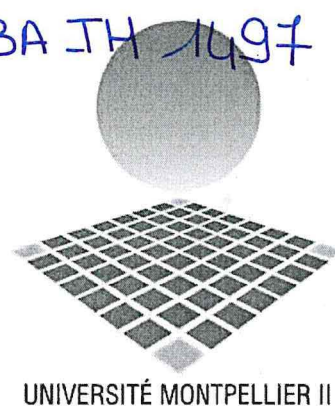


DK 542 488

BA JH 1497



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



RAPPORT DE STAGE

Evaluation des méthodes rapides et recherche de techniques alternatives pour la détection de l'histamine et du syndrome de chair brûlée dans le thon (île de la Réunion)

Présenté par

Pierre PELLISSIER

Réalisé sous la direction de : Eric CARDINALE et Elodie ARNAUD

Organisme et pays : CIRAD - Ile de la Réunion

Période du stage : Avril à Septembre 07

Date de soutenance : 2 Octobre 2007

Année universitaire 2006-2007



000096539

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Eric CARDINALE, responsable du pôle KAPPA du CIRAD à la Réunion, et Elodie ARNAUD, chercheur au CIRAD, pour m'avoir accueilli, avoir supervisé mon travail et pour leurs conseils rédactionnels.

J'exprime par ailleurs mes plus sincères remerciements à Thierry GOLI, Denis BASTIANELLI et Fabrice DAVRIEUX, chercheurs au CIRAD, pour leur enthousiasme sur le sujet et toute l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de ces 6 mois de stage.

Je tiens à remercier Laurent BONNAL, Jérôme MINIER et Aurélie PEDARRIEU pour leur aide au laboratoire et leurs conseils.

Je remercie également l'ensemble du personnel des entreprises « Réunion pélagique » et « Martin pêcheur » pour leur accueil et pour m'avoir permis de réaliser tous les échantillonnages dont j'avais besoin.

Je souhaite aussi remercier l'OSEO pour le financement de ce projet.

Merci aussi à Monsieur Yann BERTHOZ, directeur du Service Commun des Laboratoires (ex laboratoire de la Direction Générale de la Concurrence, Consommation et Répression des Fraudes), ainsi qu'à tout son personnel et plus particulièrement à Françoise LE BEHEREC qui m'a beaucoup appris sur l'HPLC.

J'adresse enfin tous mes remerciements à tous ceux que j'ai côtoyés pendant ces six mois, stagiaires, VAT et thésards, qui ont rendu mon séjour très agréable.

Résumé

La consommation des grands pélagiques est souvent mise en cause lors d'intoxications histaminiques. De plus, la qualité de la chair de thon peut également être affectée par le phénomène de brunissement appelé Burnt Tuna Syndrom (BTS) en termes Anglo saxons dû à la myoglobine qui se transforme en un pigment brun la metmyoglobine. Les conséquences peuvent être très importantes économiquement pour l'entreprise exportatrice de poissons contaminés ou affectés par le syndrome de la chair brûlée mais également pour la santé des consommateurs.

L'étude a été menée en collaboration avec les professionnels de la filière pêche de l'Ile de la Réunion. Elle nous a permis d'évaluer la possibilité d'utilisation de la Spectroscopie Proche Infra Rouge (SPIR) pour le dosage de l'histamine afin de proposer une méthode de détection et de dosage qui soit rapide, moins coûteuse et plus facile à mettre en œuvre que la chromatographie liquide haute pression (HPLC) et que certains kits de dosage rapide actuellement utilisés. Le dosage de l'histamine par HPLC, en parallèle des prises de spectres, a été utilisé pour calibrer l'appareil et valider son utilisation. D'autre part, un inventaire des méthodes de dosages rapides de l'histamine commercialisées sous forme de kits a été réalisé. Les 3 kits les plus intéressants en fonction du matériel qu'ils nécessitent, leur technicité, leur coût et leur rapidité ont été testés pour voir s'ils pourraient être utilisés directement à la débarque. Enfin, le dernier objectif a été de voir si le colorimètre Minolta peut être utilisé pour évaluer la couleur du poisson et suivre son évolution au cours d'une période de conservation au regard du BTS.

Les résultats montrent qu'une discrimination, par le SPIR entre les poissons non ou faiblement contaminés par l'histamine (< 30 mg/l) et les poissons dont la teneur en histamine est supérieure à 30 mg/l est possible. Toutefois l'analyse factorielle discriminante montre une faille pour les échantillons > 30 ppm : 1 échantillon sur 5 dont la teneur en histamine est inférieure à 30 ppm serait jugé par le SPIR supérieure à 30 ppm. Le kit Ridaquick histamine est apparu comme le plus facile à utiliser directement à la débarque par les pêcheurs et pourrait alors être utilisé en complément du SPIR pour confirmer les échantillons supérieurs à 30 ppm.

L'étude sur la mesure de la couleur du thon a montré que le paramètre colorimétrique, facteur de clarté, L^* peut être utilisé pour différencier une chair rouge d'une chair brune. De plus, il semble qu'un échantillon dont la valeur L^* est initialement proche de 30 ne perdra pas en qualité durant une période de conservation de 4 jours.

Mots clefs : Histamine, Couleur, HPLC, SPIR, Colorimètre, Thon, Kits de dosage rapide, Ile de la Réunion.

