Cirad-Département EMVT
Campus de Baillarguet, TA 30
34398 MONTPELLIER Cedex 5

Université Montpellier II
UFR Sciences
Place Eugène Bataillon
34095 MONTPELLIER Cedex 5

MASTER 2ème ANNEE
BIOLOGIE GEOSCIENCES AGRORESSOURCES ET ENVIRONNEMENT
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

MECANISMES D'ACCUMULATION POSTMORTEM D'HISTAMINE DANS LES POISSONS ET METHODES DE DOSAGE

Pierre PELLISSIER

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

000098441

année universitaire 2006-2007

Sommaire

Introduction
I. Les mécanismes d'accumulation d'histamine 4

1.1. L'histamine 4

1.1.1. Définition 4

1.1.2. Les mécanismes d'accumulation de l'histamine 5

1.1.2. a. L'histamine d'origine physiologique 5

1.1.2. b. L'histamine d'origine bactérienne 5

1.2. Les atteintes de l'histamine sur la santé humaine 7

1.2.1 Toxicité 7

1.2.2 Symptômes 9

1.2.3 Aspects médicaux 9

1.2.4 Dose toxique 10

1.3 Les normes du marché international à l'exportation 10

1.4 Influence de la température de stockage sur l'accumulation de l'histamine dans la chair poisson 11

II. Méthodes de dosages 17

2.1. Méthodes de « référence » 17

2.1.1 Chromatographie sur Couche Mince : CCM 18

2.1.2 Chromatographie Liquide Haute Pression : HPLC 19

2.2. Méthodes rapides 22

2.2.1 Méthodes Qualitatives 23

2.2.2 Méthodes semi-quantitatives 24

2.2.3 Méthodes quantitatives 25

2.2.3. a La chromatographie en phase gazeuse 25

2.2.3. b Méthode enzymatique rapide d'analyse quantitative de l'histamine 27

Conclusion
Bibliographie

Résumé

Le développement du marché des poissons « bleus » pose un problème de sécurité alimentaire important : celui de l'histamine. En effet, le risque histaminique, déjà important dans les conserves de thon, l'est encore plus dans les cas de poissons réfrigérés, puisque l'histamine peut continuer à se former pendant le transport et la commercialisation du produit par l'activité des bactéries.

L'ingestion de produits contaminés peut engendrer de fortes réactions allergiques qui varient en intensité selon la sensibilité des individus et la dose ingérée.

Les scientifiques ainsi que les professionnels de la pêche sont de plus en plus sensibles à ce problème. Les laboratoires de contrôle des produits de la pêche destinés à l'exportation effectuent des tests sur chaque lot en utilisant le plus souvent comme test de référence la chromatographie liquide haute pression (HPLC). Certains pêcheurs souhaitent néanmoins arriver à doser l'histamine dans chaque poisson susceptible de contenir l'amine biogène grâce à des tests rapides, peu coûteux et faciles à mettre en œuvre.

Mots-clés

Histamine, poisson (scombridé, thonidé, ...), intoxication, bactérie, norme, technique d'analyse de « référence » et kit rapide

Introduction

Les scombridés et les thonidés, mais aussi d'autres espèces de poissons, ainsi que certains aliments (fromages, vins...) peuvent contenir des taux élevés d'histamine. Dans ce cas, les consommateurs peuvent être intoxiqués. De plus, si les poissons ne répondent pas aux normes du marché international, la totalité du lot de pêche est détruit. La destruction totale du lot entraine d'importantes pertes économiques pour les pêcheurs qui souhaitent exporter.

L'histamine est en grande partie formée à partir de l'histidine sous l'action bactérienne. Le thon, la sardine, l'anchois et l'espadon sont des poissons riches en histidine. Le taux d'histamine augmente lorsque le poisson n'est pas saigné, éviscéré et réfrigéré rapidement après sa capture. L'arrêté du 29 décembre 1992 précise les conditions d'appréciation de la qualité des lots de ces poissons à risque. En raison de sa thermostabilité, l'histamine peut aussi être présente à des taux élevés dans les produits mis en boîte.

Depuis maintenant plus d'un demi-siècle un important nombre de techniques d'analyse sont proposés afin de doser l'histamine.

.

I. Les mécanismes d'accumulation d'histamine

1.1. L'histamine

1.1.1. Définition

L'histamine a été découverte par AKERMAN en 1910. Ce neuromédiateur est largement impliqué dans les phénomènes inflammatoires et allergiques. L'histamine est une amine hétérocyclique provenant du métabolisme des cellules vivantes. Dans le domaine alimentaire, l'histamine est d'origine microbienne et résulte de la décarboxylation de l'histidine (figure 1).

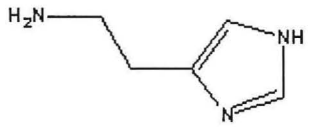

Figure 1 : l'histamine (Encyclopédie Wikipédia)

1.1.2. Les mécanismes d'accumulation de l'histamine

Mise à part celle qui existe naturellement dans les tissus, qui est préformée et d'origine physiologique, et celle qui se forme en faible quantité pendant l'autolyse, l'histamine provient essentiellement de la décarboxylation bactérienne de l'histidine.

1.1.2. a. L'histamine d'origine physiologique

Dans notre corps, l'histamine est synthétisée à partir d'un acide aminé: l'histidine. Elle est stockée principalement dans les cellules immunitaires, les mastocytes qui la libèrent lorsqu'ils sont stimulés par la présence d'une molécule étrangère comme un allergène. L'histamine appartient aux amines biogènes qui se définissent comme des amines biogènes formées dans l'organisme. Elles sont biologiquement actives sur le système nerveux central et sur le système vasculaire.

Dans les poissons à chair rouge, riches en histidine, KIMATA et KAWAI (1951) ont montré que, dans les conditions les plus favorables (pH : 4,7, température d'environ 40° C), la formation d'histamine par autolyse ne dépasse pas 15 mg/100 g et n'explique pas la disparition d'histidine observée.

Dans le domaine alimentaire, l'acception du terme « amines biogènes » correspond en fait aux amines non volatiles. Elles proviennent de la décarboxylation des acides aminés par des enzymes bactériennes et tissulaires.

1.1.2. b. L'histamine d'origine bactérienne

On observe que l'histamine se forme dans les poissons riches en histidine (thons, bonite, maquereau, sardine, saumon...) et d'autant plus vite que la texture de la chair favorisera la prolifération bactérienne. Tous ces poissons ont en effet une teneur en histidine au moins égale à 0, 5 %, variable avec la saison, qui implique un risque d'intoxication. Chez les thonidés elle atteint même 1 % (HIBIKI et SIMIDU, 1959). La formation d'histamine est essentiellement d'origine microbienne. Les microorganismes producteurs sont essentiellement mésophiles, ce sont notamment des Entérobactéries.

En 1951, parmi les nombreuses souches de bactéries provoquant l'altération du poisson, KIMATA et KAWAI (1951) n'en ont trouvé qu'une, *Proteus morganiii*, appelée aujourd'hui *Morganella morganii* qui produise de l'histamine de façon notable à partir de l'histidine.

VAN VEEN et LATUSAN (1950) estiment que les bactéries seraient capables de produire en deux jours, dans 100 g de poisson salé et séché, plus de 350 mg d'histamine (soit 3500 ppm). Les auteurs ont isolé deux souches produisant l'histamine par décarboxylation de l'histidine. Toutes

deux résistent à des solutions saturées de sel et sont capables de vivre dans des conditions aérobies et anaérobies. Les meilleurs résultats de culture sont obtenus, comme pour *Morganella morganii*, vers 30 degrés avec un pH de 5 à 6.

KAWABATA et coll. (1955) ont isolé 78 souches de bactéries dans des échantillons de thon obèse du Pacifique (Pacathunnus mebachi) ayant provoqué des allergies. Onze seulement de ces souches étaient capables de produire de l'histamine dans un milieu formé de chair de maquereau, *Proteus vulgaris* (5 souches), *Proteus mirabilis* (3 souches) et *Morganella morganii* (3 souches). Seules ces trois dernières produisaient de l'histamine en grande quantité dans la chair crue broyée des thons, sans que s'accroisse la teneur en ammoniaque et sans que se modifient l'apparence et l'odeur.

KIMATA et KAWAI (1951) constatent l'existence, sur la peau du poisson frais, de bactéries productrices d'histamine, représentant environ 1 % de la population bactérienne totale. Il retrouve ensuite ces bactéries sur le matériel en contact avec le poisson (filets, boites...). **Tous les auteurs remarquent que les conditions optima de formation d'histamine sont celles qui favorisent le mieux le développement des bactéries**. D'après KIMATA, la vitesse de formation de l'histamine, à teneur en histidine égale, dépend de l'espèce de poisson. SIMIDU et MIBIKI (1954) attribuent les différences de dégradation d'une espèce à l'autre aux propriétés physiques particulières de chaque espèce. L'auteur ne constate pas, en effet, de différence entre le thon, le maquereau, la sardine et la bonite lorsque les muscles sont hachés. Les muscles hachés conservés à la même température donnent des produits de dégradation identiques et en mêmes quantités, sans toutefois que la teneur en histamine soit proportionnelle à la disparition d'histidine.

