Kjeldahl	
Solubles	Lowry (1951)			5.8 x PON 6.25 x PON	Albumine
Insolubles	Stevenson & Cheng (1970)	Stein et al. (1972)			Leucine
<b>Lipides</b>	Marsh & Weinstein (1966)	Folch et al. (1957)	Bligh & Dyer (1959)	Soxhlett Suzuki et al. (1992)	Acide palmitique
<b>Glucides</b>	Dubois (1956) Horikoshi (1958)				Glucose

\* 8000 réf ASFA

\* Méthode IFREMER

# Gerlinéa

LA DIÉTÉTIQUE MINCEUR

## 12 BARRES DE RÉGIME HYPERPROTÉINÉES

**BARRES**  
• SAVEUR •  
**CHOCOLATS**  
NOIR & BLANC

- 23% de l'énergie en protéines
- Riches en vitamines B1, B6, B9, PP et E
- Source naturelle de calcium

LABORE PAC

### ÉQUILIBRE NUTRITIONNEL

Les Barres Hyperprotéinées Gerlinéa sont conçues pour garantir un **équilibre optimum** tout en permettant un **faible apport calorique**.

MACRO-NUTRIMENTS		
	100 g	2 Barres de 31 g
Valeur énergétique	395 kcal <b>1658 kJ</b>	245 kcal 1028 kJ
Protéines	22,9 g	14,2 g
Glucides dont	45,6 g	28,3 g
• Sucres	32,8 g	20,3 g
• Polyols	4 g	2,5 g
Lipides dont	14,1 g	8,7 g
• Insaturés	7,8 g	4,8 g
	6,9 g	4,3 g

\* 1883 kJ d'après Brody

Ifremer

**PLG : un Paramètre pour suivre la reproduction dans tous les cas**

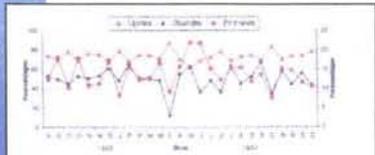


Figure 13. Teneur en sperm, protéines et glycogène dans l'ensemble gonade/glande digestive chez *Pectunculus pica* pour le site d'Anse du Pôl en 1996-1997.

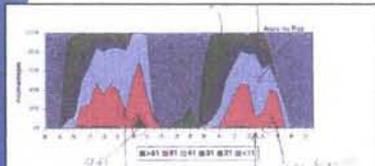


Figure 8. Evolution des pourcentages de sperm et protéines dans l'ensemble gonade/glande digestive chez *Pectunculus pica* pour le site de l'Anse du Pôl (Rade de Brest - Finistère), de mars 1996 à mars 1997.

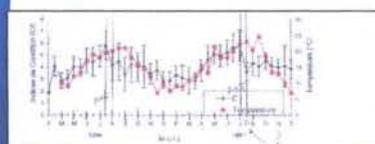


Figure 6. Variations saisonnières de la température du pied et du trophisme de condition d'un site *Pectunculus pica* pour le site de l'Anse du Pôl (Rade de Brest - Finistère), pendant le période de Mars 1996 à Mars 1997.

PLG (ensemble gonade/glande digestive),  
mais tout sexe confondu pour une sex-ratio de 60 %F et 40 % M.

Mouais.....

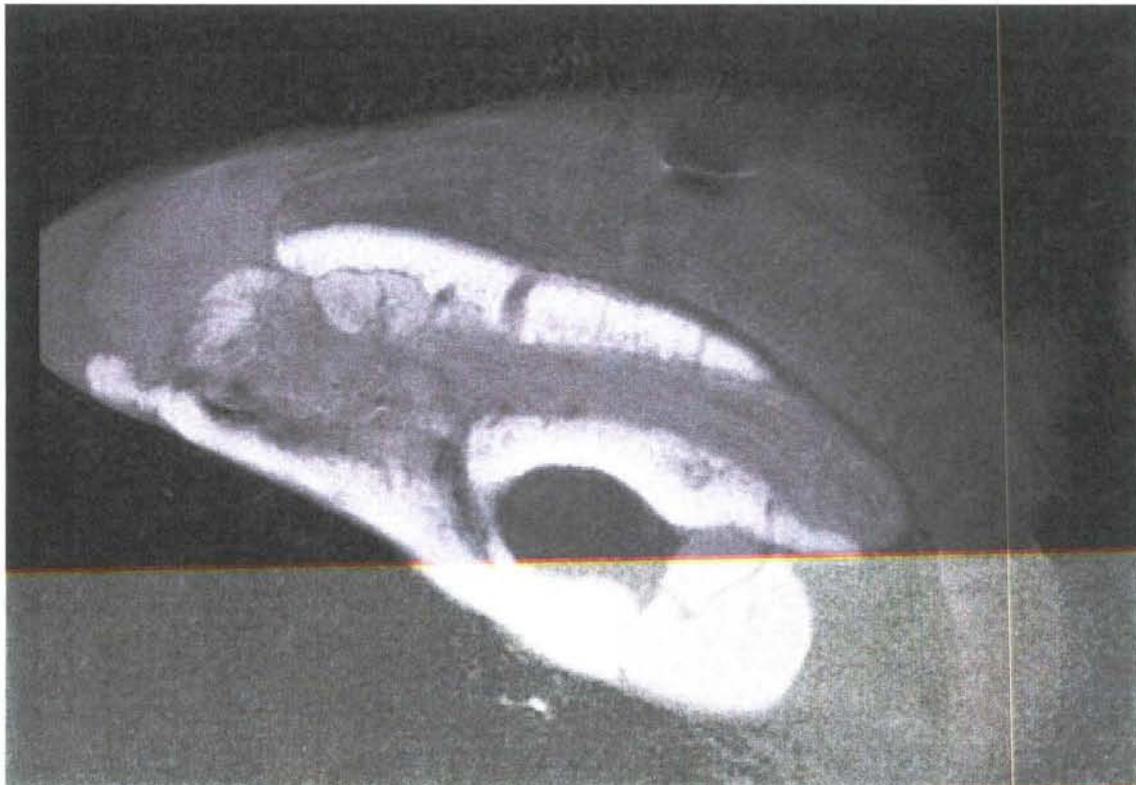
Histologie  
(composition ovocytaire)

C'est beau, mais c'est que pour les femelles

Un bête indice de condition,

C'est pas dément, c'est plus riche que les PLG, dans ce cas présent.

D'après Lango-Reynoso, (1999)  
Thèse Univ. Brest.



**5. Les « grands principes » avant d'entreprendre les dosages**  
**Jeanne Moal**



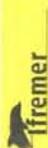
**Ifremer**

**Département Ressources Aquacoles**  
DRV/RST/RA/LCPC/ 2003-49

sept 2003

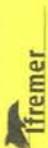
## **Grands principes autour d'un dosage quantitatif**

J.Moal, J.R.Le Coz, C.Quéré  
Laboratoire de Physiologie et Ecophysiologie des  
Mollusques marins, IFREMER, Brest



## **Grands principes autour d'un dosage quantitatif**

- Conservation
- Homogénéisation
- Extraction
- Dosage



## Conservation

- Stabilité de la molécule à doser
- Organe entier/broyat : présence enzymes
- Influence de la préparation de l'échantillon
  - Lyophilisation sur l' extraction lipides (Dunstan et al 93)

	Total lipid	TG	
	% poids humide	mg/g poids humide	
Frais	1,7	5,9	broyat lyophilisé
Lyophilisé	1,3	3,1	
rehydraté	1,6	5,4	
Frais	2,1	11,3	huitre entière lyophilisée
Lyophilisé	1,2	0,9	



## Homogénéisation

- Représentativité de l'aliquot/échantillon

Homogénéiser des grandes quantités

Huître entière ou pool d'huîtres

Hétérogénéité de consistance des tissus



## Extraction

❑ **Importance de Poids échantillon/volume extractant**

❑ **Complexité des molécules**

- Cytosoliques
- Tissulaires

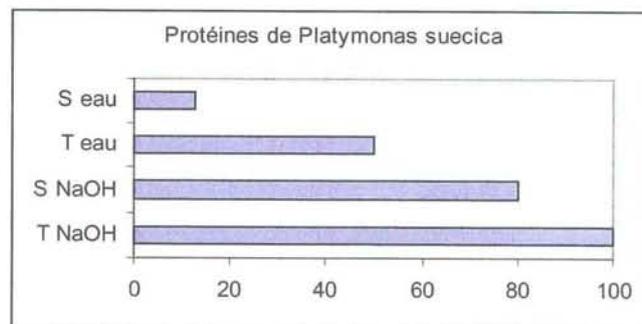
⇒ Variabilité du % explicatif de PLG dans MO au cours d'un cycle saisonnier

ifremer

## Extraction

❑ **Solubilité des molécules**

- Ex protéines dans eau, dans soude
- Sucres dans eau, acide



ifremer

## Dosage

### ☐ Choix de la méthode

- Simplicité, faisabilité (appareillage)
- Spécificité ( $\pm$ purification)
- Linéarité ou proportionnalité
- Sensibilité
- Reproductibilité
- Gamme de mesure
- Robustesse (stabilité de la réaction)

## Étalonnage

• Choix de étalon: le plus proche ou représentatif des molécules à doser

• Protéines : coefficient d'extinction  $\pm$  similaire entre protéines, selon le dosage

• Lipides en CCM



## 6. Discussion 1 : généralités

Les analyses classiques de Protéines (Lowry *et al.*, 1951), de Lipides (Marsh et Weinstein, 1966), de Glucides (Dubois *et al.*, 1956) semblent jusqu'alors être systématiquement programmées dans les études menées par les laboratoires conchylicoles. Or, il apparaît souvent que les objectifs devraient être mieux précisés avant les expérimentations. Une habitude s'est installée d'utiliser les méthodes à disposition vraisemblablement en raison de leur relative simplicité.

Les lipides sont utilisés pour estimer la période de ponte mais ne sont pas adaptés pour évaluer l'effort de reproduction. Les glucides permettent d'évaluer l'état des réserves ; c'est un critère de qualité de l'animal. Les résultats des dosages de protéines sont peu exploités.

Il apparaît important d'être vigilant dans la manière de présenter les résultats qui seront soit qualitatifs (%) soit quantitatifs (en mg par équivalent animal). Ces deux manières d'exprimer les résultats de dosage ne relatent pas les mêmes informations. Les deux présentations paraissent complémentaires. A ce propos, il est rappelé que si l'on fait de la bioénergétique, le résultat est exprimé en joules. Les personnes ayant pratiqué la méthode calorimétrique soulignent que cette méthode était très efficace pour apprécier l'énergie. La traduction des PLG en joules n'est pas satisfaisante.

L'étude réalisée par une équipe japonaise concernant les différences de composition biochimique des animaux selon leur sexe pendant la période de maturation interpelle les participants (Li *et al.*, 2000). Actuellement les analyses sont réalisées sur des pools de plusieurs animaux (une dizaine). La variabilité individuelle est noyée. L'information est ainsi lissée. L'étude montre une plus grande variabilité selon le sexe pour les concentrations en protéines alors que dans nos études le taux de protéines est celui qui subit le moins de variation !.

Actuellement, nous ne connaissons pas la composition exacte de la chair des coquillages. Une partie des constituants n'est pas extraite par les méthodes utilisées. Il était couramment admis que la part d'inconnu représentait environ 30% (total protéines, lipides, glucides et cendres de l'ordre de 70%). Jeanne Moal précise qu'à certaine période de l'année le pourcentage de matière expliquée peut atteindre 90%. Il faut alors en tenir compte dans les interprétations des résultats. En effet, au cours de l'année, les constituants ne se situent pas dans les mêmes compartiments dans l'animal. Lorsque les constituants sont cytosoliques, ils sont très solubles et donc plus facilement extractibles. Lorsqu'ils sont tissulaires, liés au tissu conjonctif, l'extraction devient plus délicate (animal maigre).

En conséquence, si l'extraction est dépendante de la saison il devient difficile d'interpréter correctement le résultat.