Sommaire

Remerciements	2
Résumé	3
Introduction	6
I Généralités	7
I-1 Contexte.....	7
I-2 Objectifs.....	8
I-3 Synthèse bibliographique	9
I-3-1 L’histamine.....	9
I-3-1-1 Généralités sur l’histamine	9
I-3-1-2 Méthodes de dosages	11
I-3-2 La Spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR)	13
I-3-3 Le phénomène de la chair brûlée.....	14
II- Matériel et méthodes	15
II-1 Echantillonnage.....	15
II-1-1 Zone de prélèvement pour le dosage le dosage de l’histamine.....	15
II-1-2 Prélèvements pour l’étude de la couleur	16
II-2 Protocole expérimental.....	17
II-2-1 Détection de l’histamine	17
II-2-2 Etude de la couleur.....	18
II-3 Méthodes	18
II-2-1 Extraction de l’histamine	18
II-2-2 Dosage de l’histamine par HPLC	19
II-2-3 La spectroscopie en proche infrarouge	20
II-2-3-1 Préparation des échantillons pour la SPIR	20
II-2-3-2 Acquisition des spectres	21
II-2-3-3 Test de répétabilité.....	21
II-2-4 Construction des bases de la population	22
II-2-4-1 Eléments statistiques.....	22
II-2-4-2 Distance de Mahalanobis.....	22
II-2-5 Calibration de la SPIR : Eléments statistiques	22
II-2-5-1 Méthode de régression PLS	23
II-2-5-2 Critères de jugement d’une régression	23
II-2-5-3 Identification des spectres hors norme	24
II-2-6 Mesure de la couleur par colorimètre Minolta.....	25
II-2-6-1 Mesure de la couleur : Système L^* , a^* et b^*	25
II-2-6-2 Traitement statistique des données	26
III- Résultats et discussion	27
III-1 Problème de l’histamine	27
III-1-1 Dosage de l’histamine par HPLC	27
III-1-1-1 Discussion sur les chromatogrammes	27
III-1-1-2 Résultats	27
III-1-2 Résultats des tests de la SPIR : Répétabilité spectrale et estimation de l’erreur quadratique moyenne (RMS)	29
III-1-2-1 Test de répétabilité sur morceaux entiers.....	29
III-1-2-2 Test de répétabilité sur broyats.....	29
III-1-3 Analyse des spectres de la SPIR.....	30
III-1-3-1 Analyse des spectres.....	30
III-1-3-2 Analyse en composante principale sur l’ensemble de mes spectres	30
III-1-4 Calibration de la SPIR et prédictions de teneurs en histamine.....	32

III-1-4-1 Résultats et équations de calibration de la SPIR	32
III-1-4-2 Prédiction des teneurs en histamine sur l'ensemble des échantillons	33
III-1-5 Analyse factorielle discriminante (AFD)	33
III-1-6 Discussion sur l'analyse des premiers résultats	34
III-1-6 Evaluation des kits de dosage rapide de l'histamine	35
III-2 Phénomène de chair brûlée	37
III-2-1 Distinction des différentes couleurs	38
III-2-1-1 Analyse du paramètre L^*	38
III-2-1-1 Paramètres a^* et b^*	39
III-2-2 Suivi de la couleur de la chair de thon en conservation	40
Figure 15: Evolution du paramètre L^* au cours de la conservation des échantillons	40
Conclusions et perspectives	41
BIBLIOGRAPHIE	42
Annexes	43
Annexe 1	43
Annexe 2	44

Introduction

Etudiant en master 2 PARC (Production Animale en Région Chaude) à l'université des sciences de Montpellier 2 (UM2), j'ai effectué mon stage de fin d'études au CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement). Pendant les trois premiers mois du stage j'ai été accueilli à Montpellier. J'ai ensuite poursuivi mon stage, pour trois mois également, à la Réunion au sein du pôle Qualité des productions agricoles et alimentaires.

J'ai été amené pendant ces 6 mois à évaluer des méthodes de dosage rapide, commercialisées sous la forme de kits, et évaluer l'utilisation d'un spectromètre proche infrarouge (SPIR) comme recherche alternative pour la détection et le dosage de l'histamine. Un autre volet de mon stage consistait à évaluer l'efficacité du colorimètre Minolta pour suivre en conservation la couleur de la chair de thon. Cette étude est le point de départ d'un projet de recherche sur la qualité des produits de la pêche à la Réunion.

Le contexte général du stage puis la problématique de l'étude et une bibliographie y sont, dans une première partie, présentés. Ensuite, sont exposés les faits expérimentaux : les matériels et méthodes utilisés. Enfin, dans une dernière partie sont exposés les résultats et discussions.

I Généralités

I-1 Contexte

La filière de la pêche et de l'aquaculture, de constitution récente (1995), tient encore, et pour l'heure, une place limitée dans l'économie de la Réunion mais ses productions représentent déjà le second poste des exportations de l'île (15%). Avec un chiffre d'affaire en 2004 de 45,7 M€ et 1000 emplois, elle représente 0,45% du PIB et 0,5% des emplois de la Réunion (*Chiffres extrait du plan stratégique national pour la pêche France ; Volet île de la Réunion, 2006*).

La Réunion regroupe l'ensemble des maillons de la filière, de la petite pêche à la pêche lointaine, de l'aquaculture marine et continentale à l'importation et à la transformation. Elle s'inscrit dans un tissu socioéconomique et institutionnel dense, avec des services maritimes développés, tant en terme de formation professionnelle, de services de contrôle à terre et en mer, d'instituts scientifiques et universitaires, d'administrations publiques maritimes et portuaires, vétérinaires et douanières, d'organisations professionnelles et syndicales et de collectivités territoriales, tous impliqués dans l'appui et l'encadrement de cette filière.