Morganella psychrotolerans a été isolée de poissons (orphies, thons, lompes) ayant provoqués des intoxications histaminiques chez l'homme. Contrairement aux souches de *Morganella morganii* qui ne produisent de l'histamine qu'à des températures supérieures à 7-10 °C, les souches de *Morganella psychrotolerans* peuvent produire de l'histamine à des températures comprises entre 0 et 5 °C. Aussi, même les produits correctement réfrigérés peuvent présenter un danger.

BOYER, à la suite d'une intoxication collective par du thon rouge, apparemment en bon état de conservation, a examiné de nombreux poissons dont les taux d'histamine mis en évidence allaient de 2 mg/100 g, valeur normale, à 400 mg/100 g.

WILLIAMS trouve des teneurs en histamine inférieures à 6 mg/100 g dans des conserves préparées à partir de matériel en bon état (thons et sardines). En revanche, si le poisson est altéré, les conserves peuvent contenir jusqu'à 350 mg d'histamine pour 100 g de chair.

1.2. Les atteintes de l'histamine sur la santé humaine

1.2.1 Toxicité

L'histamine libre ingérée par voie buccale est toxique. L'intoxication à l'histamine est une intoxication chimique liée à la consommation d'aliments contenant de grandes quantités d'histamine. Lorsque plusieurs cas surviennent à la suite de la consommation d'un même aliment, cette intoxication entre dans le cadre des Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIAC) qui sont des maladies à déclaration obligatoire en France. L'aliment en cause est presque toujours un poisson. Les plus souvent incriminés appartiennent aux familles des Scombridae (thon rouge, germon, bonites, maquereau) et des Scomberesocidae (balaous) d'où le terme anglais très répandu de « Scombroid Fish Poisoning ».

Plusieurs facteurs peuvent modifier la toxicité de l'histamine. En effet, pour agir, l'histamine exogène doit passer du contenu intestinal dans le sang. D'après MORDELET, DAMBRINE et PARROT, une très faible part est absorbée sous forme libre et active, la plus grande partie se trouve

- soit inactivée par acétylation : elle passe alors dans le milieu intérieur et elle est excrétée par les reins ;
- soit retenue dans l'intestin par suite de sa captation par la mucine. Le mécanisme protecteur est inhibé par l'action de certaines diamines, telles que la putrescine et la spermine.

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

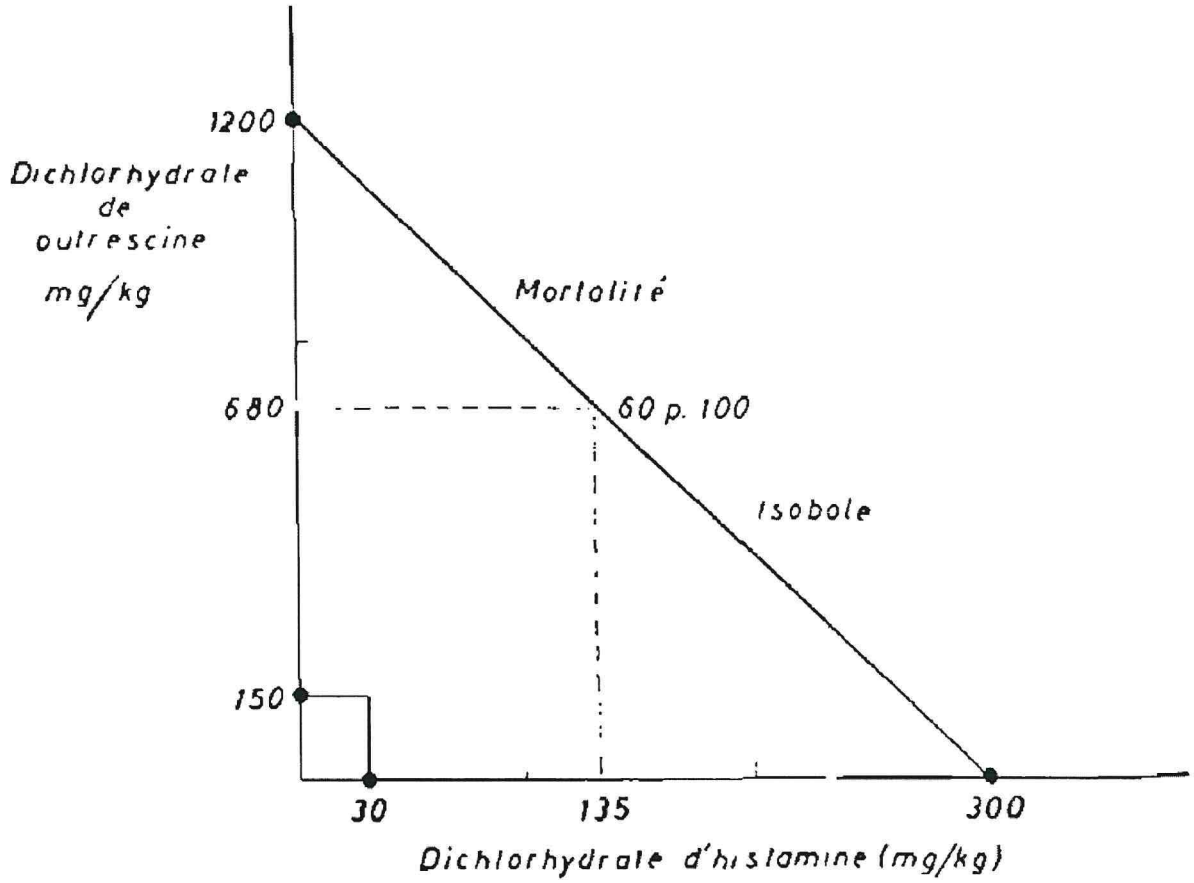

Figure 2 : Toxicités du dichlorhydrate d'histamine (H) et du dichlorhydrate de putrescine (P) administrés à des cobayes par voie œsophagienne (doses en mg/kg).Représentation des isoboles pour la mortalité de 60 % d'après les données de PARROT, GABE ET HERRAULT (1947).

La figure 2 présenté ci-dessus montre que la mortalité 60% est obtenue soit avec 300 mg/kg de H seule, soit avec 1 200 mg/kg de P seule, soit avec 30 mg/kg de H associée à 150 mg/kg de P. S'il y avait simple addition de toxicité, cette même mortalité de 60 % pourrait être obtenue par n'importe quelle combinaison de doses indiquées par la droite oblique (ex. : dans les mêmes proportions, 135 de H et 680 de P). La toxicité est donc considérablement accrue, il a suffi de quatre fois moins de H et de quatre fois moins de P ; d'après PARROT et NICOT, 1965.

On sait aujourd'hui que d'autres amines biogènes agissent en synergie pour augmenter la toxicité de l'histamine (HUI et TAYLOR, 1983)

Aux États-Unis, les intoxications alimentaires résultant de l'ingestion de Scombroidae contenant de grandes quantités d'histamine sont considérées comme la première cause d'intoxications ou de toxi-infections alimentaires dues à la consommation des produits de la pêche et la bactérie la plus souvent en cause est *Morganella morganii*. En France, les intoxications histaminiques sont également en têtes des toxi-infections alimentaires liées à la consommation de produits de la pêche.

Il est également important de noter que la prolifération bactérienne n'étant pas partout la même dans un poisson, la formation d'histamine pourra être sensiblement plus faible vers la queue que dans la partie ventrale. Un même poisson, indépendamment de la sensibilité personnelle de chacun, n'incommodera donc pas forcément tous ceux qui en auront consommé.

1.2.2 Symptômes

Lorsqu'une personne est exposée à une dose trop forte en histamine, les symptômes d'une réaction peuvent apparaître sans avertissement; ils peuvent être retardés; ils peuvent aussi survenir en deux épisodes, ou encore, ils peuvent se manifester rapidement, leur intensité évoluant de légère à sévère en peu de temps. Au nombre des symptômes les plus dangereux figurent les difficultés respiratoires et une chute de la pression artérielle ou un état de choc, qui peuvent entraîner une perte de conscience et même la mort. Une personne qui a une réaction allergique peut éprouver n'importe lequel des symptômes suivants :

- troubles respiratoires, difficulté à parler ou à avaler;
- chute de la pression artérielle, accélération du rythme cardiaque, perte de conscience;
- bouffées de chaleur au visage, urticaire ou éruption cutanée, rougeur et démangeaison de la peau;
- enflure au niveau des yeux, du visage, des lèvres, de la gorge et de la langue;
- anxiété, détresse, étourdissements, pâleur, sentiment d'alarme, faiblesse;
- crampes, diarrhée, vomissements.

En général, la période d'incubation est courte, elle varie de quelques minutes à quelques heures. Les symptômes disparaissent spontanément en quelques heures (3 heures en général). Exceptionnellement, ils peuvent durer plusieurs jours dans les cas les plus graves.

1.2.3 Aspects médicaux

L'incidence de ce phénomène, trop souvent pris pour une allergie alimentaire, est sous-estimée à cause d'un mauvais diagnostic. Les intolérances à l'histamine traduisent manifestement une prédisposition individuelle et entrent dans le cadre des maladies dites "fausses allergies alimentaires" car elles miment cliniquement l'allergie alimentaire sans mettre en jeu de mécanismes immunologiques de type IgE dépendant. Ainsi, certains patients présentent des symptômes lors de l'ingestion d'aliments contenant de l'histamine à des doses parfaitement bien tolérées par des sujets normaux. Par ailleurs, l'ingestion d'aliments contenant des doses élevées d'histamine comme certains poissons ou certains fromages, peut entraîner chez tous les sujets une réaction ressemblant

à une réaction anaphylactique de sévérité proportionnelle à la quantité ingérée pouvant aller au choc histaminique.