Les méthodes utilisées sont fortement critiquables, pourquoi ne sommes nous pas capables de donner la composition des produits que nous analysons (chair et matière organique particulaire) alors que le secteur Agroalimentaire y parvient ? Il est utilisé des méthodes normalisées AFNOR. L'azote totale est dosée par la méthode de Kjeldall.

Pourquoi ne pas envisager la sous traitance ? Le laboratoire de la Trinité ne fait plus d'analyse de PLG. L'analyse des protéines a été abandonnée depuis longtemps. Ce laboratoire soustraite au laboratoire municipal de Brest. Cependant le coût est élevé.

Pour information, les dosages réalisés par CoopAgri Bretagne (Laboratoire Central, 29206 Landerneau) coûtent 13 euros pour les protéines et 16 euros pour les glucides. Il serait intéressant d'évaluer le coût des analyses réalisées par les laboratoires côtiers conchylicoles en incluant bien sur le temps agent.

Les représentants du département VP analysent la chair de poisson. Thierry Sérot précise que la méthode de Lowry n'est pas une bonne méthode pour doser les protéines. La méthode de Kjeldall est idéale car elle dose les protéines totales. Il faut cependant veiller à utiliser le bon coefficient de conversion spécifique à chaque produit. Cette méthode présente l'inconvénient d'être lourde à mettre en œuvre. Le nombre d'analyses réalisées par jour est faible (12/jour). Mais ne vaut-il pas en faire moins mais mieux ?

A VP, le dosage des lipides se faisait par la méthode de Folch *et al.*, (1957). Elle a été remplacée par la RMN (Toussaint *et al.*, 2001). Le choix de la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) a été justifié par soucis de Santé Publique. En effet, les solvants pour extraire les lipides sont dangereux. De plus le chloroforme est désormais interdit dans les laboratoires. Il y a également des interférences possibles dans les dosages par la méthode de Marsh et Weinstein. La RMN est simple à mettre en œuvre, le coût d'utilisation est faible. L'appareil coûte de l'ordre de 46 000 euros. Les corrélations établies avec les méthodes chimiques sont satisfaisantes.

-----

La seconde partie de la table ronde est orientée vers l'aspect technique des méthodes.

## 7. Répétabilité, Reproductibilité des Protéines, Lipides, Glucides Nicole Faury & Philippe Geairon

Depuis l'introduction des méthodes d'analyses biochimiques au sein des laboratoires conchylicoles, aucune mesure de la précision n'a été faite. Lors d'une analyse biochimique, les résultats peuvent être faussés par certaines erreurs : erreurs grossières (dues au non-respect du protocole expérimental...), aléatoires (dues à l'imprécision d'une mesure à cause des incertitudes des appareils...) ou systématiques (dues au dérèglement d'un appareil...). La mesure est alors peu précise et l'interprétation n'a donc que peu d'intérêt.

Des expérimentations menées au LCPC ont visé à évaluer la répétabilité et la reproductibilité des méthodes utilisées.

La répétabilité a été évaluée à trois reprises à quinze jours d'intervalle. La reproductibilité a été déduite des résultats issus des expériences de répétabilité. Cette étude a concerné les dosages de lipides, protéines, glucides et glycogène. Les échantillons provenaient d'expérimentations réalisées antérieurement dans le cadre des études menées par le LCPC. Trois concentrations ont été choisies permettant de couvrir les concentrations faibles, moyennes et fortes rencontrées à Marennes Oléron. Trois manipulateurs ont procédé à la réalisation des dosages avec les mêmes échantillons, les mêmes pipettes, les mêmes réactifs et le même matériel. Ainsi, les erreurs éventuelles ont été imputables à la méthode ou au manipulateur.

La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées par le coefficient de variation (CV). Pour un  $CV < 5\%$ , l'erreur est négligeable, pour un CV compris entre 5 et 10 % l'erreur est acceptable, pour un CV supérieur à 10 % l'erreur est inacceptable.

Les méthodes de dosage des lipides et glucides totaux sont répétables. Le dosage de glycogène est peu répétable pour les faibles concentrations ( $< 5\%$ ). Le dosage des protéines est répétable pour deux manipulateurs. Le manipulateur a une incidence sur le résultat.

Les méthodes de glucides et de lipides sont reproductibles. L'analyse du glycogène est reproductible pour un manipulateur mais douteuse pour les deux autres. Le dosage des protéines n'est pas reproductible.

Il n'est pas permis de fractionner en plusieurs séries une même campagne d'échantillonnage lorsqu'une méthode n'est pas reproductible. De plus la comparaison de plusieurs séries d'échantillonnage est interdite.

Il convient à l'issue de ces expériences d'identifier les déviations et de tester une nouvelle méthode de dosage des protéines.

## **REPETABILITE REPRODUCTIBILITE des méthodes de dosage PLG**

Protéines : *Lowry et al, 1951*

Lipides : *Marsh et Weinstein, 1966*

Glucides : *Dubois et al, 1956*

**Philippe Geairon, Nicole Faury, Gaëlle Bertrand  
LCPC, IFREMER, La Tremblade**

## **L'ANALYSE BIOCHIMIQUE**

**Broyage**

**Pesée**

**Extraction et Prises d'Essai**

**Ajout de Réactifs**

**Gamme étalon**

**Répartition Lecture (microplaque)**

## DEFINITIONS

- PRECISION :** Qualité de l'accord entre des mesures répétées sur un échantillon considéré.
- REPETABILITE :** Précision de la méthode au sein d'une même série de dosage effectuée avec les mêmes réactifs, les mêmes appareils, le même manipulateur et le même jour.
- REPRODUCTIBILITE :** Précision de la méthode lorsque la technique est réalisée sur le même échantillon dans des conditions différentes, manipulateurs différents, jour différent, réactifs...

## COEFFICIENT DE VARIATION

$$CV = \sigma / \text{moyenne} * 100$$

$CV < 5\%$  = erreur est négligeable

$5\% < CV < 10\%$  = erreur est acceptable

$CV > 10\%$  = erreur est inacceptable

**3 Manipulateurs utilisent :**

**Les mêmes échantillons**

**Les mêmes Réactifs**

**Les mêmes Pipettes**

**Le même Matériel**

**Ainsi**

**Les erreurs éventuelles seront imputables  
à l'individu**

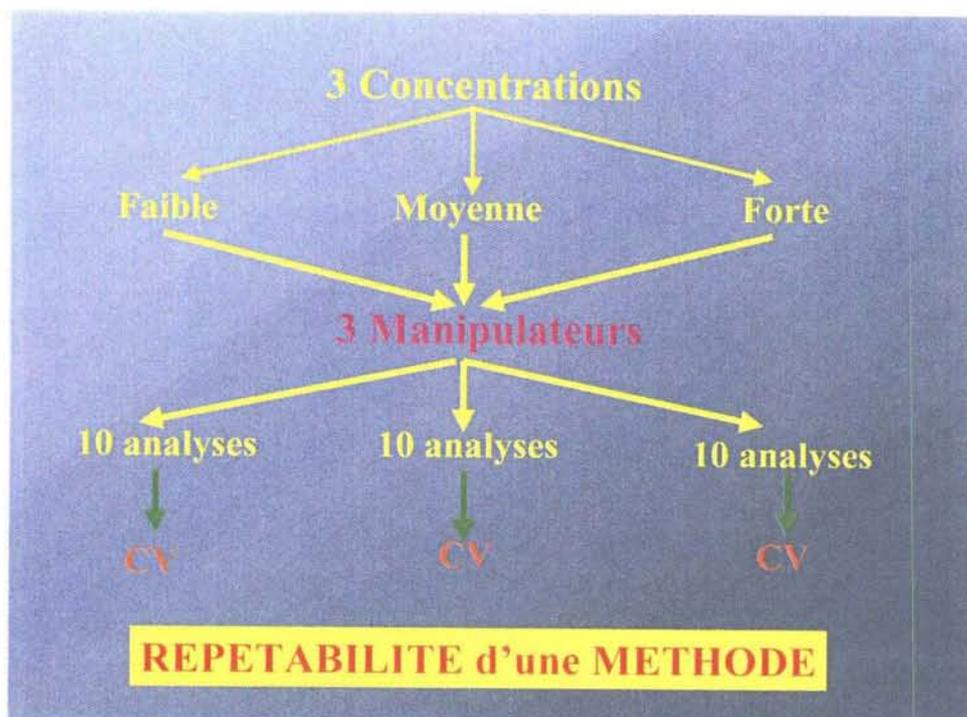
**ou**

**à la méthode**

**Tester 3 fois la Répétabilité :**  
**à 15 jours d'intervalle**  
**Réactifs et Gammes-étalon renouvelés**



**Déduit la Reproductibilité**



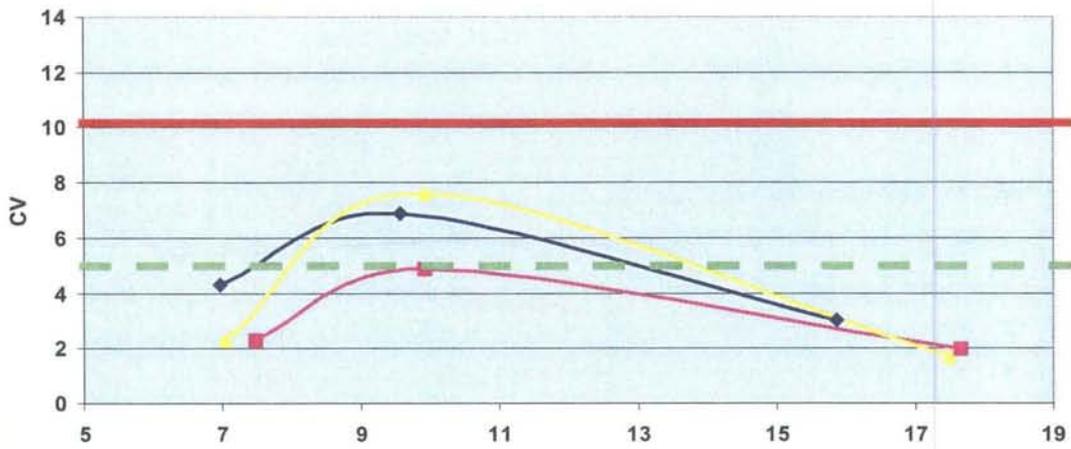
## PROTEINES LIPIDES GLUCIDES

Protéines :    22,9 %  
                   43,4 %  
                   51,7 %

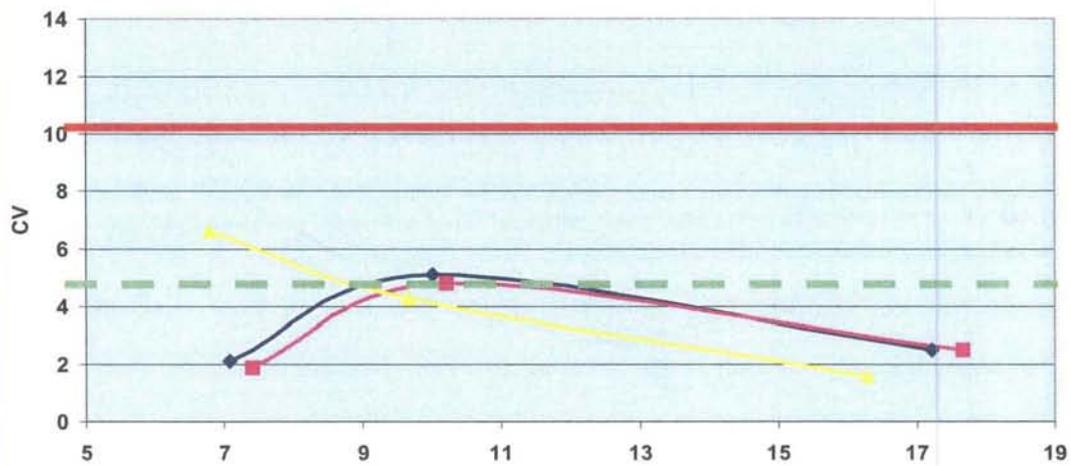
Lipides :      6,4 %  
                   9,4 %  
                   18,5 %