Le segment qui apparaît très porteur pour la Réunion est celui de la pêche palangrière qui débarque essentiellement des *Scombridae* (thon), *Coryphaenidae* (dorade coryphène) et *Xiphiidae* (marlins, espadons). Une bonne maîtrise des techniques de pêche, des espèces procurant une valeur ajoutée significative, une flottille avec un important potentiel de développement, une ressource largement disponible expliquent l'évolution dynamique de ce secteur. Une véritable filière s'est développée pour commercialiser principalement des produits frais, de grande qualité malgré les difficultés liées à l'éloignement des marchés européens. C'est ce développement qu'il s'agit de pérenniser. Le problème est que la consommation de ces grands pélagiques est souvent mise en cause lors d'intoxications histaminiques. De plus, leur qualité peut également être affectée par le phénomène de brunissement de la chair appelé phénomène de chair brûlée ou encore Burnt Tuna Syndrom (BTS) en termes Anglo-saxons.

Concernant l'histamine, le règlement (CE) No 2073/2005 de la commission européenne du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires impose que la teneur moyenne en histamine pour 9 échantillons par lot soit inférieure à 100 ppm. Aucun échantillon ne doit présenter une teneur supérieure à 200 ppm et pas plus de deux échantillons, par échantillonnage, à une teneur comprise entre 100 et 200 ppm. Si le lot ne répond pas à la législation il est alors immédiatement retiré du circuit de commercialisation et détruit. Les conséquences économiques peuvent être très importantes pour l'entreprise exportatrice.

La longueur et le coût élevé des méthodes de dosage actuelles en terme d'investissement mais aussi de main-d'œuvre, ne permettent pas aux industriels de la filière de réaliser un nombre important d'analyses. Pourtant, l'hétérogénéité des lots entraîne le besoin de réaliser idéalement une analyse sur chaque poisson et de garantir la qualité de chacun d'eux. Ceci entraîne une éviction des lots et leur réorientation vers des réseaux moins valorisés.

La perte due à l'incapacité de fournir des analyses de teneur en histamine sur chaque lot a été évaluée au sein d'une des principale entreprise de pêche, « Le martin pêcheur ». A 30 tonnes annuelles, soit 3-4% de sa production, cette perte représente 90000€ par an ces deux dernières années.

A terme, réussir à définir des lots exempts d'histamine à l'arrivée à Rungis constituerait un avantage économique non négligeable et serait nécessaire pour permettre aux acteurs réunionnais d'être plus compétitifs.

D'autre part, les acteurs de la filière pêche à la Réunion se retrouvant confrontés à l'incapacité de garantir la qualité de chaque poisson par rapport aux concurrents de l'Asie qui disposent quant à eux d'une main d'œuvre au coût beaucoup moins élevé, l'accès à certains marchés tels que les grands groupes de restauration et de distribution leur est impossible. De plus, les acteurs de la filière pêche à la Réunion ne doivent pas faire face aux mêmes problèmes que ceux de la métropole. En effet, le thon de l'Océan Indien, si on le compare au thon pêché en méditerranée, atteint des teneurs très élevées même stocké à moins de 2°C sans doute du fait de la température plus élevée de l'eau de mer. D'autre part, la durée du transport, et les risques associés notamment de rupture de la chaîne du froid, sont de nature à élever considérablement la teneur en histamine. D'où la nécessité de détecter rapidement les faibles teneurs en histamine dans le thon à la débarque de façon à éviter des teneurs supérieures aux normes à l'arrivée sur le lieu d'importation.

La couleur est un critère de qualité important pour le thon rouge et la maîtrise du risque d'apparition du phénomène de chair brûlée est nécessaire pour se positionner sur ces marchés et pour pouvoir exporter vers l'Asie.

Le phénomène de BTS est à l'heure actuelle évalué par simple analyse visuelle et donc assujettie à l'appréciation des opérateurs. Là encore, une évaluation objective de la couleur associée à une meilleure connaissance de son évolution au cours de la conservation permettrait à la filière d'être plus compétitive.

Depuis 2006 le CIRAD, l'Ifremer (Institut Français de recherche pour l'exploitation de la mer) le CRITT Réunion (Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologie) et les industriels de la filière en lien avec le pôle de compétitivité de la Réunion Qualitropic (Agronutrition en milieu tropical), mettent en place des actions de recherche pour améliorer la qualité des produits de la pêche. Outre leur volonté de travailler pour diminuer la teneur en histamine des poissons et le phénomène de chair brûlée par une amélioration des méthodes de refroidissement à bord et des pratiques à bord, les acteurs de la filière pêche à la Réunion sont particulièrement demandeurs en termes d'innovations quant aux méthodes de détection de l'histamine et également du BTS. Ce dernier point fait l'objet d'un projet financé par l'Oséo Anvar dans lequel s'est inscrit mon stage.

I-2 Objectifs

La chromatographie liquide haute pression actuellement utilisée pour la détection de l'histamine est une méthode chère et difficile à mettre en œuvre car elle nécessite un matériel coûteux, et une grande technicité. Il existe néanmoins des kits de dosage rapide dans le commerce nécessitant plus ou moins de matériel et de technicité. L'objectif de mon stage est d'évaluer les performances d'une méthode innovante de dosage de l'histamine et de proposer aux industriels de la filière pêche des méthodes de détection de l'histamine et du phénomène

de chair brûlée rapides, moins coûteuses et plus faciles à mettre en œuvre que les méthodes qu'ils utilisent actuellement.