Une fois libérée, l'histamine va agir en se fixant sur des récepteurs cellulaires spécifiques dont il existe deux formes. Les récepteurs de type 1 (H1) sont présents partout dans le corps et ils sont impliqués dans l'inflammation, tandis que les récepteurs de type 2 (H2), présents au niveau de l'estomac, interviennent dans la sécrétion acide de l'estomac. En usage local, par voie orale ou injectable, les antiallergiques antihistaminiques sont des médicaments qui vont empêcher l'action de l'histamine au niveau de ces récepteurs et diminuer les symptômes de l'allergie (œdème). Les récepteurs H3, surtout pré synaptiques, présents notamment dans le cerveau, et les récepteurs H4 ont été décrits plus récemment.

1.2.4 Dose toxique

La dose seuil entraînant le débordement des systèmes de détoxication est très difficile à déterminer. Elle dépend de multiples facteurs dont la variabilité individuelle.

On admet généralement que des teneurs en histamine inférieures à 50 mg.kg-1 sont sans effet toxique. De 50 à 100 mg.kg-1, on observe quelques intoxications légères. De 100 à 1000 mg.kg-1, le produit est toxique. Toutefois, on observe une recrudescence des foyers d'intoxication histaminique, les aliments impliqués contenant parfois d'assez faibles quantités d'histamine. Il existe donc des sujets très sensibles et leur proportion augmente.

1.3 Les normes du marché international à l'exportation

L'histamine serait la plus toxique des amines biogènes (Taylor, 1987). Elle a donc fait l'objet de directives de recommandations ou encore de projets de norme dans de nombreux pays.

Vu la directive 91/493/CEE du Conseil du 22 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche, modifiée par la loi du 30 Décembre 1992, no. 531 [1], puis par la directive 95/76/CE du 31 Décembre 1996 [2];

Vu l'avis du Conseil d'expertise vétérinaire, donné le 25 avril 2000;

Vu La réglementation (Règlement communautaire (2073/2005)) qui fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche.

Les conditions d'acceptation du lot sont les suivantes:

- Pour le contrôle de la teneur en histamine dans le poisson, neuf échantillons (n=9) sont prélevés sur chaque lot.
- Pour les poissons des familles Scombridae, Clupeidae, Engraulidae et Coryphaenidae, s'appliquent les limites suivantes:

- la teneur moyenne ne doit pas dépasser 100 ppm (m) ;
- deux échantillons (c=2) peuvent avoir une teneur dépassant 100 ppm mais n'atteignant pas 200 ppm (M) ;
- aucun échantillon ne doit avoir une teneur dépassant 200 ppm.

Les examens doivent être effectués avec des méthodes fiables qui sont scientifiquement reconnues, telles que la méthode HPLC.

Ces limites s'appliquent seulement aux poissons des familles suivantes :

- *Scombridés* : maquereaux, auxides, thonites, thons, thazards, palomettes, bonites,
- *Clupéidés* : harengs, menhadens, ethmaloses, harengules, chardins, sardines, sardinelles, sardinons, sprats, shadines,
- *Engraulidés* : anchois ;
- *Coryphaenidés* : coryphènes.

Toutefois, les poissons de ces familles qui ont subi un traitement de maturation enzymatique dans la saumure peuvent avoir des teneurs en histamine plus élevées mais ne dépassant pas le double des valeurs indiquées ci-dessus.

Les difficultés pour fixer une valeur limite toxique pour l'histamine sont dues à l'action de potentialisateurs, imparfaitement élucidée. Les seuils retenus ne prennent pas en compte le rôle synergique exercé par d'autres composés que l'histamine (présence d'autres amines biogènes dans la denrée). La présence d'inhibiteurs d'enzymes de détoxification permet à l'histamine d'exercer ses effets toxiques. L'alcool et certains médicaments, notamment les antidépresseurs, auraient un effet inhibiteur sur ces enzymes (notamment les amines oxydases) (CRAHAY et NOIRFALISE, 1996).

1.4 Influence de la température de stockage sur l'accumulation de l'histamine dans la chair de poisson

Le rôle de l'autolyse dans la formation de l'histamine est tout à fait mineur. Par conséquent, le seul moyen de prévention consiste à limiter la prolifération microbienne par le respect des conditions d'hygiène et par un suivi rigoureux de la chaîne de froid. En effet l'histamine est thermostable, elle n'est donc détruite par aucun procédé industriel. La stabilité de l'histamine à l'appertisation a été confirmée par HILLIG (1956). Ce sont des mesures préventives qui doivent être appliquées. Si les conditions sont favorables, la production d'histamine peut être très rapide. Puisque l'origine est microbienne, une réfrigération rapide est nécessaire et le respect de la chaîne

du froid est essentiel (Figure 3). Ce problème est d'autant plus important, dans le cas du thon et de la sardine, que ces poissons sont surtout pêchés dans les mers chaudes. Par ailleurs une éviscération rapide, avant réfrigération, limite la contamination.

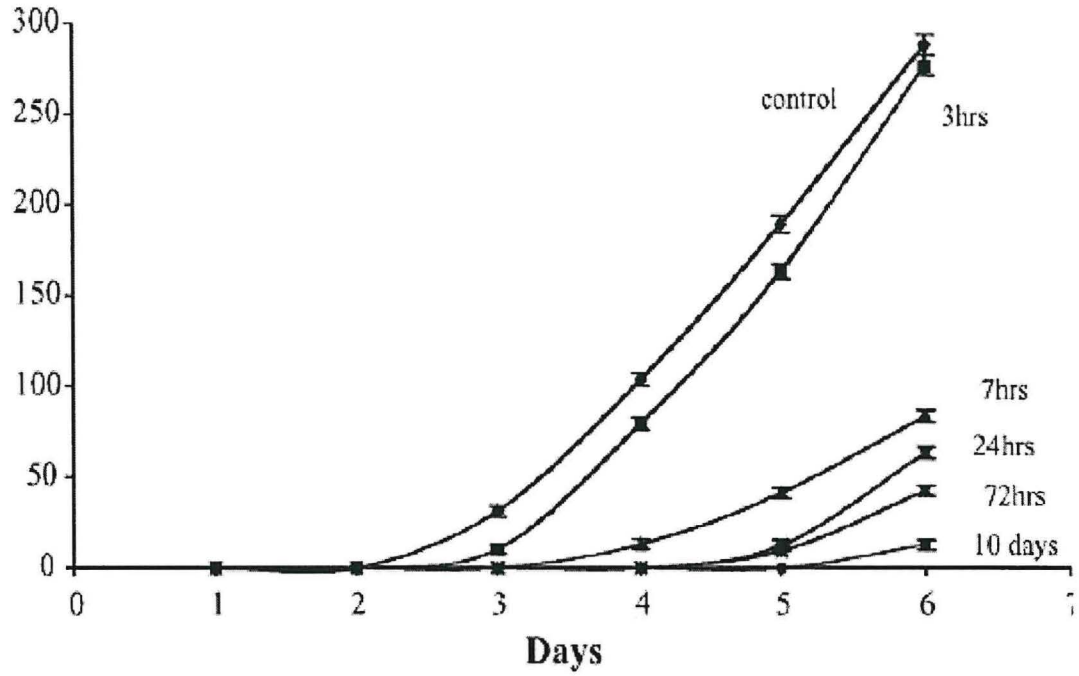

Figure 3 : Influence du temps de congélation sur la production d'histamine dans les anchois. *Echantillons stockés à −20 ◦C pendant 3 h, 7 h, 24 h, 72 h et 10 jours. Après ce temps de stockage les poissons sont conservés à 4 ◦C pour faire les mesures au court du temps* (ROSSANO, MASTRANGELO, UNGARO, RICCIO; 2006).

Si la formation d'histamine est souvent rapide, plusieurs auteurs remarquent qu'elle est parfois inhibée ou même que l'histamine peut être détruite. Les bactéries productrices d'histamine peuvent être tuées par un entreposage prolongé à basse température. OTA et KANEKO (1958) ont montré, par exemple, qu'il ne se formait plus d'histamine dans les maquereaux et les sardines entreposés 76 jours entre —16° C et —21° C (Figure 4).