Glucides/Glycogène :  
                   2,5 %  
                   9,0 %  
                   23,1 %

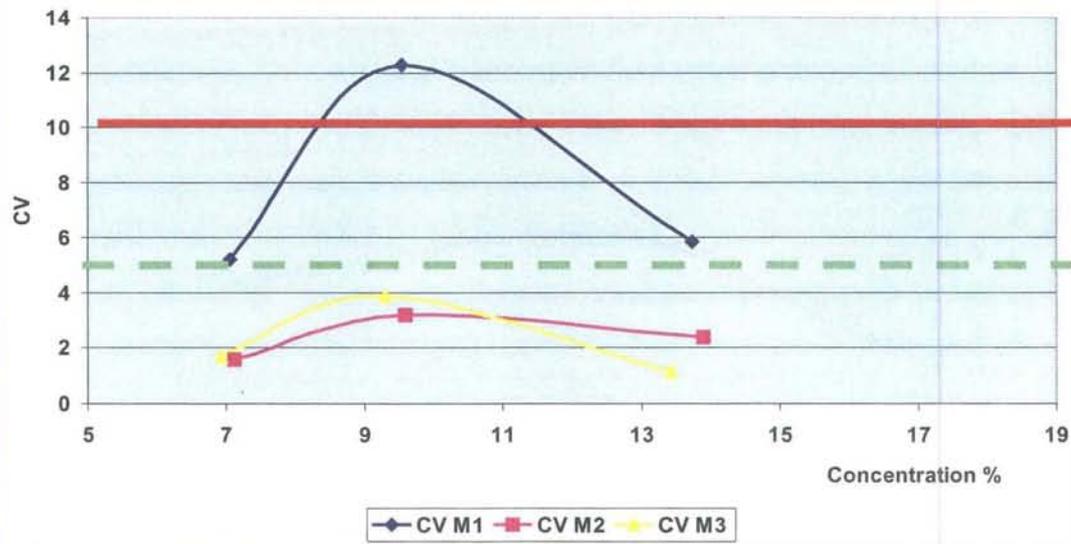
Expérience 1



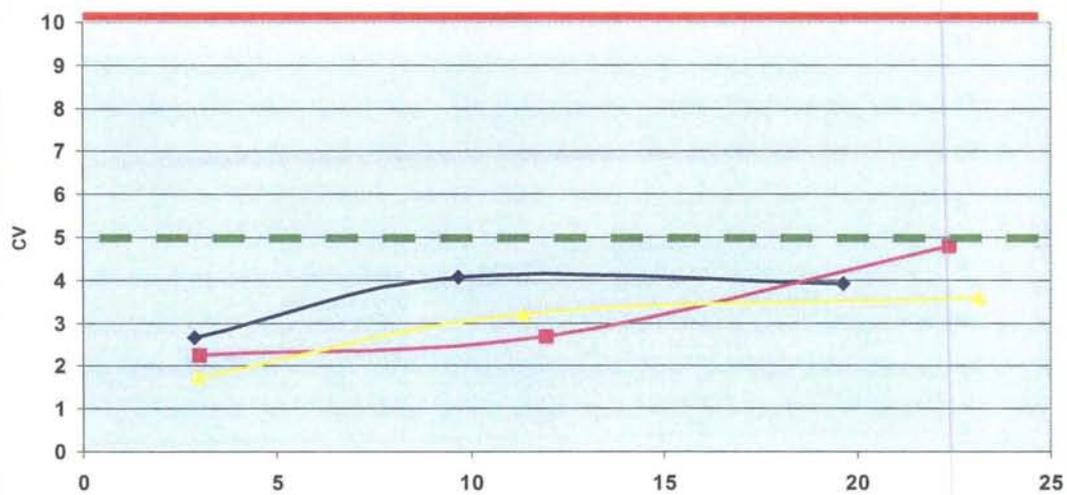
Expérience 2



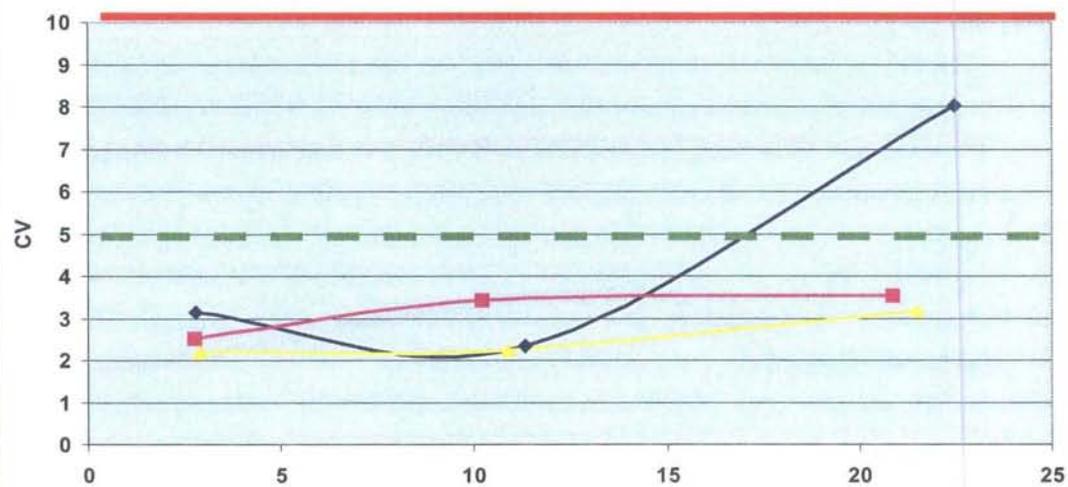
Expérience 3



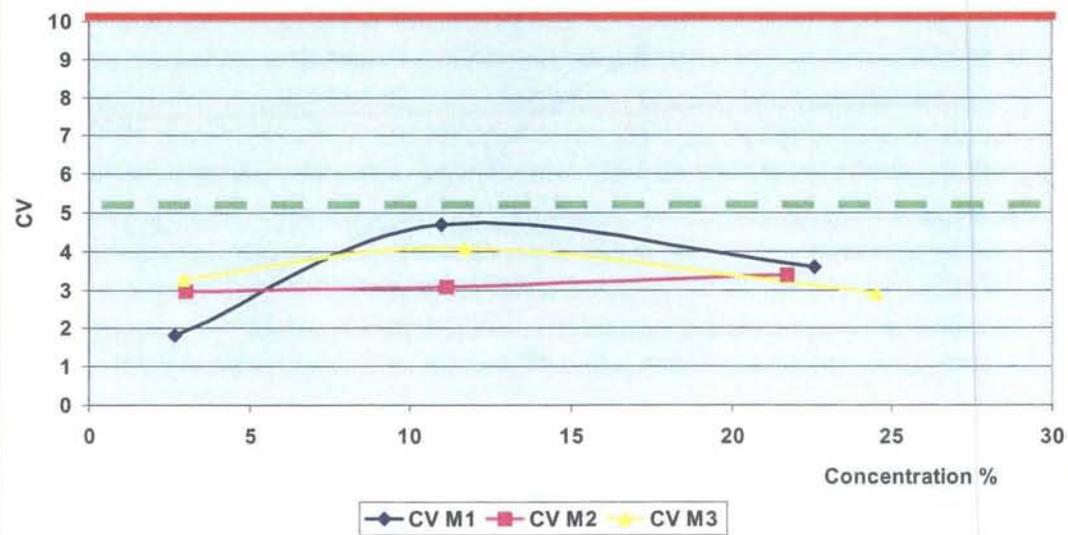
Expérience 1



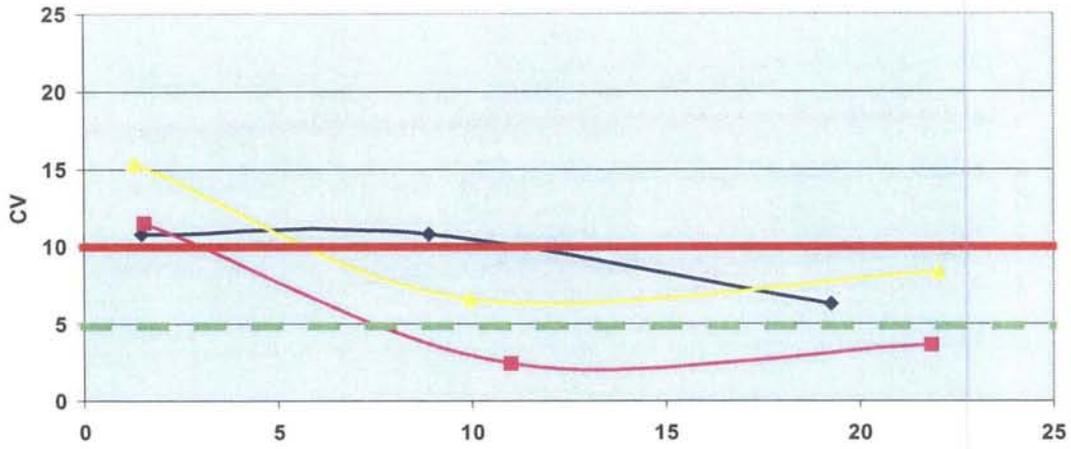
Expérience 2



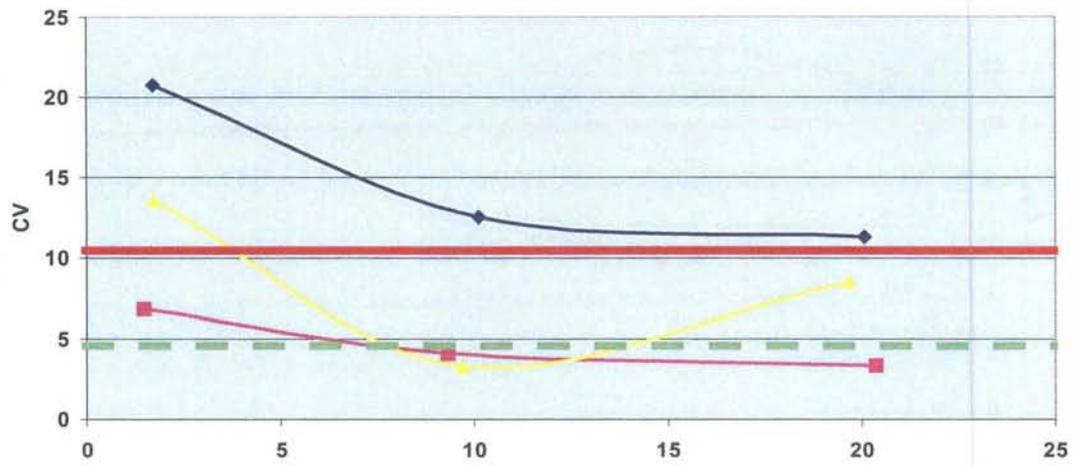
Expérience 3



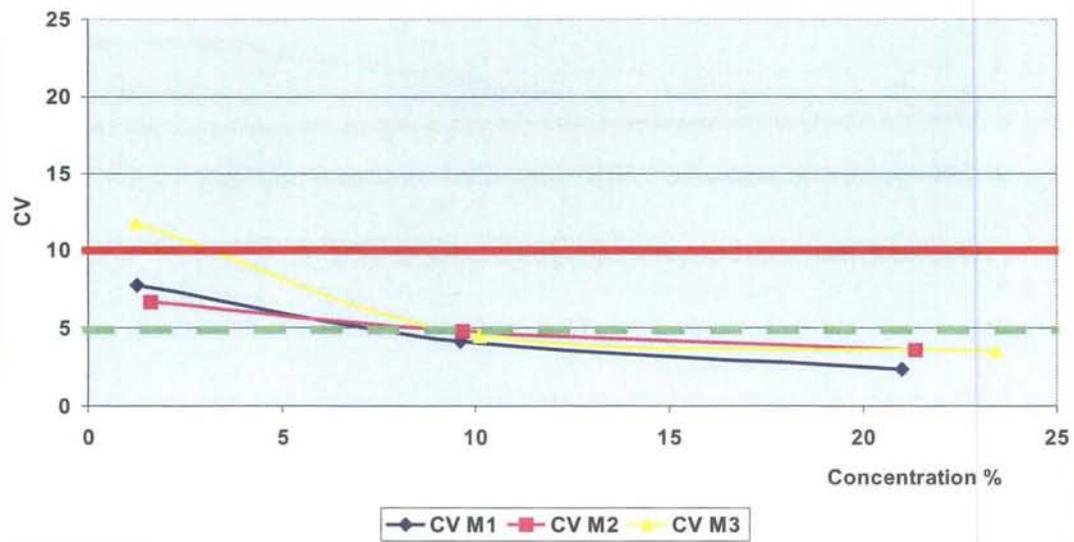
Expérience 1



Expérience 2

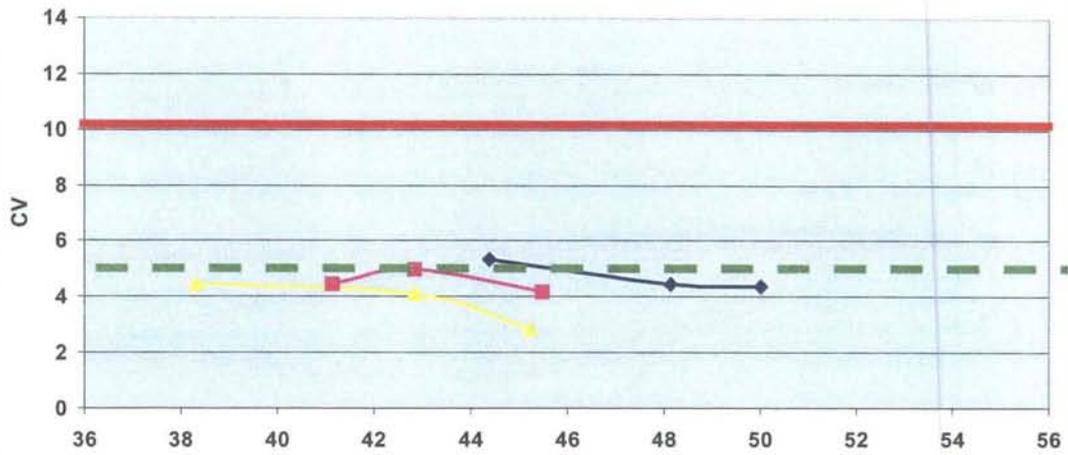


Expérience 3

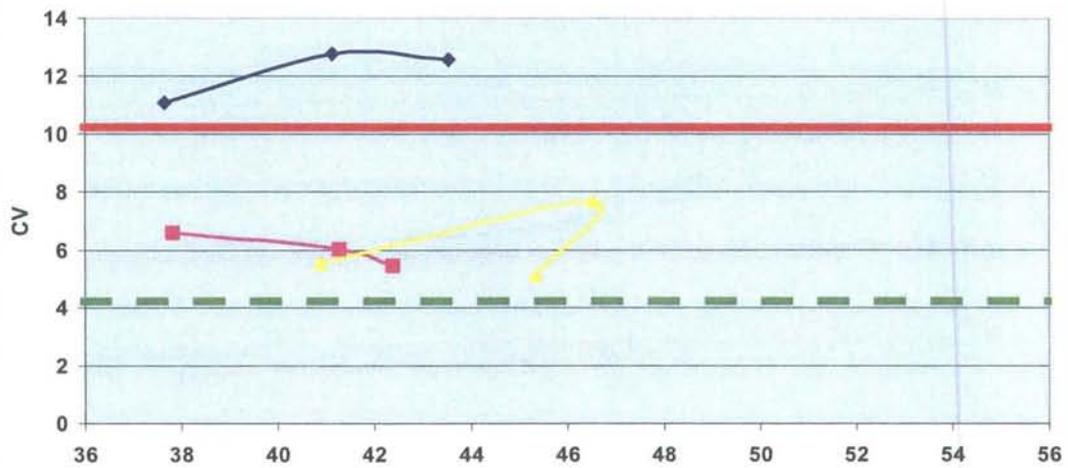


—◆— CV M1 —■— CV M2 —▲— CV M3

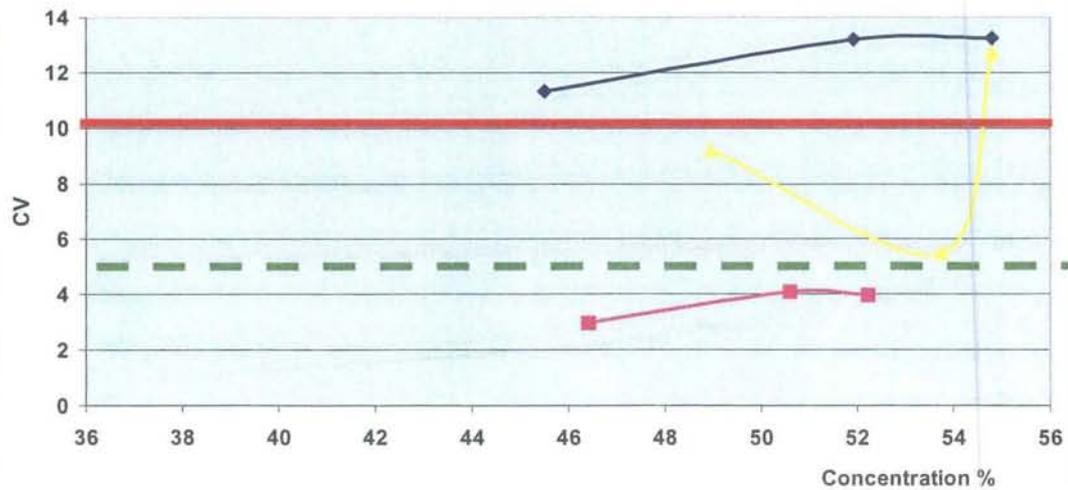
Expérience 1



Expérience 2



Expérience 3



CV M1 CV M2 CV M3

## CONCLUSION

LIPIDES	➔	Bonne Répétabilité
GLUCIDES		
GLYCOGENE	➔	Peu répétable pour les Conc. Faibles
PROTEINES	➔	Répétabilité Satisfaisante (M2 et M3)

INFLUENCE DU MANIPULATEUR

## Les sources d'erreurs possibles...

Pesée

Extraction et Prises d'Essai

Ajout de Réactifs

Gamme étalon

Répartition Lecture (microplaques)

## Variabilité Inter-Manipulateurs

**Principe :** Chaque manipulateur procède à la répartition et à la lecture de la gamme et des échantillons des deux autres manipulateurs

**Résultats :**  
Les écarts entre les CV obtenus par les différents manipulateurs ne sont pas dus à la répartition en microplaques

*Problème de méthode et de manipulateurs*

## REPRODUCTIBILITE

3 EXPERIENCES X 3 MANIPULATEURS



PRECISION JOUR APRES JOUR D'UNE METHODE

## LIPIDES

Concentration	M1	M2	M3	Moyenne Tous Manipulateurs
Faible	4,0	2,8	4,2	4,4
Moyenne	8,5	4,9	6,0	6,7
Forte	5,0	2,2	4,0	4,7

## GLUCIDES TOTAUX

Concentration	M1	M2	M3	Moyenne Tous Manipulateurs
Faible	3,9	5,1	2,6	4,5
Moyenne	7,7	7,1	4,5	6,9
Forte	8,4	4,8	6,3	7,3

## GLYCOGENE

Concentration	M1	M2	M3	Moyenne Tous manipulateurs
Faible	19,4	9,2	20,8	17,3
Moyenne	11,0	8,1	5,2	8,5
Forte	8,2	4,5	10,0	8,4

## PROTEINES

Concentration	M1	M2	M3	Moyenne Tous Manipulateurs
Faible	12,4	9,7	12,8	11,7
Moyenne	14,3	10,4	11,3	12,3
Forte	14,2	10,0	12,8	12,6

## CONCLUSION

GLUCIDES

Bonne Reproductibilité

GLYCOGENE

Reproductibilité Correct pour  
1 manipulateur, douteuse pour les autres

LIPIDES

Bonne Reproductibilité

PROTEINES

Mauvaise Reproductibilité

## CONCLUSION GENERALE

Un regret :  
le manipulateur a une incidence  
sur la qualité du résultat produit

Une méthode non reproductible =