Plus précisément il s'agira dans un premier temps d'évaluer de la possibilité d'utilisation de la Spectroscopie Proche Infra Rouge (SPIR) comme outil alternatif pour la détection et le dosage rapide de l'histamine. Le dosage par chromatographie liquide haute pression (HPLC), en parallèle des prises de spectres, sera utilisé pour calibrer l'appareil et valider son utilisation.

D'autre part, un inventaire des méthodes de dosages rapides commercialisées sous forme de kits sera réalisé. Puis, on s'attachera à sélectionner les kits les plus intéressants en fonction du matériel qu'ils nécessitent, leur technicité, leur coût et leur rapidité. Ces kits vont alors être testés pour voir s'ils peuvent être utilisés directement à la débarque.

Enfin, le dernier objectif du stage sera de voir si un appareil de type colorimètre peut être utilisé pour évaluer la couleur du poisson.

I-3 Synthèse bibliographique

I-3-1 L'histamine

I-3-1-1 Généralités sur l'histamine

Définition, origine

L'histamine a été découverte par AKERMAN en 1910. 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 à pH 6-7 (figure 1).

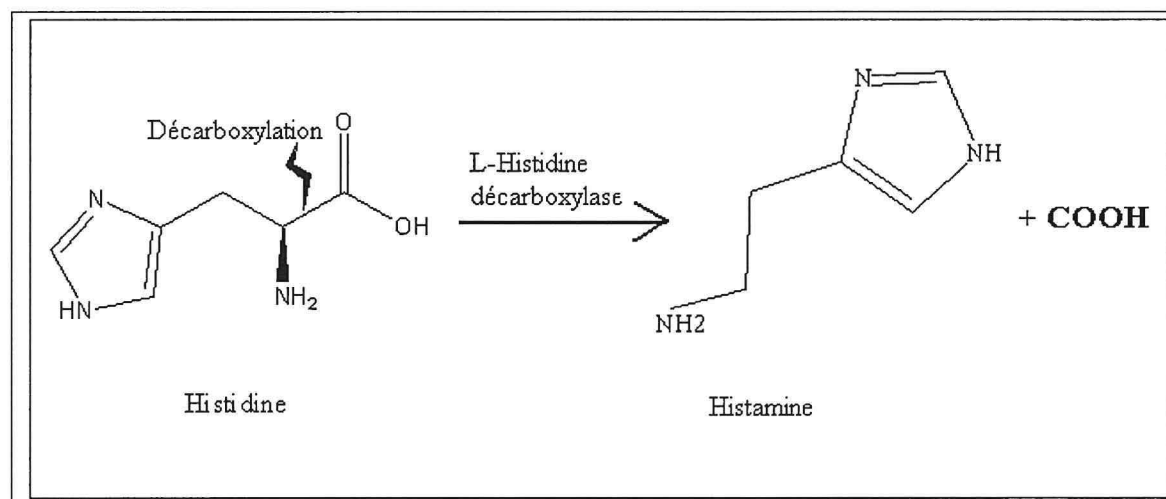


Figure 1 : Formation de l'histamine

Toxicité, symptômes et traitements

L'intoxication histaminique est la cause de morbidité liée à la consommation de poisson la plus répandue dans le monde. L'histamine est très résistante à la chaleur, si bien que même

lorsque le poisson est cuit, appertisé ou soumis à un traitement thermique, avant d'être consommé, l'histamine n'est pas détruite. Une concentration supérieure à 50 ppm est susceptible de provoquer des crises allergiques légères. A partir de 100 mg/L le produit devient alors très toxique.

Les symptômes les plus souvent rencontrés sont rougeur facio-cervicale, éruption cutanée, œdème du visage, bouffées de chaleur, sensation de brûlure dans la gorge, goût de poivre dans la bouche, démangeaisons, picotements de la peau... Les symptômes cutanés sont les plus spécifiques de l'intoxication histaminique et peuvent aider à orienter le diagnostic. Ces premiers symptômes peuvent apparaître 20 minutes après l'ingestion et sont généralement suivis par des troubles de types céphalées, palpitations cardiaques et étourdissements. Des symptômes secondaires de nature gastro intestinale peuvent apparaître : nausées, maux d'estomac, vomissements et diarrées. L'histamine peut également être impliquée dans la formation d'ulcères peptidiques (Sonné et al. 1995) ; d'écoulements nasales et yeux aqueux (Sompayrac, 1999) et des effets d'inflammation (Sonné et al. 1995). L'histamine cause la contraction de plusieurs muscles lisses = effet doux du muscle. Elle peut alors être impliquée dans le péristaltisme accru lié aux allergies de nourriture (Abbas et al. 1994)

En général les médicaments utilisés sont des anti-histamines, d'autres médicaments peuvent être prescrits et dépendent des symptômes apparus : Prométhazine, dexchlorpheniramine et cimétidine pour exemple.

Aliments incriminés

L'intoxication à l'histamine est une intoxication chimique liée à la consommation d'aliments chimiques contenant de grandes quantités d'histamine. L'aliment en cause est presque toujours un poisson. Les plus souvent incriminés appartiennent aux familles des scombridés (thons, maquereaux), clupéidés (sardines, anchois) et autres poissons gras (marlins, espadons) qui contiennent des taux d'histidine libre parfois supérieurs à 2g/kg de chair.