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

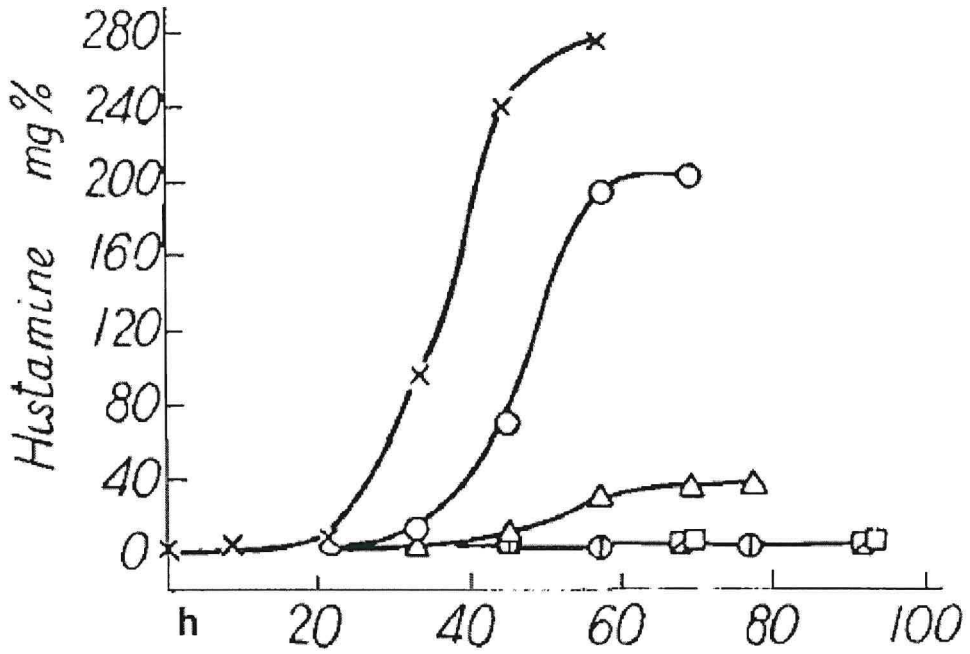

Figure 4 : Formation d'histamine dans le muscle de maquereau décongelé après entreposage à l'état congelé dans différentes conditions *(croix : non congelé, témoin ; cercles : entreposé 11 jours entre —16° C et —21° C ; triangles : entreposé 25 jours entre —10° C et— 16° C ; carrés : entreposé 76 jours entre —16° C et —21° C ; cercles barrés : entreposé 76 jours entre— 10° C et —16° C; carrés barrés: entreposé 76 jours entre —5° C et —9° C)* (d'après OTA et KANEKO, 1958).

HIBIKI et SIMIDU (1959) ont montré, par ailleurs, que l'histamine ne se forme plus dans la chair qui a été portée à température au moins égale à 60° C même si elle est ensuite maintenue à la température optima de 24° C (Figure 5). Les auteurs voient, là aussi, une conséquence normale de la disparition des bactéries dans la chair, d'autant plus qu'ils constatent dans les deux cas que la formation d'histamine reprend après réensemencement du milieu (Figure 6).

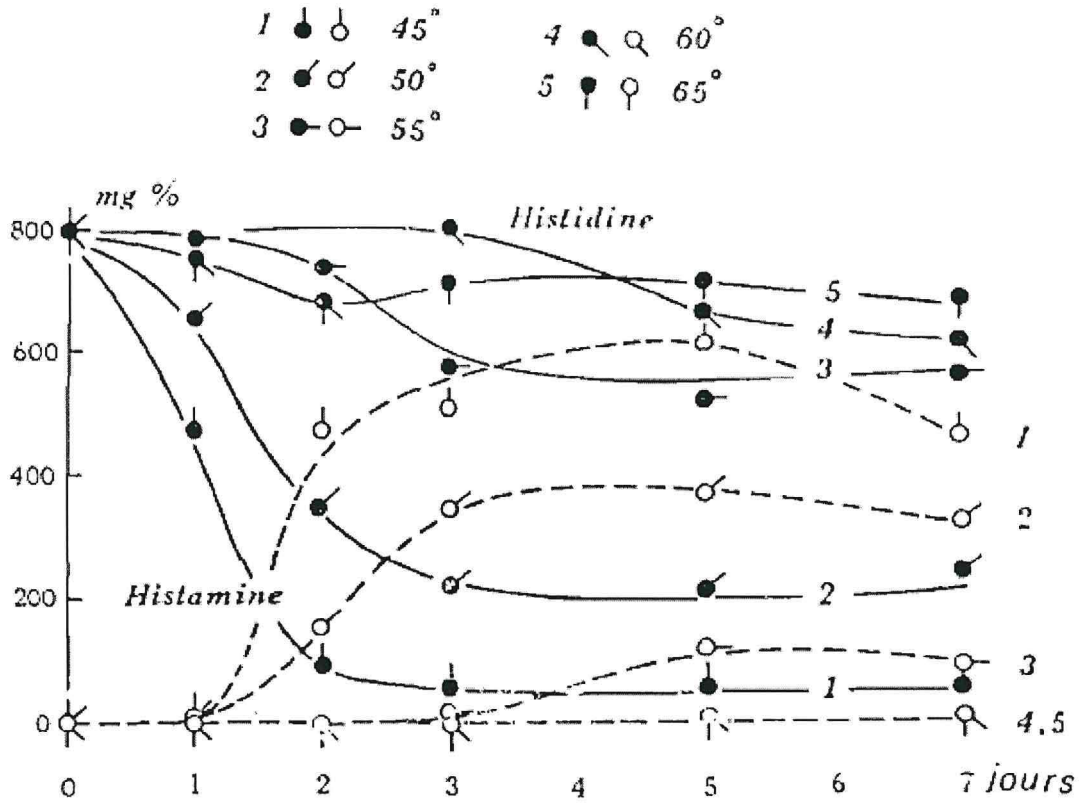

Figure 5 : Variation de la teneur en histidine et en histamine dans la chair de patudo portée, pendant 2 heures, à différentes températures de 45° C à 65° C puis maintenue à 24° C pendant 7 jours (d'après HIBIKI et SIMIDU, 1959)

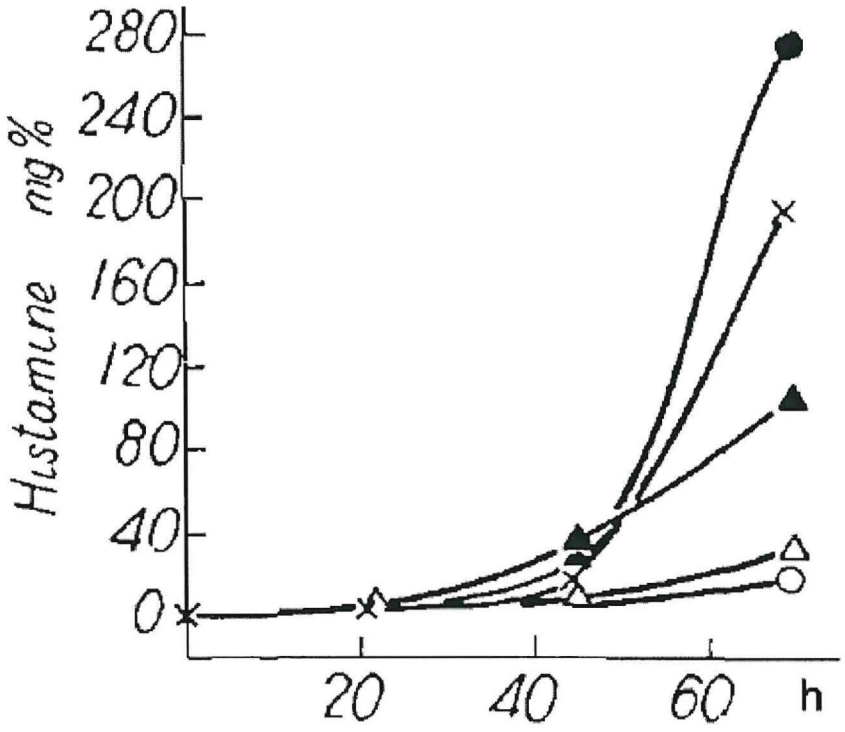

Figure 6 : Accélération de la formation d'histamine dans la chair de maquereau (à gauche) et de hareng (à droite) décongelée après inoculation, au moment de la décongélation, de poisson altéré. Croix : témoin, cercles :entreposé 50 jours entre —16° C et —21° C, cercles noirs: entreposé 50 jours entre —16° C et —21° C (inoculé), delta: entreposé 50 jours (maquereau) et 34 jours (hareng) entre —10° C et —16° C, delta noir: entreposé 50 jours (maquereau) et 34 jours (hareng) entre — 10° C et— 16° C (inoculé) ; d'après OTA et KANEKO, 1958.

SIMIDU et MIBIKI (1954) a montré que la formation d'histamine dans le muscle rouge est partiellement empêchée lorsqu'apparaît l'oxyde de triméthylamine qui serait donc un agent inhibiteur. Le fait a été vérifié expérimentalement. L'addition de 1 % d'oxyde de triméthylamine bloque pendant cinq jours la formation d'histamine dans la chair entreposée à 18° C.

D'après HIBIKI et SIMIDU (1954), l'addition d'hydrates de carbone (saccharose, glucose, glycogène, glycine, amidon) inhibe partiellement la formation d'histamine (Figure 7). Les mesures de pH montrent que celui-ci décroît pendant l'altération, sauf en présence d'amidon où il croît normalement.