Ne pas fractionner en plusieurs séries  
une même campagne d'échantillonnage

Comparaison de plusieurs séries d'échantillonnage : **INTERDITE**

# PERSPECTIVES

IDENTIFIER LES DEVIANCES

**INCONTOURNABLE :**  
Tester une autre méthode de dosage des Protéines

## 8. Dosage des Protéines

Nicole Faury

Le dosage des protéines par la méthode de Lowry est parfois peu répétable pour certains manipulateurs. Mais surtout, elle n'est pas reproductible.

Dans une première approche, des expériences ont été réalisées afin de tenter d'améliorer le dosage. L'hypothèse a été de comparer une quantité de chair à analyser comprise entre 7 et 9 mg, celle-ci diluée au 1/5 et une de 10 à 11 mg. Les résultats montrent une différence significative entre les pesées extrêmes. Lors d'une prise d'essai de 10 à 11 mg, il n'y a pas suffisamment de réactif pour révéler la totalité des protéines ou peut-être l'extraction n'est pas complète. Ce point constitue une nette amélioration de la méthodologie qui avait probablement dérivé en raison de l'imprécision du protocole.

Dans un deuxième temps, la méthode de Lowry ainsi corrigée a été comparée à la méthode de Bradford.

Les deux protocoles ne permettaient pas d'obtenir des concentrations similaires en protéines voisines de 48 % pour la méthode de Lowry et autour de 35 % pour la méthode de Bradford. L'hypothèse a été de vérifier s'il n'y avait pas un problème à l'extraction (à froid pour Lowry et à chaud pour Bradford).

Différents modes et différents temps d'extraction pratiqués n'ont pas permis d'obtenir des concentrations de protéines par la méthode de Bradford proche de celle de Lowry.

Le choix de l'étalon a donc été remis en question. L'albumine de poulet a permis d'obtenir des concentrations par la méthode de Bradford de l'ordre de 60 à 70 % teneurs qui sont proches de la composition réelle des animaux. Cela a conduit aussi à une somme Protéines, Lipides, Glucides et Cendres de l'ordre de 100 %.

Au cours de ces essais, il a également été mis en évidence une influence notable des sucres sur la concentration en protéines lorsque l'on réalise un dosage par la méthode de Lowry. Les sucres interfèrent dans le dosage. Une corrélation inverse entre teneur en protéines et glucides a pu être établie. Cette relation ne se vérifie pas avec la méthode de Bradford.

La méthode de Bradford paraît être un bon substitutif à la méthode de Lowry. Il conviendrait de tester la reproductibilité.