Bactéries responsables

Kawabata et al. (1955) ont isolé 78 souches de bactéries dans des échantillons de thon obèse du Pacifique ayant provoqué des allergies. Onze seulement de ces souches étaient capables de produire de l'histamine : *Proteus vulgaris* (5 souches), *Proteus mirabilis* (3 souches) et *Morganella morganii* (3 souches). Seules les souches de *Morganella morganii* produisaient de l'histamine en grande quantité dans la chair crue broyée des thons, sans que s'accroisse la teneur en ammoniacque et sans que se modifient l'apparence et l'odeur. Plus tard, d'autres puissants producteurs d'histamine ont été isolés : *Klebsiella pneumoniae* et *Hafnia alvei*. Les bactéries productrices d'histamine se trouvent chez la plupart des poissons, vraisemblablement par suite de contamination après la pêche. Elles se multiplient bien à 10°C mais à 5 °C la croissance est considérablement retardée (Ababouch et al. 1991) et on n'a jamais relevé de production d'histamine par *M. morganii* lorsque les températures étaient constamment inférieures à 5°C (Klausen et Huss, 1987).

Facteurs favorisant la production d'histamine

Des études ont montré que, suivant le lieu et la saison, des taux toxiques d'histamine peuvent être produits :

- lors de la capture du poisson à bord du bateau de pêche, en cas de mauvaises pratiques de pêche,
- après seulement 6 heures d'exposition du poisson à température ambiante.

La prévention repose donc sur l'infaillibilité de la chaîne de froid. Tous les poissons devraient être éviscérés, le sang évidé et le poisson refroidi rapidement, proche du point de congélation, juste après leur mort.

I-3-1-2 Méthodes de dosages

Certaines des méthodes d'analyse de l'histamine incluent la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) (Mietz et Karmas, 1977), qui est la méthode de référence officielle, la chromatographie sur couche mince (CCM) et de nouvelles méthodes enzymatiques rapides. Toutefois, seules les méthodes de référence, HPLC et CCM, validées par les services vétérinaires d'hygiène alimentaire, sont utilisées par les laboratoires d'analyses pour effectuer des contrôles sur des poissons destinés à l'exportation.

a) Méthodes de référence

→ La chromatographie sur couche mince (CCM) :

Les échantillons à analyser et ceux de référence sont soumis à une extraction par le méthanol. Sont utilisées comme références, des échantillons de poisson exempts d'histamine auxquels sont ajoutées des quantités connues d'histamine. L'histamine est séparée des autres amines par chromatographie sur couche mince, puis révélée avec une solution de ninhydrine. Des taches de couleur rose violacée apparaissent (figure 2). L'histamine du thon est repérée et comparée à l'histamine de référence. La méthode est semi-quantitative ce qui veut dire que la concentration en histamine est déterminés approximativement.

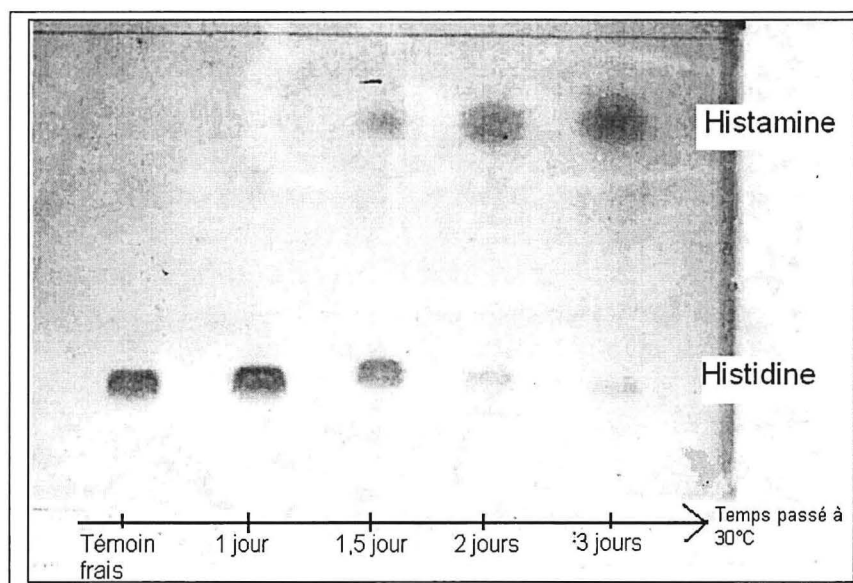


Figure 2 : Plaques de chromatographie sur couche mince

La sensibilité de la méthode est d'environ, 5 mg/kg (5 ppm) et le seuil de quantification est de 5 ppm. L'étape d'extraction est simple mais la spécificité de cette méthode est passable et, bien qu'elle soit facile d'emploi, un laboratoire est nécessaire pour sa mise en œuvre.

→ La Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC) :

L'étape d'extraction est suivie d'une séparation par HPLC, elle-même suivie d'une révélation fluorimétrique. Cette méthode qui présente l'avantage par rapport à la CCM d'être quantitative et non seulement semi-quantitative a été préférée dans le cadre de notre étude pour le dosage de l'histamine. Elle présente également l'intérêt d'être sélective, spécifique et extrêmement sensible. Cette méthode de dosage de l'histamine 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. Actuellement, à la Réunion, les pêcheurs n'ont pas recours à ces analyses qui peuvent être effectuées au service commun des laboratoires car elles sont trop chers (70€).