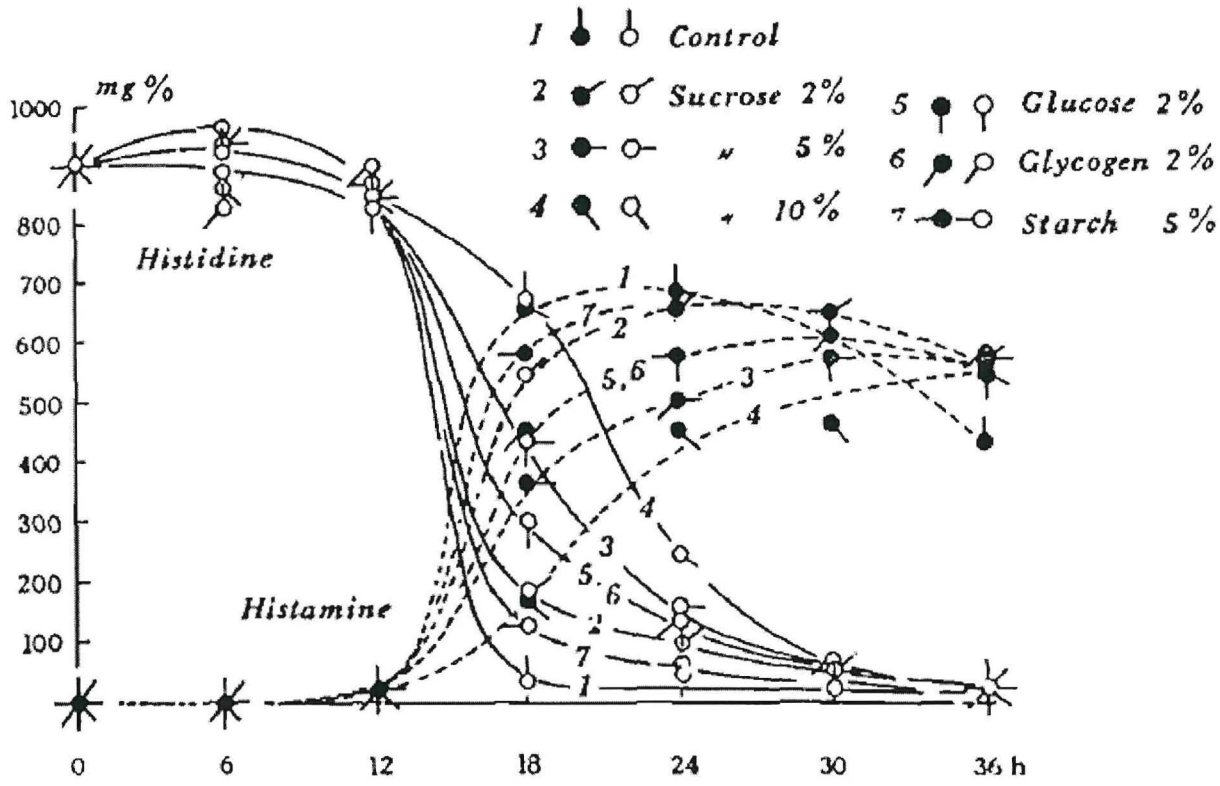

Figure 7 : Influence de certains hydrates de carbone (saccharose, glucose, glycogène et amidon) sur la formation d'histamine dans la chair hachée de patudo incubée à 28° C (d'après HIBIKI et SIMIDU, 1959).

DABROWSKI et STODOLNIK (1966) constatent que dans le hareng de la Baltique, l'altération bactérienne conduit à la formation d'histamine et d'autres dérivés de l'imidazole, mais que la teneur en histamine diminue considérablement pendant la conservation.

Enfin TAKAGI et coll. (1969) ont observé que, dans le maquereau Atka séché à 20° C, la teneur en histamine augmente pendant le séchage, jusqu'à 667 mg/100 g de chair à 66, 9% d'humidité. Toutefois, en fin de séchage lorsque l'humidité de la chair est d'environ 20 %, le taux d'histamine tombe rapidement à 22,1 mg/100 g.

Quelques points à souligner (KNOCKAERT, 2006**):**

- Une simple réfrigération, même effectuée dans les meilleures conditions n'aura qu'un effet temporaire sur la qualité du poisson en retardant plus ou moins les phénomènes d'altération.
- La durée de conservation possible du poisson par réfrigération varie avec l'espèce et la taille des individus. Pour donner une idée et sans qu'il puisse s'agir de limites précises, les temps de conservation du poisson réfrigéré varient entre 4 et 14 jours.
- Dans la pratique, le délai qui s'écoule entre la capture du poisson et sa consommation excède parfois ces temps de conservation ; des inégalités de qualité sont alors à craindre.

- Les bactéries d'origines marines se développent dans une zone de température inférieure à celle qui convient aux bactéries terrestres ou d'eau douce. De nombreuses expériences ont démontré une différence très nette dans la conservation des caractères de fraîcheur, suivant que la température est à 0 degrés ou à quelques degrés au dessus.

Amélioration de la qualité des produits

Pour obtenir un poisson de qualité, il est important de maîtriser la technique de pêche et respecter trois chaînes : de préparation après la sortie de l'eau, du froid et de l'hygiène. Il faut que l'ensemble soit cohérent, sans rupture et constitués de maillons sûrs. Il convient de remarquer, que si la notion de chaîne du froid est couramment admise et généralement bien intégrée, il persiste malgré tout des moments critiques lors des marées où la notion de rendement à la capture prend le dessus par priorité.

Le nouveau concept dit de « chaîne de l'hygiène » est plus difficile à cerner de la part de l'ensemble des intervenants tout au long de la filière, d'une part à cause de son immatérialité (difficulté de visualiser l'aspect hygiénique des surfaces) et d'autre part en vertu du nombre important d'intervenants.

II. Méthodes de dosages

Certaines des méthodes d'analyse de l'histamine incluent la chromatographie liquide à haute pression (MIETZ et KARMAS, 1977), la chromatographie sur couche mince et de nouvelles méthodes enzymatiques rapides.

De nombreuses méthodes ont été publiées dans la littérature scientifique, et sont utilisées pour le contrôle. Parmi celles-ci figurent les tests de fraîcheur basés sur la détection par voie immuno-enzymatique de l'histamine. Toutefois, des méthodes plus fiables, dites de « référence », quantitatives et reconnues scientifiquement depuis près d'un demi-siècle sont à ce jour les plus utilisées dans les laboratoires d'analyses.

2.1. Méthodes de « référence »

Dans les produits alimentaires non fermentés, l'apparition des amines biogènes est le résultat d'une activité microbienne indésirable. Elles peuvent être des indicateurs de fraîcheur du poisson ou de la viande : en effet, la teneur en histamine, putrescine et cadavérine augmente habituellement durant la décomposition de ces produits. Diverses méthodes peuvent être utilisées pour déceler

éventuellement des taux élevés (CCM : chromatographie couche mince, méthodes immuno-enzymatiques). Elles sont considérées comme des méthodes de tri. La méthode retenue dans le Règlement communautaire (2073/2005) est une méthode de chromatographie liquide haute performance (CLHP) qui permet une détermination quantitative des amines biogènes (Malle *et al.* 1996 ; Valle *et al.* 1997 ; Duflos *et al.* 1999).

2.1.1 Chromatographie sur Couche Mince : CCM

La chromatographie sur couche mince permet, dans certaines conditions, une bonne séparation de l'histamine.

Principe de la méthode

Sont utilisées comme références, des échantillons de poisson exempts d'histamine auxquels sont ajoutées des quantités connues d'histamine.

L'échantillon à analyser et les échantillons de référence sont attaqués par l'acide trichloracétique à 10 % afin de précipiter les protéines. Les acides aminés et l'histamine passent dans le filtrat. Celui-ci peut être conservé à température ambiante plusieurs semaines sans subir d'altération gênante pour le dosage de l'histamine. Les dépôts de déféquât trichloracétique sont effectués avec précision sur plaque d'alumine. Après séchage de la plaque, l'histamine est éluée à température ambiante par le mélange éthanol-ammoniaque. L'élution dure environ deux heures pour un déplacement du front de solvant de 10 cm. Dans ces conditions, l'histamine a un Rf de 0,85 tandis que celui de l'histidine est très faible.

Résultats

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

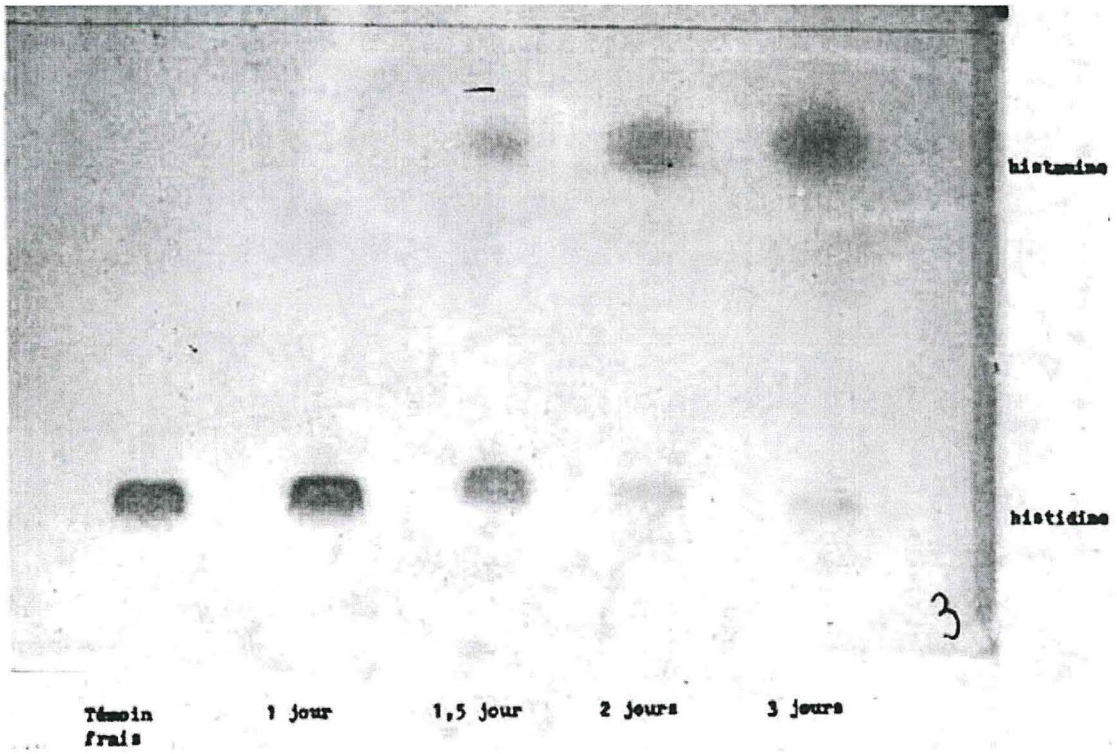

Figure 8 : Plaque de chromatographie sur couche mince. Des échantillons de muscle « blanc » de thon rouge ont été maintenus à 30° C ; la tache d'histidine disparait alors que celle d'histamine se développe.