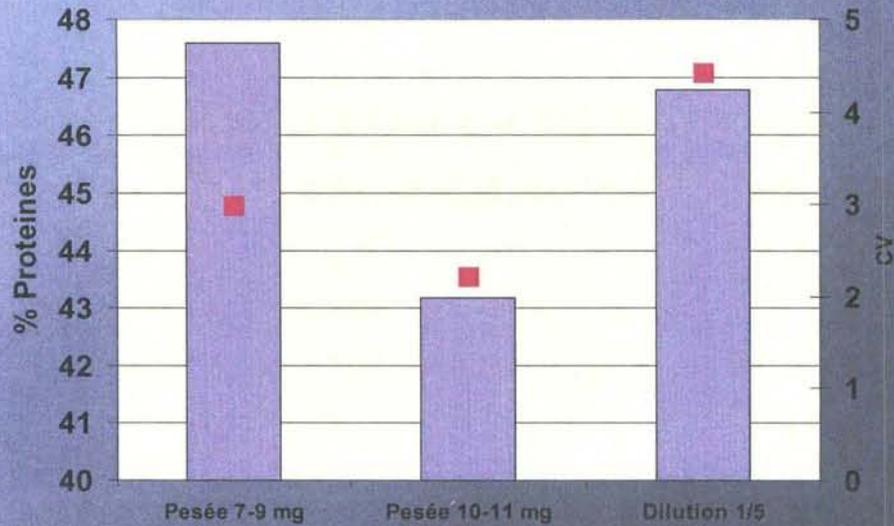
## **DOSAGE DES PROTEINES : LOWRY ou BRADFORD ?**

**Nicole Faury & Gaëlle Bertrand  
LCPC/IFREMER/La Tremblade**

**LOWRY : peu REPETABLE et pas REPRODUCTIBLE**

**Hypothèse : diminuer la prise d'essai pour vérifier  
si la mesure s'améliore**

### Dosage par la méthode de Lowry



### Probabilité associée au test de Student

	Pesée 7-9 mg	Pesée 10-11 mg	Dilution 1/5
Pesée 7-9 mg		***	NS
Pesée 10-11 mg	***		***
Dilution 1/5	NS	***	

Pour une prise d'essai trop importante,  
il n'y a pas suffisamment de réactif pour révéler  
la totalité des protéines

**Identifier une dérive méthodologique**

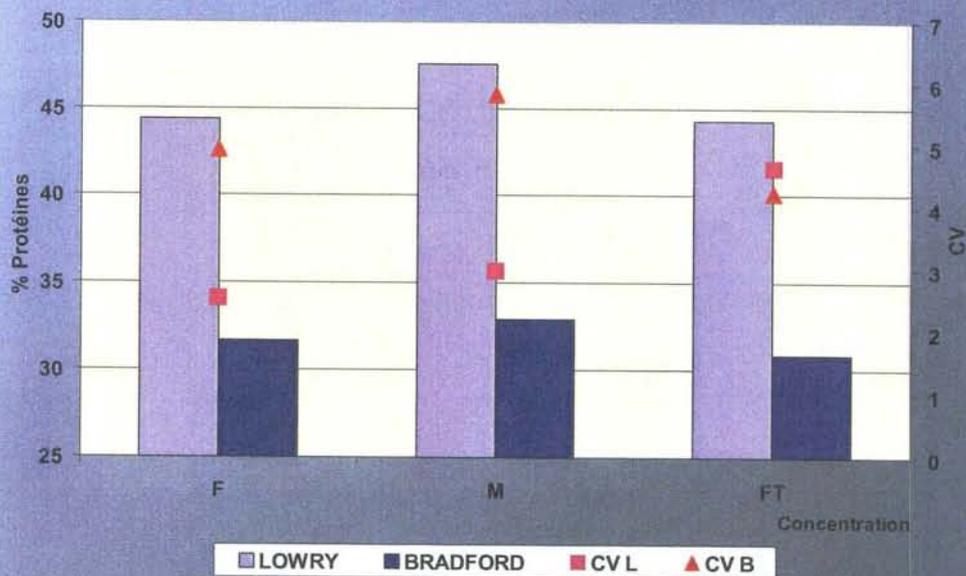
## COMPARAISON LOWRY / BRADFORD



**Lowry :** qq centaines de  $\mu\text{g}$   
pesée 7-9 mg  
extraction 10 mL NaOH  
température ambiante  
Folin Ciocalteu

**Bradford :** Protocole de Caen  
qq dizaines de  $\mu\text{g}$   
pesée 10 mg  
extraction 5 mL NaOH  
Bain marie 100°C, 5mn  
Bleu de Coomassie

## Lowry ou Bradford ???

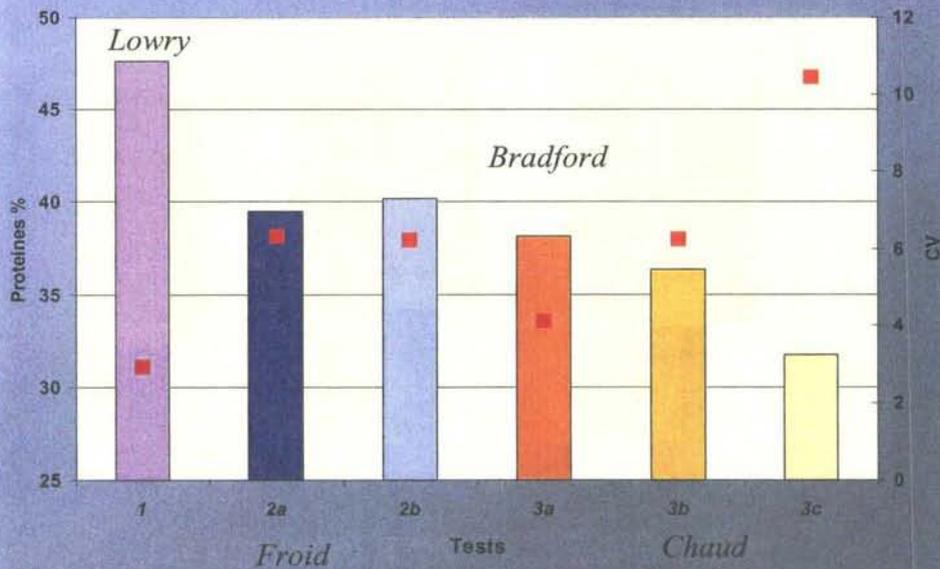


## Pourquoi une telle différence de concentration ?

### Hypothèse : Problème d'extraction de la chair ?

Test 1	Test 2a	Test 2b	Test 3a	Test 3b	Test 3c
Pesée de 7-9 mg* ou 10 mg environ de chair lyophilisée					
10 mL de NaOH			5 mL de NaOH		
			Homogénéisé au vortex		
1 nuit			5 mn	10 mn	20 mn
Température ambiante			100°C bain-marie		
Dilution au 1/100					
LOWRY			BRADFORD		

### Résultats des différents modes d'extraction :



### Probabilité associée au Test de Student

	1	2a	2b	3a	3b	3c
	LOWRY	BRADRFORD				
	Temp. ambiante	Temp. ambiante		Bain marie 100°C		
1		***	***	***	***	***
2a	***		NS	NS	**	***
2b	***	NS		*	***	***
3a	***	NS	*		*	***
3b	***	**	***	*		***
3c	***	***	***	***	***	

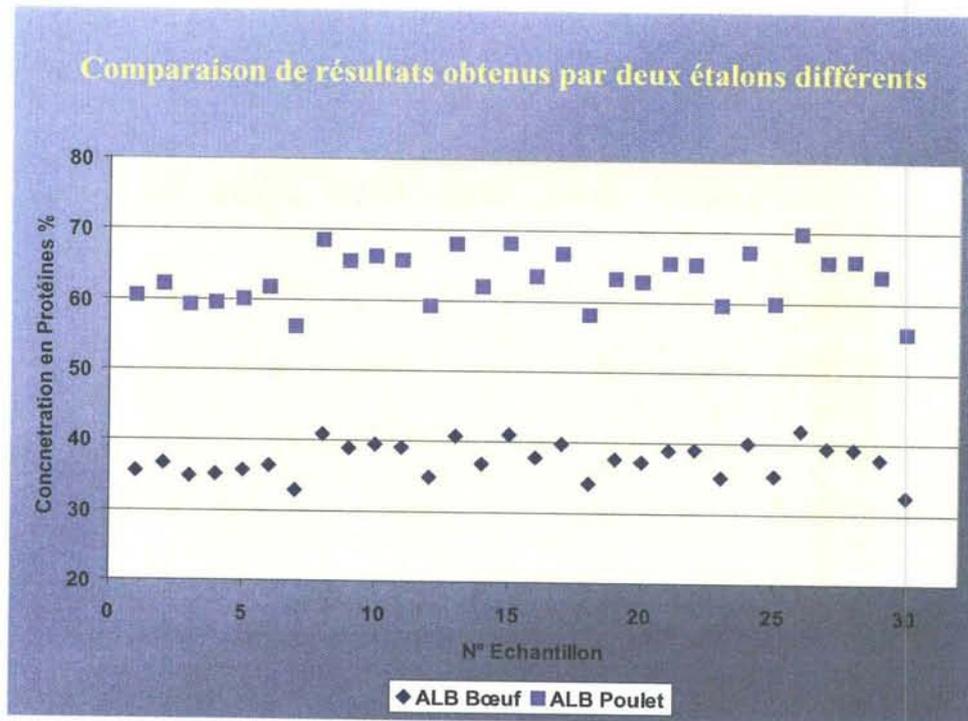
L'extraction modifie la concentration en protéines probablement par dénaturation de celles-ci.

→ Il y a toujours une différence de concentration entre les 2 méthodes



Tester un nouvel étalon ??

Bœuf ou poulet ?

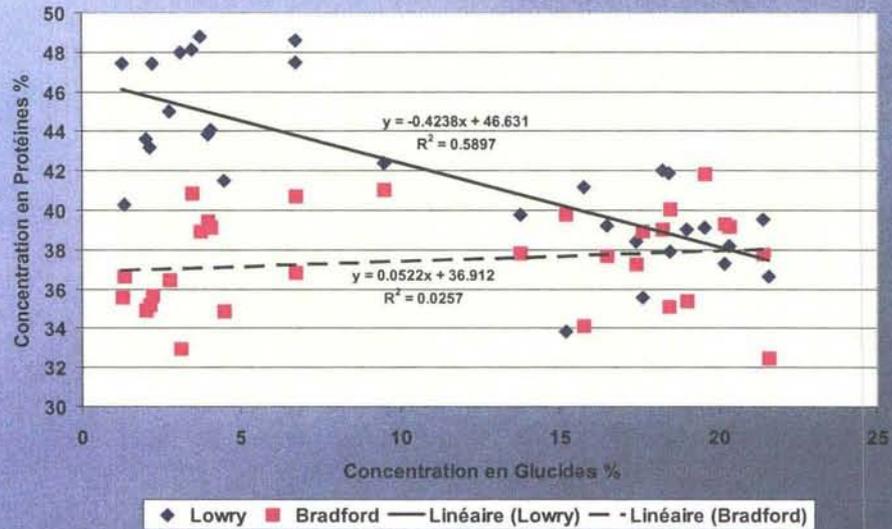


**L'albumine de bœuf ne convient pas pour le dosage  
par la méthode de Bradford (*Relexans, 1984*)**

**L'albumine de poulet permet d'accroître les teneurs**

**Lipides + Glucides + Protéines + Cendres  $\equiv$  100 %**

### Autre inconvénient de la méthode de Lowry...



Interférence des sucres dans le dosage selon Lowry, *Modul 19/05*

### Conclusion :

Méthode de Lowry = Poubelle or not poubelle????...

Tester la reproductibilité de la méthode de Bradford

Le dosage des protéines présente-t-il un intérêt pour l'étude de la physiologie des animaux ???

## 9. Dosage des Glucides Totaux et Glycogène

### Nicole Faury

Le dosage du glycogène manque de précision notamment pour les faibles concentrations. Afin d'améliorer l'imprécision, une expérience a été réalisée à partir de glycogène d'huîtres type II du commerce (Sigma®).

Trois gammes étalons de 0 à 500 µg/mL ont été faites :

- Avec une solution de glucose
- A partir de glycogène sans précipitation par l'éthanol
- A partir du glycogène précipité à l'éthanol comme le sont habituellement les échantillons.

Les trois droites de régression élaborées montrent des équations différentes. Les absorbances sont plus faibles dans le cas du glycogène. Elles sont d'autant plus faibles que les étalons ont subi la précipitation à l'éthanol. Or les échantillons sont traités selon ce protocole. Le glucose et le glycogène ne possèdent pas le même coefficient d'absorption molaire. En conséquence, utiliser le glucose pour étalonner le glycogène ne semble pas approprié car il conduit à sous évaluer les concentrations en glycogène.