Des méthodes plus faciles à mettre en œuvre ont été développées ces dernières années et sont disponibles sur le marché.

b) Méthodes rapides

Depuis quelques années de nombreux tests ont été développés en essayant de répondre le plus possible au cahier des charges suivant (Tableau 1):

- Fiable et facile à interpréter,
- Simple d'emploi (utilisable au pied du bateau),
- Rapide,
- Faible coût (inférieur au coût de la perte qu'il prévient).

	Determination	Etapas expérimentales	Durée test	Echantillon/Kit	Investissement départ	Sensibilité	Gamme de détection	Fournisseurs
ALERT for Histamine	Qualitatif : > ou < à 50ppm	Extraction, dilution, complexation, test immunoenzymatique et lecture (5 étapes)	20 minutes	20	+ (Micropipettes, balance,...)	2,5 ppm	?	Neogen corporation
Transia Histamine	Semi-quantitatif: Gamme= 0; 25; 50; 100 et 200 ppm	Extraction, dilution, complexation, test immunoenzymatique et lecture (5)	3 Heures	48 (- 5 à chaque gamme)	++ (spectro, micropipettes, balance,verrière,...)	5 ppm	Entre 25 ppm et 200 ppm	Diffchamb
HISQUICK Histamine et RidaQuick Histamine	Quantitatif Sans lecteur la lecture semi-quantitative est possible; gamme de 0; 2,5; 5; 10; 20 et 40 ppm	Extraction, passage en colonne échangeuse d'ions (purification), coloration, lecture micro-plaques (4)	1 Heure	48	++ (Micropipettes, centrifugeuse,balance,..) à +++ si achat d'un lecteur de micro-plaques	0,5 ppm	Entre 0,5 et 40 ppm	Rocky Mountain Diagnostic et labor diagnostiska nord (LDN) et R-Biopharm
RIDASCREEN Histamin	Quantitatif Gamme: 0; 0,5; 1,5; 5; 15 et 50 ppm	Extraction, acylation, test immunoenzymatique, coloration, lecture micro-plaque (5)	3 Heures	48	+++ (Lecteur de micro-plaques, micropipettes, balance,...)	0,5 ppm	Entre 0,5 et 50 ppm	R-Biopharm, Rocky Mountain Diagnostic, labor diagnostiska nord (LDN) et Immunotech
VERATOX for Histamine et Histamarine	Quantitatif Gamme: 0; 1; 10, 50; 100 et 500 ppm	Extraction, dilution, complexation, test immunoenzymatique et lecture (5)	2 Heures	38	+++ (Lecteur de micro-plaques, micropipettes, balance,...)	0,5 ppm	Entre 0,5 et 500 ppm	Neogen corporation et Immunotech

.Tableau 1 : Inventaire des différents kits rapides de dosage de l'histamine commercialisés

Bien que moins coûteuses et plus simples que l'HPLC, on peut voir que ces méthodes restent tout de même difficiles à mettre en œuvre pour des analyses de routine car elles nécessitent un environnement de laboratoire et du personnel qualifié. D'autre part certaines de ces méthodes sont qualitatives (on saura simplement si la concentration en histamine est inférieure ou supérieure à 50 ppm) ou semi-quantitative (on saura si la concentration est comprise par

exemple entre 25 et 50 ppm) alors que les pêcheurs ont besoin d'avoir une idée précise de la teneur en histamine.

Actuellement, le test Histamarine, méthode quantitative, est utilisé au sein de l'entreprise « Réunion Pélagiques » mais ces derniers évaluent ce test trop long pour une détection à la débarque. Il semble que parmi ces techniques, certaines sont plus attractives comme le test colorimétrique Ridaquick Histamine.

I-3-2 La Spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR)

La spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR) est une technique basée sur le principe d'absorption des rayonnements infrarouges par la matière organique. Cette absorption étant liée à la composition chimique des échantillons, on peut estimer cette dernière par la simple mesure de l'absorption de lumière par échantillon.

Cette mesure se fait avec un spectromètre soit en « transmission » (on mesure la lumière traversant un échantillon fin), soit en « réflexion » (on mesure la lumière réfléchiée par un échantillon épais).

L'échantillon est éclairé à différentes longueurs d'onde. L'absorption de la lumière à chacune de ces longueurs d'onde constitue le spectre de l'échantillon. Un spectre est caractéristique d'un échantillon car il regroupe des informations (quantité et caractéristique) de chacun de ses constituants organiques.

La SPIR nécessite cependant une phase d'étalonnage basée sur des mesures de référence obtenues au laboratoire et l'établissement des modèles mathématiques qui permettront de relier le spectre infrarouge au résultat de ces mesures.

La SPIR a un grand nombre d'applications dans le domaine industriel (chimie, pharmacie, agro-industries,...). Au CIRAD elle est utilisée essentiellement pour estimer la composition chimique d'échantillons d'aliments (café), de fourrages ou de fèces (étude de digestibilité des aliments).

Cette technique a de nombreux avantages :

- Elle est rapide,
- Elle est non destructive,
- Elle ne nécessite pas une grande quantité d'échantillons,
- Elle est peu onéreuse hormis l'investissement initial dans l'appareil (Environ 4000 €)

Cependant il faut savoir :

- Que la SPIR ne peut généralement pas être utilisée pour estimer les substances minérales, puisqu'elle est basée sur l'absorption du rayonnement par les molécules organiques,
- Que dans la plupart des cas les substances présentées à l'état de traces (1 g/kg) dans les échantillons ne peuvent pas être évalués par la technique.