Les taches d'histamine (Figure 8), après séchage de la plaque pendant une heure à 60° C sont révélées en rouge par pulvérisation d'un réactif obtenu en mélangeant 0,1 g de sel diazoïque dans 20 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10 %. Aucune substance n'interfère avec l'histamine. Lorsque la teneur en histamine est faible (inférieure à 20 ppm), la tache disparaît en quelques minutes, en revanche, pour des teneurs plus élevées son intensité diminue peu.

Performances

La sensibilité de la méthode est d'environ 0,5 mg/100 g (5 ppm), la précision de la mesure est meilleure que 10 % lorsque la teneur est au moins de 5,0 mg/100 g (50 ppm).

2.1.2 Chromatographie Liquide Haute Pression : HPLC

L'équipe de chercheurs de LAREAL a développé et validé une méthode par H.P.L.C. (Chromatographie Liquide Haute Pression) qui présente l'intérêt d'être sélective, spécifique et extrêmement sensible.

Cette méthode est basée sur une extraction acide de l'échantillon, suivie d'une séparation par HPLC. En raison de la structure des molécules, la détection se fait par l'intermédiaire de dérivés

fluorescents préparés automatiquement en sortie de colonne de chromatographie. Cette automatisation permet de garantir une bonne répétabilité (CV < 3%) et un seuil de quantification de 5 mg/kg (5ppm).

Principe de la méthode

Les amines biogènes sont extraites par l'acide perchlorique 0,2 M et marquées au chlorure de dansyle ; la dérivation des amines est nécessaire pour la détection en absorption UV à 254 nm des dérivés dansylés. Après dérivation, la proline est ajoutée pour fixer l'excès de chlorure de dansyle. La solution est saturée par ajout de toluène. Après décantation, la phase organique contenant les dérivés d'amines biogènes est récupérée après congélation de la phase aqueuse puis évaporée à froid sous flux d'azote. Le résidu sec contenant les amines dérivées est redissous dans 200 ml d'acétonitrile, filtré sur membrane de porosité 0,2 mm puis injecté en HPLC. Les amines sont séparées sur une colonne en utilisant un gradient d'élution eau/acétonitrile. La durée de la séparation est de 30 min. Le chromatogramme présente les 7 pics des amines classiques et celui de l'étalon interne.

Résultats: (Figures 9 et 10)

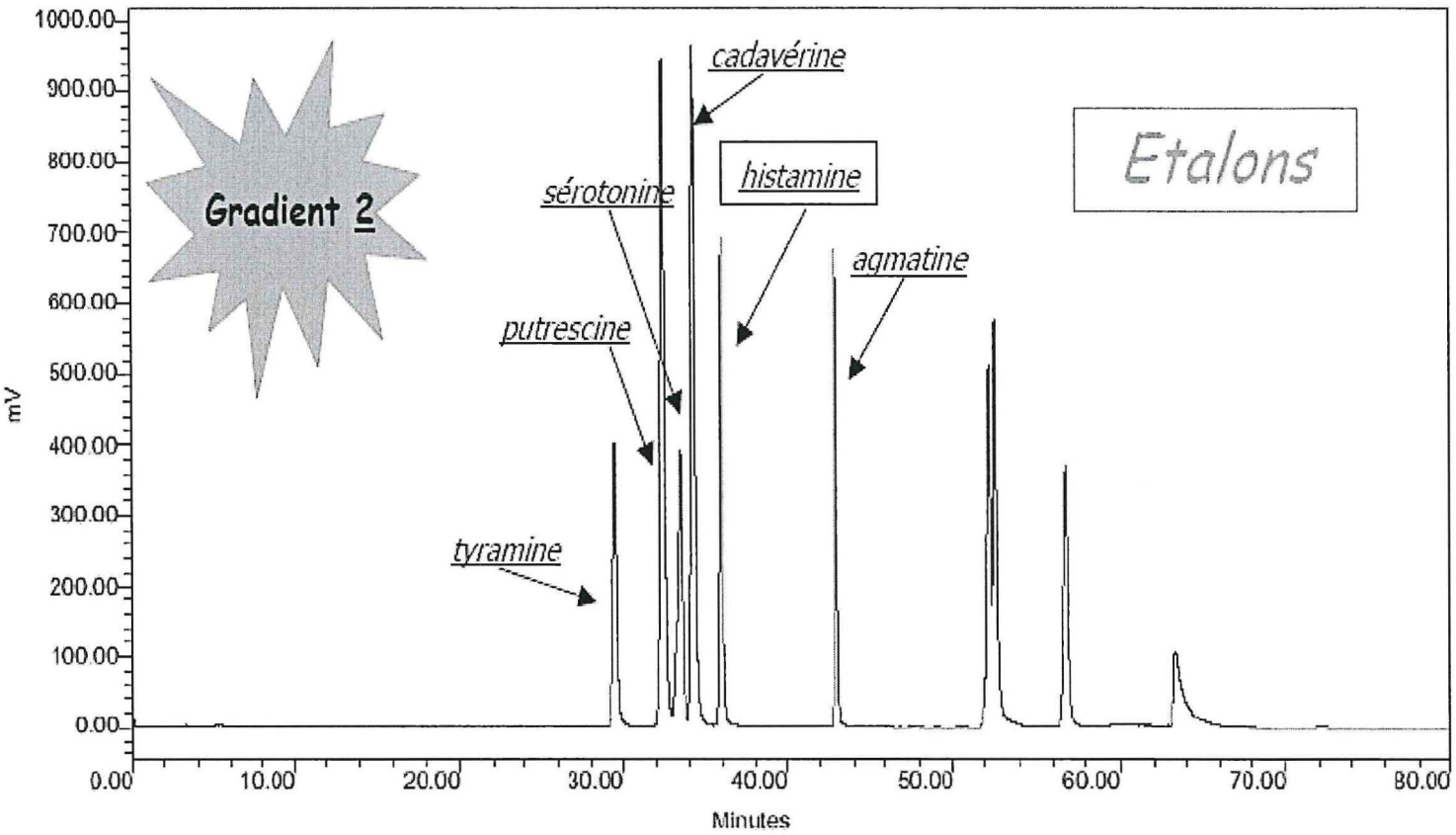

Figure 9 : Chromatogramme présentant les sept pics des amines classiques (méthode LAREAL)

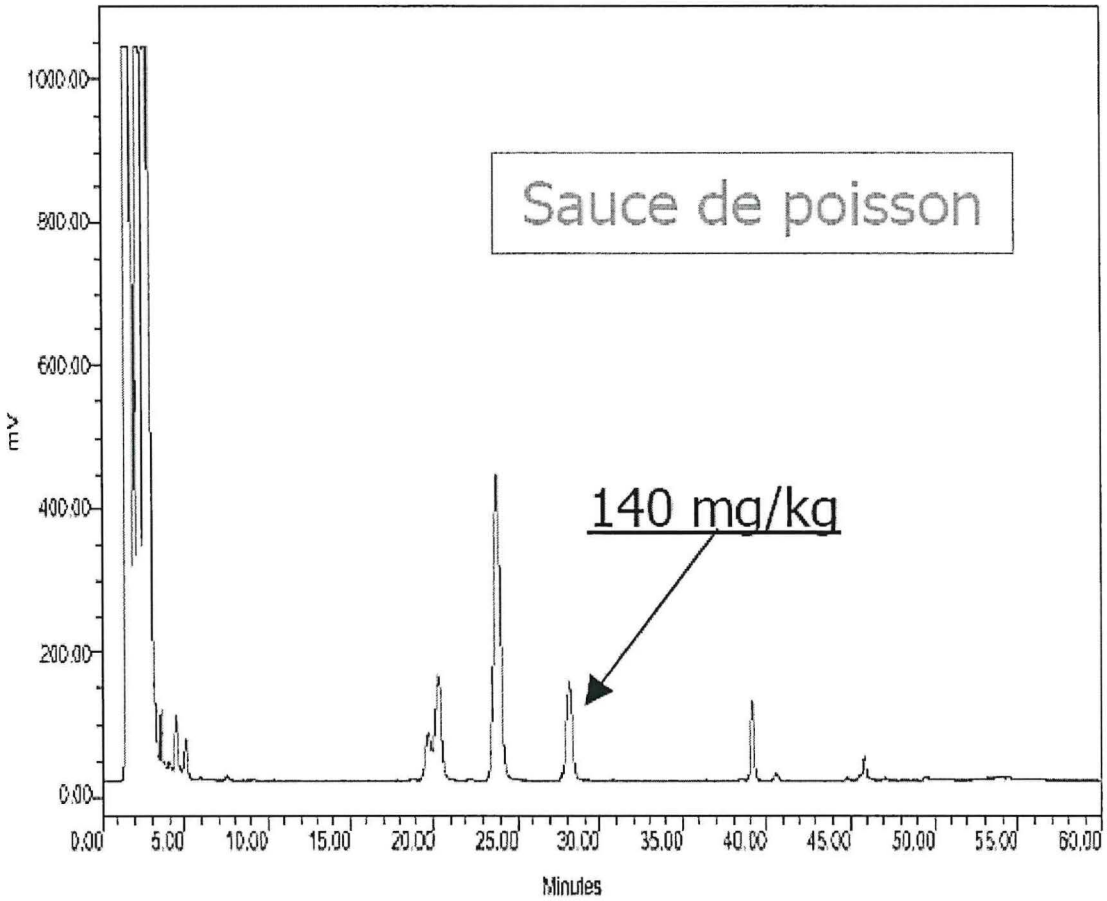

Figure 10 : Chromatogramme d'une sauce de poisson (Méthode LAREAL)

La qualité des résultats a été assurée dès la mise au point du protocole par l'intermédiaire de la participation à un circuit d'inter comparaison. LAREAL a été le premier en France à participer (puis assurer la promotion en France) du circuit canadien de la CFIA (Canadian Food Inspection Agency) qui permet à plusieurs laboratoires à travers le monde de garantir la fiabilité de leurs analyses.