Dans les conditions expérimentales habituelles (glucose en référence), le dosage de quantités connues de glycogène montre une sous-estimation de l'ordre de 60 % lors de faible concentration (50 µg/mL). Pour des concentrations comprises entre 250 et 500 µg/mL, la sous estimation est de l'ordre de 22 %. La sous estimation des concentrations diminue progressivement avec l'augmentation de celles-ci.

Outre le problème lié à l'étalonnage (glucose ou glycogène) une perte de matière se produit probablement lors du rejet du surnageant.

Il conviendrait pour être rigoureux d'utiliser une gamme élaborée avec du glycogène précipité à l'éthanol. Ainsi les échantillons et la gamme seraient traités de la même manière. De plus, il faudrait améliorer la précipitation.

## DOSAGE des GLUCIDES TOTAUX et du GLYCOGENE

Nicole Faury & Gaëlle Bertrand  
LCPC/IFREMER/La Tremblade

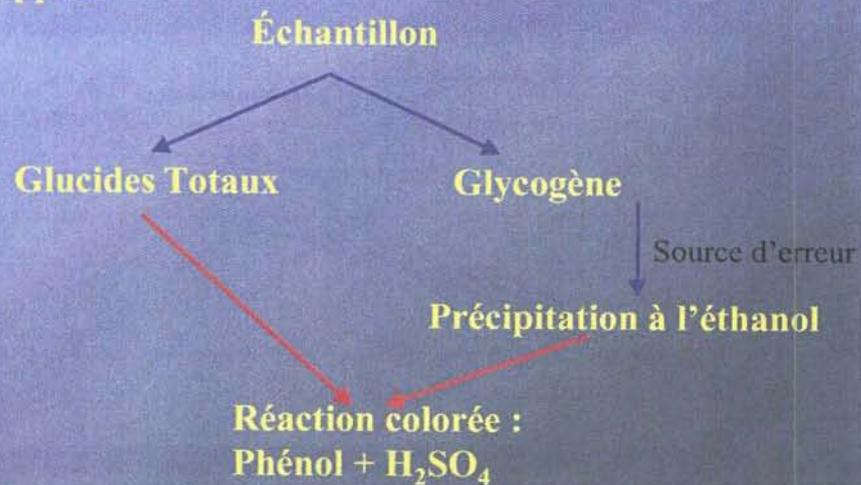
### Constat :

Forte imprécision sur les faibles  
concentrations en glycogène

### Problèmes :

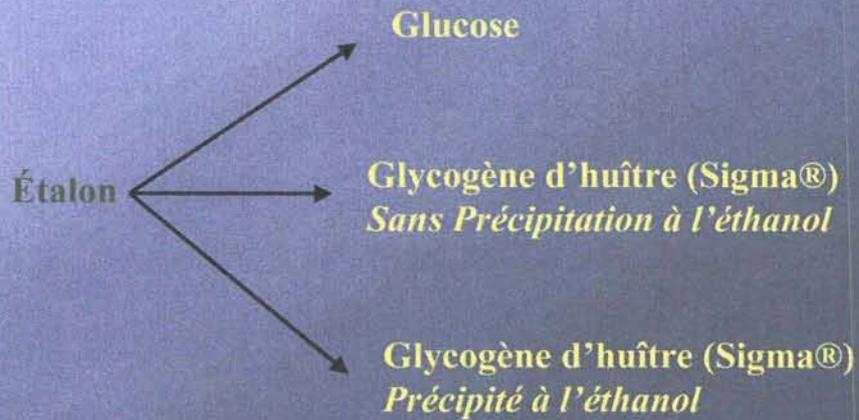
Manipulateurs... et/ou méthode (biais)...?

### Rappel :

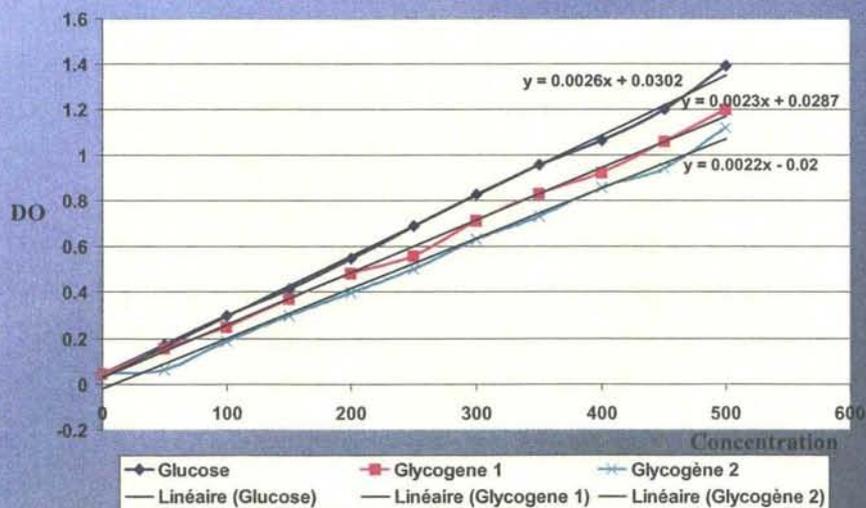


La concentration en glycogène  
est calculée à partir du glucose

Pour des concentrations de 0 à 500 µg/mL



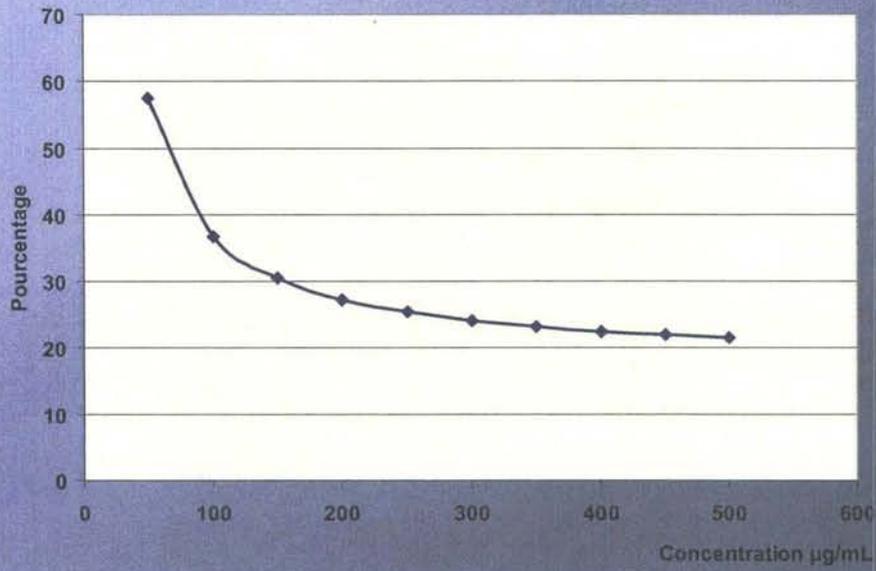
### Comparaison des différentes gammes étalons



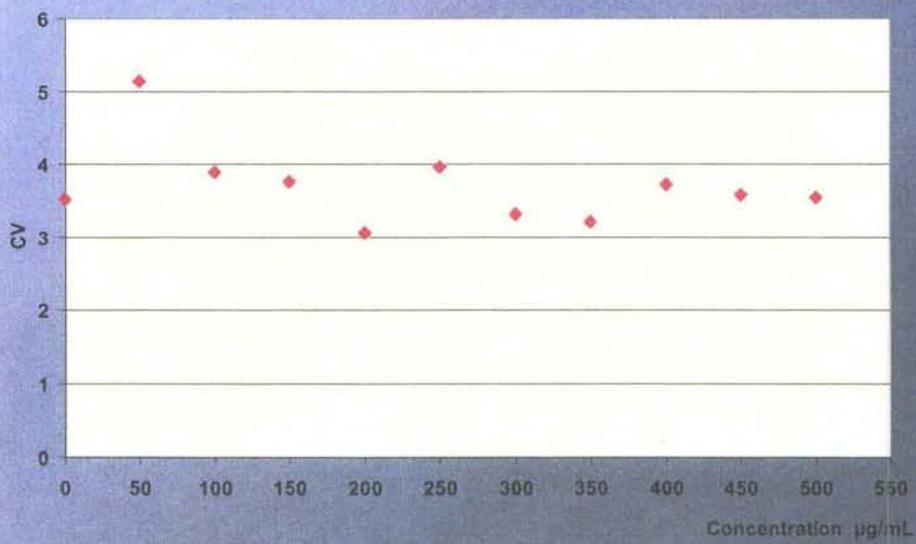
Glycogène 1 : pas de précipitation à l'éthanol

Glycogène 2 : précipitation à l'éthanol

### Pourcentage de glycogène sous-estimé en fonction de la Concentration lors d'un étalonnage au glucose



### CV pour un étalonnage réalisé avec du Glycogène précipité à l'éthanol



## CONCLUSION

Imprécision était due :  
au manipulateur  
et à la méthode

**Suggestion : Utiliser le glycogène d'huîtres (Sigma ®)  
pour réaliser l'étalonnage :**

- ▶ **Glucides totaux : *Sans précipitation à l'éthanol***
- ▶ **Glycogène : *Avec précipitation à l'éthanol***

## 10. La préparation de l'échantillon : le broyage

Michel Ropert et Charlotte Simone

Depuis de nombreuses années, les laboratoires côtiers sont amenés à réaliser, dans le cadre des études et suivis dont ils ont la responsabilité sur le terrain, des analyses biochimiques destinées à évaluer les teneurs en Protides, Lipides et Glucides (PLG) dans des chairs d'huîtres et/ou de moules.

Dès le début, des relations se sont établies entre les différentes équipes concernées dans le but d'homogénéiser les protocoles. En l'absence de coordinateur à l'échelle nationale, cette démarche de standardisation reposait essentiellement sur des initiatives et des volontés locales propres à chaque labo. Dans le même temps, si les résultats obtenus dans le cadre de ces analyses PLG apportaient des éléments, ils n'en soulevaient pas moins de nombreuses questions sur le plan de l'interprétation du fait d'une variabilité parfois importante des résultats.

C'est dans ce contexte que le LCN a été amené à essayer de mieux identifier la(les) source(s) de variabilité potentielle. Ce travail initié en début d'année 2003, a du être interrompu du fait de l'absence du technicien biochimiste du LCN. La présente note propose donc de présenter de manière informelle les premières tendances de cette réflexion reposant pour l'instant sur des hypothèses qui devront être validées par la suite.

### Principe des analyses.

Le principe des analyses biochimiques PLG repose sur des dosages réalisés sur des quantités de chair de l'ordre de 5 à 10 mg (appelés « Prise »). Ils sont prélevés sur des pools de 10 individus entiers lyophilisés puis broyés (appelés "Echantillons"). Ces "échantillons" représentent un poids moyen de l'ordre de 10 à 15 g.

Le dosage est donc effectué sur une « prise » qui représente 3 à 4 % de la masse totale de l'échantillon. Il est donc fondamental que « l'échantillon » soit parfaitement homogène pour que la "prise" soit représentative.

D'autre part, les dosages à proprement parlé sont doublés (2 prises par échantillons) et trois lectures successives sont effectuées par le lecteur microplaque sur chaque « prise ». Cette procédure permet 1) de s'assurer de l'homogénéité de l'échantillon par comparaison des résultats obtenus sur les deux prises ; 2) de s'assurer de la stabilité de l'appareil par comparaison des 3 lectures.

A ce stade, nous avons identifié deux sources principales de variabilité dans les résultats observés. D'une part, une qualité médiocre de broyage qui peut induire une hétérogénéité dans l'échantillon. D'autre part, des différences ont également été observées au niveau des lectures entre les trois réplicats d'une même prise.