Or, les concentrations sur lesquelles nous allons travailler sont de l'ordre du ppm donc très éloignées du pourcent. Ce que nous espérons c'est que la production d'histamine s'accompagne parallèlement d'un changement de la composition chimique de la chair de thon, donc de la totalité de son spectre, et que ses modifications soient détectables en SPIR. Nous pourrions ainsi observer, de façon indirecte, la présence de l'amine biogène et peut être même arriver à déterminer sa concentration dans l'échantillon.

I-3-3 Le phénomène de la chair brûlée

De nombreux travaux ont déterminé que ce phénomène se produisait lorsque le thon n'était pas rapidement refroidi, que le pH était bas (production d'acide lactique) et en présence d'une importante activité protéolytique. Dans ces conditions, la myoglobine contenue presque majoritairement dans le muscle rouge, jusqu'à 20g/kg contre 0 à 1 g dans les autres muscles, se transforme en un pigment brun la metmyoglobine.

II- Matériel et méthodes

II-1 Echantillonnage

L'ensemble des échantillons de l'étude a été prélevé au sein des deux entreprises « Martin pêcheur » et « Réunion pélagique ». Les procédures d'échantillonnage pour l'étude de la couleur ou pour la recherche de l'histamine ne sont pas les mêmes.

II-1-1 Zone de prélèvement pour le dosage de l'histamine

Le journal officiel du ministère de l'agriculture, direction de la qualité, service vétérinaire d'hygiène alimentaire, rendu public en juillet 1984 précise les modalités de prélèvement pour la recherche et le dosage de l'histamine (figure 3). Deux prélèvements doivent être réalisés par thon : le premier sous la première nageoire dorsale et le second dans la partie médiane de la paroi ventrale en dessous du prélèvement précédent.

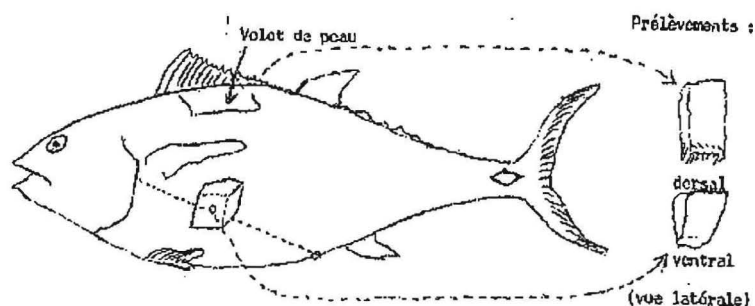


Figure 3 : Schémas des prélèvements dorsal et ventral pour le dosage de l'histamine

Mais, le choix de la zone de prélèvement a été discuté avec les professionnels de la pêche afin de ne pas abîmer le poisson et de ne pas faire baisser sa valeur marchande. Pour chacun des poissons, la zone d'échantillonnage pour les analyses HPLC et SPIR est présentée sur la figure 4 ci-dessous.

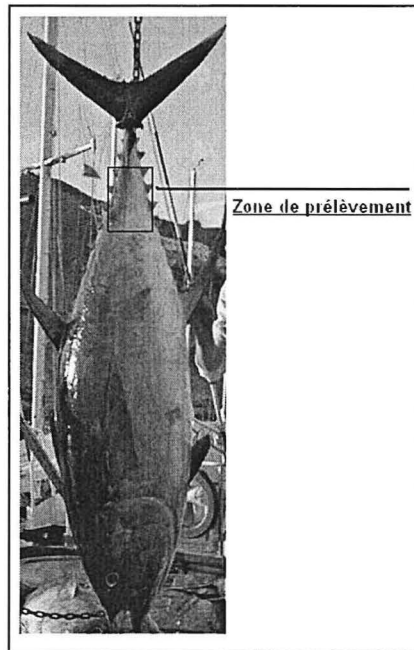


Figure 4 : Zone d'échantillonnage

Nous avons besoin d'avoir une gamme de 0 à 300 ppm pour étalonner le SPIR. Nous avons donc sélectionné des poissons présentant le plus possible de signes susceptibles de révéler la présence de l'histamine :

- Poisson remonté à bord mort,
- Chair du poisson plutôt brune,
- Poisson malodorant.

Au total, 132 échantillons pendant la durée de l'étude ont été utilisés.

II-1-2 Prélèvements pour l'étude de la couleur

Pour cette étude nous avons découpé 7 « steaks » de thon directement dans les longes au moment de la découpe des poissons. Sept échantillons ont été prélevés pour cette étude (figure 5).

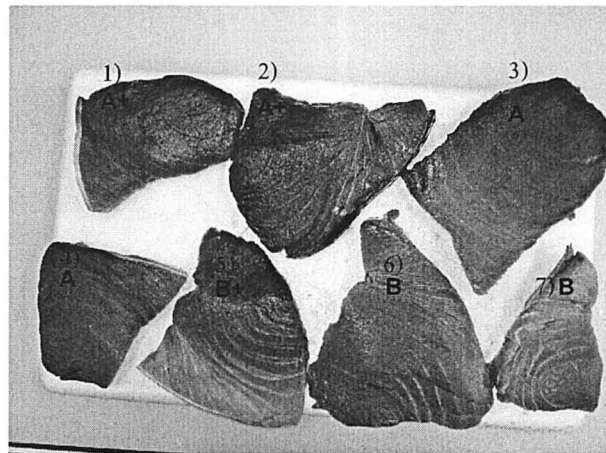


Figure 5 : Echantillons présentés par classe de couleur

La couleur a été estimée par le pêcheur afin d'être classée par catégories. Les échantillons sont notés selon une échelle de couleur :

- A+ → Très très bon. Chair rouge vif.
- A → Très Bon. Un dégradé du rouge vif au rouge clair.
- B+ → Bon. Un dégradé du rouge plutôt brun au rouge clair.
- B → Moyen. Chair plutôt brune.