Performances

La méthode est très sensible, reproductible et sont taux de recouvrement dépasse les 90 %. Le seuil de quantification, très bon, est de 5 mg/kg (5 ppm).

2.2. Méthodes rapides

Pour les analyses de routine, la mesure de la concentration en histamine des aliments est effectuée par chromatographie en couche mince suivie d'une révélation colorimétrique. L'étape d'extraction est simple. La spécificité de cette méthode est cependant passable et, bien qu'elle soit facile d'emploi, un laboratoire est nécessaire pour sa mise en œuvre.

Pour les analyses d'expertise, où la détermination de l'histamine doit être effectuée avec le

maximum de fiabilité, l'étape d'extraction est suivie d'une purification par HPLC, elle-même suivie d'une révélation colorimétrique ou fluorimétrique. Cette méthode de dosage de l'histamine est très précise et permet également la détection d'autres amines biogènes. Elle est néanmoins réservée aux recherches, études, expertises car elle nécessite un appareillage complexe et coûteux, et une main d'œuvre hautement qualifiée.

Des méthodes rapides (enzymatiques, notamment) de détection de l'histamine ont donc été étudiées au cours des dernières années.

2.2.1 Méthodes qualitatives

A la recherche d'un test rapide et performant, la confédération des industries de traitement des produits de la pêche maritime (CITPPM) a demandé à Transia-Diffchamb de développer un test qui pouvait répondre au cahier des charges initial suivant :

- fiable et facile à interpréter,
- simple d'emploi (utilisable au pied du bateau),
- rapide (ordre de grandeur : 30 mn),
- faible coût (inférieur au coût de la perte qu'il prévient).

Le kit de détection rapide de l'histamine développé par Transia-Diffchamb et répondant au cahier des charges à été validé en 1995 par l'AFNOR.

Principe du test

Le test est basé sur une réaction immunoenzymatique de compétition et utilise comme support réactionnel des tubes à hémolyse au fond desquels sont solidement fixés des anticorps monoclonaux spécifiques de l'histamine.

Dans un premier temps, l'utilisateur doit broyer quelques grammes de poisson dans une solution d'extraction et doit, avec deux réactifs appropriés, réaliser l'opération qui consiste à complexer l'histamine préalablement extraite de la chair.

Dans un deuxième temps, les extraits sont déposés dans les tubes réactionnels (1 tube par échantillon). Un tube par série est utilisé comme témoin négatif, un tube par série est utilisé pour la réalisation d'un témoin positif.

Un conjugué histamine/enzyme est immédiatement ensuite ajouté dans chaque tube. L'histamine conjuguée entre alors en compétition avec l'histamine libre présente dans l'extrait pour se fixer aux anticorps spécifiques.

Plus la quantité d'histamine dans l'extrait est forte, moins le conjugué histamine/enzyme peut se fixer aux anticorps.

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

Après incubation de 45 minutes à température ambiante, un lavage des tubes est soigneusement réalisé à l'eau distillée ou déminéralisée afin que ne demeurent dans les tubes réactionnels que les éléments fixés aux aux anticorps.

L'étape finale consiste à ajouter un mélange substrat + chromogène dans chacun des tubes et à laisser incuber dix minutes.

Interprétation des résultats

L'interprétation est simple à réaliser :

- Coloration bleue du tube échantillon > coloration du tube témoin positif = échantillon négatif : moins de 100 mg d'histamine/kg,
- Coloration bleue du tube échantillon < coloration du tube témoin positif = échantillon positif : supposé contenir au moins 100 mg d'histamine/kg. Il est alors recommandé de confirmer l'échantillon par une méthode d'expertise (CCM ou HPLC).

Même si une lecture visuelle est toujours possible, le fabriquant recommande l'utilisation d'un lecteur de densité optique (spectrophotomètre adapté), la lecture de faisant dans le jaune à 450 nm (après ajout d'une solution d'arrêt).

2.2.2 Méthodes semi-quantitatives

Principe

Après extraction avec une solution d'acide trichloracétique, l'histamine est couplée à la para-benzoquinone (complexation). Le complexe est alors détecté dans un test ELISA (enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) par compétition, par des anticorps spécifique, qui sont fixés à la surface de tubes en polystyrène.

Les différents kits semi-quantitatifs proposés peuvent être utilisés pour des teneurs en histamine comprises entre 25 et 200 ppm. Une fois les échantillons préparés, la densité optique est lue sur un spectrophotomètre et la valeur indiquée comparée avec les différentes valeurs de densité optique lues à partir des différentes solutions étalons (et concentration en histamine connue : 25; 50; 100 et 200 ppm)

Résultats

- DO (densité optique) étalon 25 ppm ≤ DO de l'échantillon ≤ DO du témoin : la teneur en histamine de l'échantillon est inférieure ou égale à 25 ppm.
- DO de l'étalon 50 ppm ≤ DO de l'échantillon ≤ DO de l'étalon 25 ppm : la teneur en histamine de l'échantillon est comprise entre 25 et 50 ppm.

- DO de l'étalon 100 ppm ≤ DO de l'échantillon ≤ DO de l'étalon 50 ppm : la teneur en histamine de l'échantillon est comprise entre 50 et 100 ppm.
- DO de l'étalon 200 ppm ≤ DO de l'échantillon ≤ DO de l'étalon 100 ppm : la teneur en histamine de l'échantillon est comprise entre 100 et 200 ppm.
- DO de l'échantillon ≤ DO de l'étalon 200 ppm : la teneur en histamine de l'échantillon supérieure ou égale à 200 ppm.

Il est conseillé pour chaque échantillon avec une teneur en histamine supérieure à 100 ppm de confirmer le résultat par une méthode quantitative (DIFFCHAMB).

Performance

Ce test permet d'estimer la teneur en histamine des échantillons jusqu'à une limite de 25 ppm. Des validations externes à la DIFFCHAMB ont montré que ce test est spécifique de l'histamine. Aucune réaction croisée avec d'autres amines biogènes n'a été observée.

2.2.3 Méthodes quantitatives

2.2.3. a La chromatographie en phase gazeuse

Principe:

L'histamine est extraite de l'échantillon grâce à une solution alcaline de méthanol puis injecté dans la colonne chromatographique pour être dosée. Le dosage de l'histamine ainsi contenue dans l'échantillon de chair du poisson prend moins de 20 minutes. La lecture est possible jusqu'à 5000 ppm (BAO-SHYUNG, JIH-TERNG,YOUK-MENG, 2003)

résultats: (figure 11)

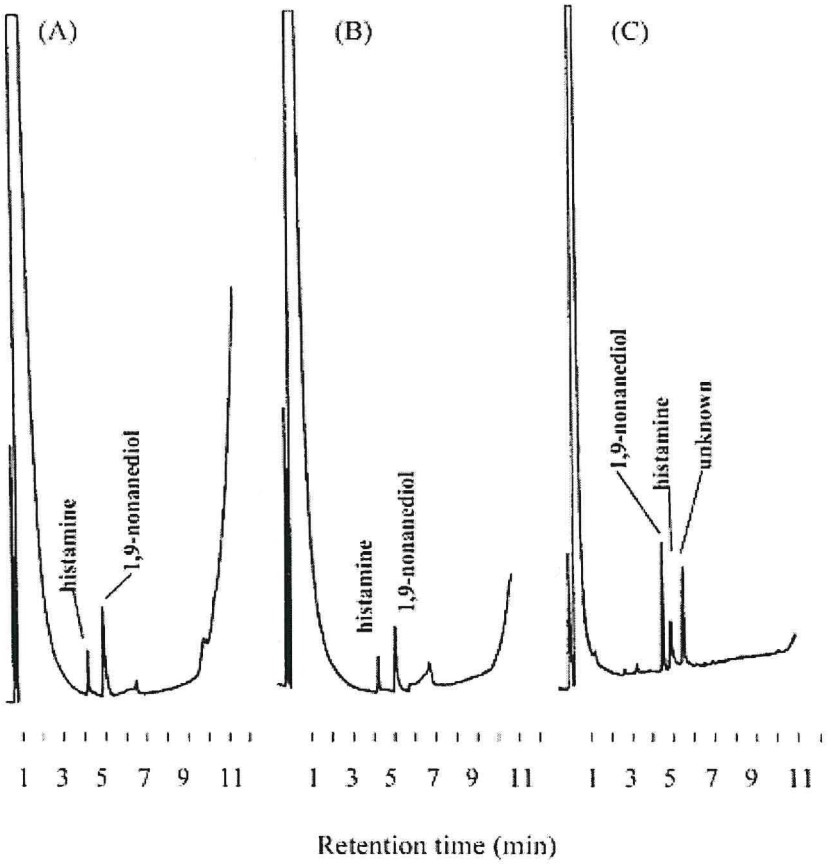

Figure 11 : Chromatogramme obtenue à partir d'extraits de thon en décomposition à différentes polarités. *(A) CP-SIL 5CB; (B) CP-SIL 8 CB; (C) CP-SIL 19 CB.*BAO-SHYUNG, JIH-TERNG, YOUK-MENG.