### Qualité du Broyage.

L'homogénéité de l'échantillon est théoriquement assurée par le broyage des 10 individus qui constituent le pool. Le protocole « standard » prévoit que le broyage est réalisé au moyen de broyeurs à bille dans des bols en inox. L'expérience nous a montré que cette étape fondamentale comporte une part aléatoire importante dans la qualité du broyage selon la quantité de chair, le nombre de billes et la durée du

broyage. La qualité du broyage est évaluée de manière subjective, « à l'œil », la granulométrie du broyat devant être comparable à celle d'une farine sans perception de fibres ou de morceaux de chair visibles à l'œil nu. Dans les faits, il n'est pas rare de devoir prolonger l'utilisation du broyeur à bille sans garantie du résultat final.

Cette particularité est incontestablement une source de variabilité importante dans l'analyse PLG qui doit suivre. Notre réflexion nous a donc amené à essayer d'évaluer les possibilités de fiabiliser ce travail de broyage en utilisant un autre matériel de type "moulin à café" issu du commerce.

L'objectif, dans un premier temps, n'était pas de modifier la standardisation existante des protocoles de broyages. Les premiers essais réalisés visaient donc à essayer d'améliorer le résultat du broyage à bille en effectuant un pré-broyage de l'échantillon au moyen d'un moulin à café. Cependant, dès les premiers essais de pré-broyage, il nous est apparu que le résultat obtenu après seulement quelques secondes au « moulin à café » était bien supérieur, en terme de finesse, à la plupart des broyats obtenus avec les seuls broyeurs à bille classique.

Rapidement, nous avons ainsi pu identifier les avantages et les inconvénients de chaque technique :

Type de matériel	AVANTAGES	INCONVENIENTS
10.1. Broyeur à bille	<ul style="list-style-type: none"> <li>Standard entre les différents Labo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durée minimum de broyage de 20 minutes avec risque de prolongation.               <ul style="list-style-type: none"> <li>Bruyant</li> </ul> </li> <li>Difficultés pour broyer des échantillons individuels</li> <li>Résultats parfois imparfaits sur le plan qualitatif.               <ul style="list-style-type: none"> <li>Prix élevé</li> </ul> </li> <li>Risque de montée en température du bol de broyage.</li> </ul>
10.2. "Moulin à café"	<ul style="list-style-type: none"> <li>Prix (30 à 50 € TTC)</li> <li>Durée de broyage maximum : 2 minutes (arbitrairement)</li> <li>Qualité de broyat de type "poudre de farine"</li> <li>Pas d'effet de montée en température pendant le broyage (à vérifier dans le cas de nombreux broyages successifs)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Non standard.</li> <li>Difficile pour des échantillons individuels</li> <li>Effet sur les résultats d'analyse inconnus</li> </ul>

A ce stade, il nous semble intéressant de nous interroger sur la pertinence de conserver l'utilisation des broyeurs à bille par rapport à des techniques plus "simples" du type "moulin à café". Cette décision passe bien évidemment par une analyse comparative des résultats obtenus sur un même échantillon (pool) traité par les deux techniques de broyage. Pour cela, différentes expérimentations peuvent être envisagées en fonction de la question posée.

### Prébroyage au moulin à café ?

Deux échantillons de 10 individus sont prélevés dans un lot homogène d'huîtres (même origine, même historique...etc).

Les deux lots sont traités et lyophilisés selon le même protocole. Le broyage est réalisé au moyen d'un broyeur à bille durant 20 minutes, mais l'un des échantillons est préalablement pré-broyé au moulin à café.

Les analyses sont réalisées sur les deux échantillons sur la base de 30 « prises » par échantillon afin d'évaluer la variabilité des résultats

### Abandon du broyage à bille au profit du moulin à café ?

Même principe que précédemment mais les échantillons sont broyés respectivement au moyen du broyeur à bille et du moulin à café exclusivement.

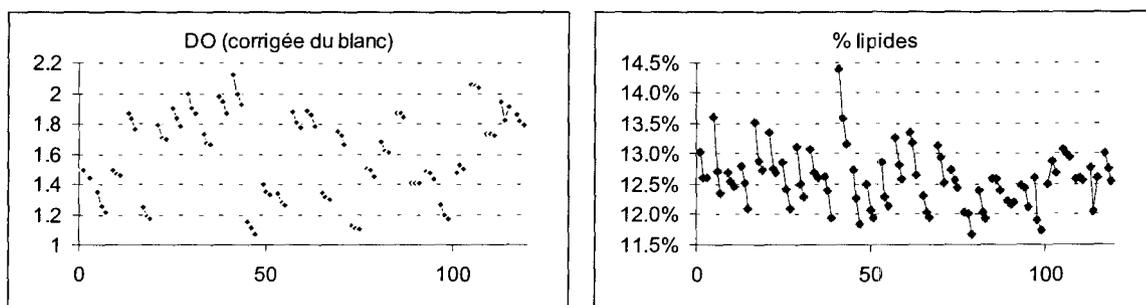
Les analyses sont également réalisées sur 30 réplicats ("prises") par échantillon.

Ce travail a été initié au LCN mais n'a pas pu être mené à terme avant le départ de la technicienne Biochimiste. Il devrait cependant être repris à son retour.

Il est également prévu, dans le cadre de cette approche, d'évaluer les questions relatives aux températures subies par les échantillons au cours du broyage.

### Stabilité des lectures :

Lors des lectures successives d'une même prise, une dérive des mesures effectuées par le lecteur microplaque est nettement visible. Ramenée au pourcentage de la quantité de prise, cette dérive est encore plus flagrante :



Cette observation ne semble pas liée à l'appareil puisque de telles dérives ne s'observent pas lors du dosage de protéines par exemple. Elles semblent donc liées à l'analyse elle-même.

D'après les observations de l'opérateur, l'éventualité d'un biais lié au remplissage des puits de mesure sur la microplaque pourrait être envisagé. En effet, Les trois puits successifs sont systématiquement remplis dans le même ordre. D'autre part, la solution de réactif présente une viscosité importante. Le remplissage des cuves se fait à l'aide d'une pipette automatique, de ce fait le volume des trois puits à remplir est pris en une seule fois dans le tube à essai. Le premier puits est donc rempli alors que la pipette contient un volume de solution plus important que celui restant dans la pipette lors du remplissage des puits suivants.

Cette particularité reste actuellement de l'ordre de l'hypothèse puisque là encore, aucune validation n'a pu être réalisée avant le départ du technicien analyste.

A son retour il est prévu d'inverser systématiquement l'ordre de remplissage des puits afin de vérifier que cette dérive est bien à mettre en relation avec la viscosité de la solution. Si cela est confirmé il serait alors suggéré de ne pas extrapoler les

résultats des mesures de DO à partir de la valeur moyenne des 3 lectures réalisées, mais de s'en tenir à une seule valeur définie au départ.

De même, cette réflexion doit être étendue aux résultats obtenus dans le cadre des dosages des sucres qui utilisent des réactifs dont la viscosité est également importante.



## 11. Comparaison CHN-Analyses des PLG

Daniel Razet

En opérant l'évaluation de la matière organique de la chair des mollusques par PLG et en utilisant des équivalents discutables dans les unités nous n'avons jamais expliqué plus de 55 % de poids sec. Une autre méthode, l'analyse élémentaire de Carbone et d'Azote a été envisagée. Le Carbone et l'Azote expliquent jusqu'à 20% de plus que PLG, or dans C et N on néglige H et O.

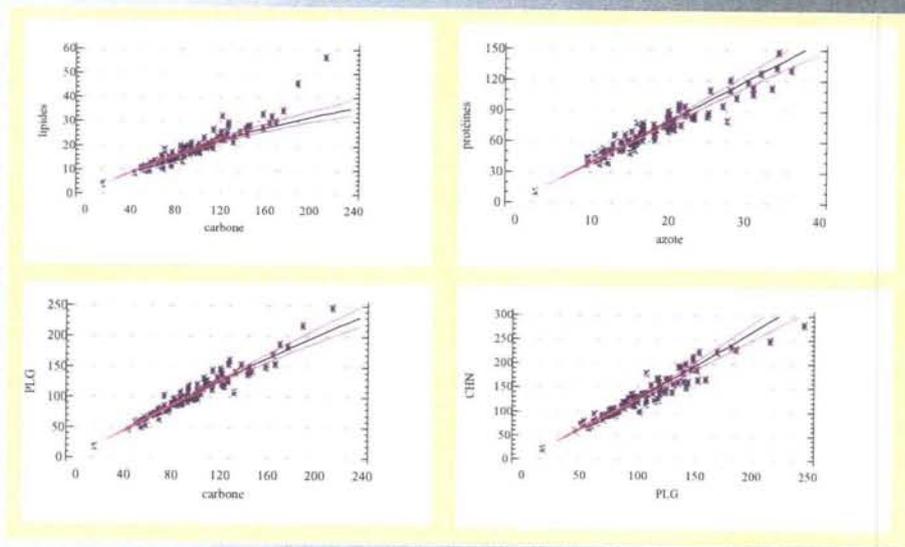
Le matériel d'analyse élémentaire CHN est onéreux mais facile d'emploi, les résultats sont répétitifs. Cette méthode permet de mieux expliquer la matière organique. Nous évaluons également la valeur énergétique des matières en suspension et des sédiments par CHN.

Des modèles ont été établis sur la chair de mollusques.

Nous pouvons sans problème établir de solides corrélations entre CHN et PLG, C et N expliquent à eux seuls plus de matière que PLG.



## Quelques modèles de relations PLG et C N



## Projets pour l'avenir ?

**L'analyse élémentaire  
du Carbone et de l'Azote  
est peut-être la solution pour quantifier  
la matière organique  
de la chair des mollusques**

## 12. Discussion 2 : la technique

La lyophilisation ou l'étuvage :

L'étuvage est la méthode officielle pour déterminer le pourcentage d'eau d'un produit (Thierry Sérot). Elle est réalisée à 103°C et ne permet donc pas de dosage biochimique ultérieur. Or la lyophilisation est quasiment généralisée aux laboratoires RA.

Broyage aqueux :

Il conviendrait de broyer le produit à analyser, de le répartir en différents tubes pour chaque dosage et de le stocker au congélateur. Le broyage peut être réalisé à l'aide d'un broyeur type Ultra-turax ou au cryobroyeur.

Dosage des lipides :

Il ne convient pas de lyophiliser des produits destinés aux dosages de lipides (Dustan et Wolkman, 1993). Les analyses par les méthodes de Marsh et Weinstein doivent être réalisées sur du matériel frais. La lyophilisation entraîne une sous évaluation des teneurs en lipides, il faudrait réhydrater le produit à doser. Il faudrait que ce type d'information (délivrée par Jeanne Moal) soit transmise au laboratoire côtier.

Dosage des protéines :

Jeanne Moal est surprise de l'importante variabilité obtenue lors des expérimentations du LCPC. N'amène t'on pas une variabilité supplémentaire en réalisant les lectures par micro plaque d'une part et par photomètre d'autre part ? Le plastique est une matière très absorbante. De plus, la longueur du faisceau sera plus ou moins importante selon la quantité de produit déposé. Le spectrophotomètre et la cuve en verre restent l'idéal. Les participants de VP précisent qu'aucune analyse n'est pratiquée avec du matériel plastique, seul le verre est utilisé.

Jean-René Le Coz précise que des dosages réalisés en micro plaque par la méthode Bradford n'étaient pas satisfaisants. Il relate des expériences menées à l'Université de Brest concernant des dosages par Lowry sur l'hémolymphe et souligne qu'ils ont rencontré des problèmes.

Nicole Faury ajoute qu' en raison de l'interférence des sucres dans le dosage de Lowry, il n'est pas permis de comparer les teneurs en protéines de deux sites aussi extrêmes en concentration en sucres que la baie des Veys et le bassin de Marennes-Oléron (eg programme MOREST). C'est une raison supplémentaire d'abandonner cette méthode de dosage.