La figure 11 montre un chromatogramme obtenu dans une colonne chromatographique en phase gazeuse. Selon la polarité, l'histamine est plus ou moins visible. Une formule permet ensuite de déterminer la concentration en histamine contenue dans l'échantillon.

Performance

Méthode quantitative rapide et très fiable. Elle permet, tout comme l'HPLC, de détecter la présence d'autres amines biogènes. Cette méthode est encore à l'essai.

.

2.2.3. b Méthode enzymatique rapide d'analyse quantitative de l'histamine

Principe

Le test est basé sur une réaction antigène-anticorps (Test RIDASCREEN - DIFFCHAMB). Les puits de la plaque de microtitration sont sensibilisés avec l'histamine. Les solutions étalons ou les échantillons et l'anticorps anti-histamine sont distribués dans les puits. L'histamine libre et celle fixée sur la paroi du puits vont entrer en compétition pour se fixer sur le site de liaison de l'anticorps anti-histamine (réaction immunoenzymatique de type compétition). Après lavage, des anticorps couplés à la péroxydase sont ajoutés. Ces anticorps vont se fixer aux complexes anticorps-histamine déjà formés. Tout conjugué non fixé sera alors éliminé par des lavages. Le substrat de l'enzyme et le chromogène sont alors distribués et l'ensemble est laissé à incuber. Le conjugué fixé transforme le chromogène en un produit bleu. L'addition de solution stop conduit à un changement de coloration du bleu au jaune. La densité optique est mesurée à 450 nm sur un lecteur de microplaque. Les valeurs obtenues sont inversement proportionnelles à la concentration de l'échantillon en histamine.

Résultat

Les valeurs de densité optiques obtenues pour les étalons sont représentés graphiquement (on doit obtenir une courbe d'étalonnage approximativement linéaire), en fonction de la concentration en histamine. Les DO lues pour chaque échantillon sont ensuite reportées sur la courbe étalon et la valeur en histamine est alors connue.

Performances

Selon la procédure de préparation des échantillons les limites de détection sont comprises entre 0,5 et 2,5 ppm. Aucune réaction croisée avec d'autres amines biogènes n'a été observée. Les coefficients de variation sont constants et faibles ce qui garantit une reproductibilité élevée des mesures.

Conclusion

La formation d'histamine, très rapide lorsque les conditions de température sont favorables, a lieu sans que l'altération soit forcément apparente en raison de la compacité naturelle de la chair. Elle est la conséquence directe, dans les poissons riches en histidine, de la prolifération bactérienne. C'est donc en s'efforçant de réduire la contamination bactérienne initiale et en limitant par tous les moyens la prolifération ultérieure que l'on prolonge de façon certaine la durée de fraîcheur du poisson. On doit donc veiller à la propreté des cales et éviter de blesser inutilement les poissons puisque toute blessure devient un foyer de contamination.

La réfrigération aussi rapide que possible après la capture est un moyen efficace de retarder l'altération. On doit absolument éviter ensuite une remontée prolongée de la température. Il est important de ne pas négliger la réfrigération des espèces qui semblent bien supporter un séjour prolongé à température ambiante. Il a été constaté qu'il y avait là des causes possibles d'intoxication.

Les analyses ont montré qu'une teneur en histamine de l'ordre de quelques mg/100 g est déjà un indice d'altération corroborant souvent des défauts organoleptiques graves. La présence d'histamine dénonce bien les manquements aux règles d'hygiène et de réfrigération habituellement préconisées.

Son dosage, facilité par les tests rapides en kits, apporte une méthode complémentaire intéressante de contrôle systématique des produits susceptibles de contenir de l'histamine.

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

BAO-SHYUNG (H.), JIH-TERNG (W.), YOUK-MENG (C.), 2003 - A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products - Department of Food Science and Technology, Tajen Institute of Technology, 20 Wei-Shin Road, Yan-Puu Hsiang, Pingtung 907, Taiwan

BOYER (J.) et coll., 1956 - Intoxications histaminiques collectives par le thon. - Presse médicale, 64, p. 1003. - 1956. - Intoxications histaminiques collectives par le thon. - Bull. Acad. nat. Méd., 140, p. 151-153.

CRAHAY (F.), NOIRFALISE (A.) 1996 - Les amines biogènes dans les aliments. Revue Médicale. Liège. 51 : 7 : 479-484.

DABROWSKI (T.) et STODOLNIK (L.), 1966 - Changes in the histidine and histamine contents in muscle tissue in the tench and bream during cold storage. - Méd. Weterynar (Poland), 22 (4), p. 32-35 ; Chem. Abstracts, 65, 1.295 f.

DUFLOS (G.), DERVIN (C.), MALLE (P.) and BOUQUELET (S.) 1999 - Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice and whiting. Journal of AOAC International. 82 : 1357-1363.

HIBIKI (S.) et SIMIDU (W.), 1959. - Studies of putrefaction of aquatic products - 27. Inhibition of histamine formation in spoiling of cooked fish and histamine content in various fishes. - Bull. jap. Soc. sci. Fish., 24, p. 916-919

HILLIG (F.), 1956 - Indice of decomposition in tuna. - J. Assoc. off. Agric. chem., 39, p. 773-779.

HUI (J.Y.) et TAYLOR (S.L.), 1983 - High pressure liquid chromatography determination of putrescine amines in food, J. Asooc. Anal. Chem., p.66, 853

KAWABATA (T.) et coll., 1955 - Studies of the food poisoning associated with putrefaction of marine products. - Bull. jap. Soc. sci. Fish., 21, p. 335-351 et p. 1167-1180. - 1956. - Studies of the food poisoning associated with putrefaction of marine products. - Ibid., 22, p. 41-47.

KIMATA (M.) et KAWAI (A.), 1951 - The freshness of fish and the amount of histamine presented in the meat. - Bull. Res. Inst, food Sci., Kyoto Univ., 5, p. 21-28 et 6, p. 23-29. - 1952. - The freshness of fish and the amount of histamine presented in the meat. - Ibid., 10, p. 83-88 et 89-93.

KNOCKAERT (C.), 2006 – Rapport de mission à la Réunion – Ifremer. Centre de Nantes. Département STAM

MALLE P., VALLE M. AND BOUQUELET (S.), 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. Journal of AOAC International. 79 : 43-49.

MIETZ (J.), KARMAS (E.), 1977 – Chemical quality index of canned tuna as determinated by high-pressure liquid chromatography - Journal of Food Science 42 (1), 155–158.

OTA (F.) et KANEKO (K.), 1958 - On the formation of amine in fish muscle. - VII. Effect of freezing on the histamine formation in the thawed fish muscle. - Bull. jap. Soc. sci. Fish., 24, p. 140-143.

ROSSANO (R.), MASTRANGELLO (L.), UNGARO (N.), RICCIO (P.); 2006 - Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European anchovy Engraulis encrasicholus (L., 1758): A study by capillary electrophoresis - Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, University of Basilicata, Campus Macchia Romana, 85100 Potenza, Italy b Laboratorio Provinciale di Biologia Marina, Molo Pizzoli (Porto), 70123 Bari, Italy

SIMIDU (W.) et MIBIKI (S.), 1954 - Studies on putrefaction of aquatic products. On putrefaction of bloody muscle. - Consideration on difference in putrefaction for various kinds of fish. - Ibid., 20, p. 392-395.

TAKAGI (M.) et coll., 1969 - On the formation of histamine during loss of freshness and putrefaction of various marine products. - Bull. Fac. fish., 20, p. 227-234.

TAYLOR (S..L), 1987 – Histamine food poisoning, toxicology and clinical aspects, CRC critical reviews in technology, 17, p.91-117

Valle (M.), Malle (P.) and Bouquelet (S.), 1997 - Optimization of a Liquid Chromatographic Method for Determination of Amines in Fish. Journal of AOAC International. 80 : 49-56.

VAN VEEN (A.-G) et LATUSAN (M.-E.), 1950 - Fish poisoning caused by histamine in Indonesia. - Doc. Neerland. et Indonesica de Morbis Tropicis, 2, p. 18-20.

WILLIAMS, 1954 - Indice chimique de décomposition du poisson: l'histamine - Assoc. Off. Aqric. chem., 37, p. 567-572.

SITES INTERNET

DIFFCHAMB; Test kit histamine - www.diffchamb.com

LAREAL; Laboratoirederecherchealimentaire- http://www.lareal.com

CFIA; Canadian food inspection agency - http://www.inspection.gc.ca/english/toce.shtml

AFNOR; Association française de normalisations - http://www.afnor.org/portail.asp

WIKIPEDIA, Encyclopédie – http://www.wikipedia.fr