Lorsqu'une autre méthode de dosage des protéines aura été adoptée (à définir) il conviendra d'établir de nouveau cycle saisonnier sur les espèces huîtres et

moules suivies par les laboratoires côtiers. On peut considérer que ceux que nous avons sont faux (Stéphane Robert).

Dosage du glycogène :

Il est délicat de faire précipiter des petites quantités ; des pertes importantes peuvent se produire. En biologie moléculaire, on aide à la précipitation en ajoutant un entraîneur annexe. Chlotilde Heude a étudié l'incidence des volumes d'éthanol ajoutés et la durée de précipitation. Le glycogène précipite beaucoup mieux à froid : plus le temps de précipitation à froid (4°C) est long, plus la quantité de glycogène récupérée est importante. Mais elle n'est toutefois pas totale.

Il conviendra donc de corriger le protocole utilisé dans les laboratoires côtiers. La centrifugation devra également être faite à 4°C. Cependant, lors de la précipitation à l'éthanol, il est probable qu'une partie des protéines précipitent (Chlotilde Heude et Thierry Sérot).

Ceci est l'occasion de souligner que les protocoles en vigueur ne sont pas suffisamment précis. Ils ont probablement dérivé.

La question peut se poser de faire les deux dosages : sucres totaux et le glycogène (Jeanne Moal), la variation des sucres représente la variation du glycogène. Considérant les problèmes délicats de précipitations du glycogène, le dosage des glucides totaux suffirait à répondre aux questions concernant les réserves. Cependant selon l'objectif de l'étude, il apparaît intéressant d'avoir les deux dosages (Chlotilde Heude). Les écarts entre les deux composés à certaines périodes de l'année ne sont pas dénués d'intérêt.

Dans une étude menée en 2000 au LCPC, le glycogène suivait les mêmes variations que les glucides totaux (Nicole Faury). Pendant la période printanière, le taux de glycogène représentait 80 % des glucides totaux. Il chutait à 40 % à la fin du printemps et au début de l'été. Il était près de 100 % en automne. Les conclusions énoncées en 2000 sont à revoir aujourd'hui en raison des nouvelles connaissances sur les biais méthodologiques. Il y a une incertitude majeure sur les valeurs estivales car c'est à ce moment précis que les taux sont les plus faibles (pertes à l'analyse et absence de précipitation à froid).

Thierry Sérot propose une méthode par pesée après déshydratation pour évaluer le précipité de glycogène. Cependant, cela paraît délicat en raison de la faible quantité de l'ordre de quelques micro grammes et nécessiterait une balance de haute précision (Daniel Razet).

Des essais de dosage par méthode enzymatique menés indépendamment par Chlotilde Heude et Jeanne Moal n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

D'autre part, il conviendrait pour être rigoureux de multiplier les concentrations en glycogène obtenu par 0,9 (rapport entre une molécule de glucose et une molécule de glycogène) ou de choisir un étalon en glycogène d'huîtres.

**Broyage au moulin à café :**

En l'absence des collègues de Port en Bessin, il n'a pas été largement discuté sur leurs observations.

Cependant, l'expérience antérieure et indépendante de Daniel Razet et Stéphane Robert montre que cet instrument ne permettrait pas de réaliser un broyage suffisamment fin. L'hélice du moulin se détériore et des particules se retrouvent dans le broyage préjudiciable au dosage. De plus, il se produit un échauffement.

**Dosage par spectrophotométrie ou photomètre :**

L'unanimité semble se faire sur ce point. Si le lecteur photomètre est plus rapide, il est moins précis. Le volume distribué est déterminant dans la valeur d'absorbance d'où l'obligation d'avoir une pipette (ou multipipette) très précise et répétable. Une lecture au spectrophotomètre s'affranchit du volume.

**CHN**

L'analyse de l'azote par CHN offre une alternative intéressante par rapport à la méthode de Kjeldall : un plus grand nombre par jour d'échantillon peut être analysé.

En terme d'échanges, de flux, d'écophysiologie et de modélisation, il serait intéressant de revenir à l'analyse au CHN. Par exemple, les relations Matière Organique et Carbone Organique Particulaire sont satisfaisantes, (Stéphane Pouvreau).

### 13. Conclusion et Perspectives :

Actuellement, nombreux sont les participants à considérer que l'on est dans l'impasse avec les méthodes utilisées aujourd'hui dans les laboratoires RA (côtiers principalement).

Il est rappelé que les objectifs doivent motiver la réalisation des dosages de PLG et non de les rendre comme par le passé, systématiques.

A l'instar de l'industrie agroalimentaire, les laboratoires d'analyses de l'Ifremer devraient être en mesure de déterminer précisément la composition biochimique des bivalves.

- La méthode de dosage des lipides est à revoir (extraction sur matériel humide) ou à remplacer par la méthode RMN.
- Le dosage du glycogène est à améliorer (précipitation à froid).
- Le dosage des protéines par la méthode de Lowry est à oublier. Les solutions de remplacement qui se proposent sont l'analyse sur CHN ou par méthode de Kjeldahl.

Il conviendrait d'avoir un manuel de référence du type de « Manuel des analyses chimiques en eau de mer » (Aminot et Chaussepied, 1983) pour les analyses biochimiques. Réaliser ce document ne fait pas partie des attributions d'un laboratoire côtier RA. La décision de sa réalisation relève de la hiérarchie.

Il a été convenu de procéder à une inter-calibration (automne 2003) à partir de quatre échantillons couvrant les quatre saisons de l'année (cf. variabilité saisonnière de l'extraction).

Seraient concernés :

Le LBBM Caen (Chlotilde Heude, Kristell Kelner et Katerine Costill)

Le LPI Brest ( Jeanne Moal et Jean René Le Coz)

Le LCN Port en Bessin (Charlotte Simonne et Michel Ropert)

Le LCPC La Tremblade (Philippe Geairon, Frédéric Blouin, Daniel Razet)

Le Laboratoire VP Nantes (Thierry Sérot et Claire Donnay)

Un laboratoire privé par exemple COOP AGRI

Chaque laboratoire procède aux analyses selon les méthodes à sa disposition (revues pour certaines).

Un nouveau bilan devra être fait à l'issue de ces analyses. De nouvelles orientations ont été prises, d'autres seront à prendre. Il conviendra de ne pas laisser 30 nouvelles années s'écouler avant de se remettre en question...

#### 14. Bibliographie

- AFNOR, 1989.** Détermination de l'extrait à l'hexane ou à l'éther de pétrole, dit Teneur en Huile, iso 659.
- AFNOR, 2002.** Détermination de la teneur en azote total et calcul de la teneur en protéines. Méthode de Kjeldahl NF V04-407 septembre 2002.
- Aminot A. & M. Chaussepied, 1983.** Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Centre national pour l'exploitation des océans, 395 p.
- Blight E.G., W.J. Dyer, 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37 (8)**, 911-917.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical biochemistry*, **72** : 248-254.
- Dubois M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers & F. Smith, 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.*, **28** : 350-356.
- Dustan G.A. & J.K. Volkman, 1993.** The effect of lyophilization on the solvent extraction of lipid classes, fatty acids and sterols from the oyster *Crassostrea gigas*. *Lipid, American oil chemists'society*, **28, (10)**, 937-944.
- Folch J., M. Lees & G.H. Sloane-Stanley, 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**: 497-509.
- Lango Reynoso F., 1999.** Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, Univ. Bretagne Occidentale, 139 p.
- Li Q., M. Osada & K. Mori, 2000.** Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fish. Sc.*, **66** : 502-508.
- Lowry O.M., A.L. Roseborough, R. Farrand, & J. Randall, 1951.** Protein measurment with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.*, **193** : 263-275.
- Marsh J.B., & D.B. Weinstein, 1966.** Simple charring method for determination of lipid. *J. Lipid Res.* **7** : 574-576.
- Moal J , J.F. Samain, J.R. Le Coz & J.Y. Daniel, 1985.** Table ronde protéines, glucides, lipides particuliers : aspects biologiques. *Océanis*, **11, (5)** : 487-502.
- Razet D., N.Faury., P. Geairon, P. Soletchnick & P. Gouletquer, 1996.** Les notes techniques de l'URAPC. - Les analyses biochimiques de protéines, lipides et glucides sur l'huîtres *Crassostrea gigas*. Amélioration des méthodes d'analyses et réflexion sur la variabilité des résultats. - Comparaison de deux méthodes de dosage de la matière organique. Analyse thermique par CHN et analyse biochimique. RIDRV/RA 96-11, La Tremblade, 39 p.

- Relexans J.C., B. Gaucher & H. Etcheber, 1984.** Activité des systèmes transporteurs d'électrons (ETS) et paramètres biochimiques de quelques algues et bactéries planctoniques d'eaux douces cultivées *in vitro*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **299**, série II n°14, 943-946.
- Toussaint C., F Médale , A. Davenel, B. Fauconneau, P. Haffray & S. Akoka, 2001.** Determination of the lipid content in fish muscle by a selfcalibrated NMR relaxometry method: comparion wit chemical extraction methods. *Journal of the sciences of Food Agriculture*, **82** : 173-178.
- Walne P.R., & R. Mann, 1975.** Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. H Barnes (Ed) *Proc 9<sup>th</sup> Europ Mar. Biol. Symp.* Aberdeen Univ. press, Scotland : 587-607.

N° RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUSION	NB pages
DRV/RA							
RA-2003-01	RA	LCM Sète	Hamon P.Y., C. Vercelli, Y. Pichot, F. Lagarde, P. Legall, J. Oheix	Les malaïgues de l'étang de Thau; Tome 1. Description des malaïgues, moyens de lutte, recommandations	janv	libre	64
RA-2003-02	RA	LAC Nouvelle Calédonie	Goarant C., D. Ansquer, J. Herlin, D. Domalain, F. Imbert, A.L. Marteau	Bases des connaissances sur l'épidémiologie de <i>Vibrio nigripulchritudo</i> , agent étiologique du "Syndrome d'été" chez les crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie	février	libre	27
RA-2003-03	RA	LCB La Trinité sur Mer	Fleury P.G., F. Cornette, S. Claude, H. Palvadeau, S. Robert, F. d'Amico, P. Le Gall, C. Vercelli, S. Pien	REMORA Résultats des stations nationales, année 2001	mars	libre	48
RA-2003-04	RA	LCB La Trinité sur Mer	Fleury P.G., C. Simonne, S. Claude, H. Palvadeau, P. Guilpain, F. d'Amico, P. Le Gall, C. Vercelli, S. Pien	REMORA Résultats des stations nationales, année 2002	mars	libre	49
RA-2003-05	RA	LAT Tahiti	Vonau V., C. Rouxel, D. Saulnier, N. Cochennec-Laureau, G. Nedelec et E. Goyard	Génotypage des géniteurs de <i>Lates calcarifer</i> de Tahiti: aide à la domestication raisonnée du Loup Tropical pour la filière Tahitienne	avril	libre	20
RA-2003-06	RA	LCPC La Tremblade	Soletchnik P., O. Le Moine, N. Faury, P. Guilpain, P. Geairon, D. Razet, P. Madec, S. Robert, S. Taillade et A. Doner	Contributions du Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes au défi MOREST en 2002	mai	libre	37
RA-2003-07	RA	RA, Brest	Coordination Jean BARRET	Publication 2002 du Département des Ressources Aquacoles	juin	libre	163
RA-2003-08	RA	LCM Sète	Le Gall P., F. Lagarde, Y. Pichot, H. Grizel, P.Y. Hamon et C. Vercelli	REseau Mollusques des Rendements Aquacoles de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> sur les côtes françaises (REMORA). Résultats des stations nationales et régionales dans l'étang de Thau pour l'année 2002	juin	libre	35
RA-2003-09	RA	LCPC La Tremblade	Faury N.(coord.), P. Geairon, J. Moal, S. Pouveau, D. Razet, M. Ropert, P. Soletchnik	Les analyses biochimiques de Protéines Lipides Glucides dans la chair des coquillages. Table ronde Ifremer Nantes 11 mars 2003	septembre	libre	75