II-2 Protocole expérimental

II-2-1 Détection de l'histamine

Jour 1 : Prélèvement, prise des spectres et extraction de l'histamine

Entre quinze et vingt-cinq échantillons sont prélevés au début de chaque expérimentation (donc sur un même lot de poisson débarqué), placés dans un sac congélation et regroupés dans une glacière pour ne pas rompre la chaîne de froid.

Une fois au laboratoire, les échantillons sont sortis de la glacière et traités les uns après les autres par étapes, selon le descriptif ci-dessous :

- Retirer toute la chair du morceau puis la broyer à l'aide d'un broyeur ménager.
- Prendre les spectres : Trois spectres par échantillons. Il est important de bien mélanger le broyat entre chaque prise de spectre.
- Peser 10g de broyat pour l'analyse de la teneur en histamine par HPLC. Conserver cette prise d'essai dans un flacon placé au frigidaire puis passer à l'échantillon suivant.
- Sortir les prises d'essai du frigidaire.
- Extraire l'histamine.
- Placer les extraits au froid positif, entre 2 et 5°C, en attente du dosage de l'histamine par HPLC.

Jour 2 et jour 3 : Dosage de l'histamine par HPLC

Chaque jour, nous avons pu passer entre 10 et 15 échantillons en HPLC. Trois fois par jour, un nouvel étalon est préparé afin de contrôler la répétabilité de la réponse et déterminer dans un second temps les concentrations des échantillons du jour. La préparation des extraits et le dosage de l'histamine par HPLC sont expliqués par la suite.

Protocole d'ensemencement par *Morganella morganii* :

Suite aux premiers résultats d'analyse en HPLC nous avons été contraint de modifier quelque peu le protocole pour obtenir des échantillons contaminés. En effet, les premières analyses ne présentant pas d'échantillons dont la concentration en histamine dépassait les 20 ppm nous avons alors décidé de faire produire l'amine biogène étudiée par *Morganella morganii*.

Le protocole est le suivant :

- Broyer l'échantillon et peser une prise d'essai d'environ 10 grammes.
- Ensemencer la prise d'essai avec 0,25 ml de milieu de culture à 10^7 - 10^9 UFC/ml.
- Laisser incuber 6 à 7 heures à température ambiante.
- Prise des spectres sur broyats.
- Analyses HPLC.

On souhaite en effet obtenir un échantillonnage recouvrant une gamme satisfaisante de 30 à 300 ppm avec une bonne répartition des différentes valeurs. Toute la difficulté a été de trouver le temps d'incubation permettant d'obtenir des valeurs qui recouvrent correctement la gamme. Lorsque les échantillons étaient trop contaminés, la limite de dosage par HPLC dépassée, nous avons décidé de leur donner une valeur arbitraire de « 2000 », soit très contaminé.

II-2-2 Etude de la couleur

Les sept échantillons ont été prélevés en début de semaine afin de suivre l'évolution de la couleur de la chair pendant 4 jours de conservation. Chaque jour, 15 mesures de couleurs dans le système L^* , a^* et b^* ont été réalisés par échantillon à l'aide du colorimètre Minolta (Figure 6).



Figure 6 : Photo du dispositif pour la mesure de couleur

L'ensemble des échantillons, depuis le jour du prélèvement et après chaque temps de mesure, est conservé individuellement dans un sac congélation, entouré de glace pilée et placé au frigidaire entre 2 et 3 °C.

II-3 Méthodes

II-2-1 Extraction de l'histamine

Dans un bécher en plastique:

- Mélanger 10g de broyat de thon (ce qui correspond à la prise d'essai) + un volume d'environ 40 ml de TCA (Acide trichloracétique à 10 %).
- Mixer pendant 3 minutes avec un homogénéisateur de type ultra Turrax.
- Filtrer dans une fiole jaugée de 50 ml.

Ajuster jusqu'au trait de jauge avec du TCA. L'extrait peut être conservé à 4 °C, dans un flacon en plastique, pendant au moins deux mois (Gouygou et *al.* 1987)

II-2-2 Dosage de l'histamine par HPLC

La méthode HPLC que nous avons utilisée pour le dosage de l'histamine est directement inspirée de la méthode officielle utilisée par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF).

a) Préparation du dérivé fluorescent : complexation

Préparation, avant le passage des extraits, d'une solution étalon à 1mg/l d'histamine pour vérifier le bon fonctionnement de la chaîne HPLC et l'étalonnage.

Préparation de la solution étalon à 1 mg/l :

- Dans une fiole d'un litre: 1 gramme d'histamine puis ajout d'eau distillée jusqu'au trait de jauge : solution mère à 1000 ppm.
- Dans une fiole de 50 ml : 10 ml de solution mère puis ajuster avec de l'eau distillée : Solution fille à 100 ppm
- Dans une seconde fiole jaugée de 50 ml : 1 ml de solution fille à 100 ppm et ajuster avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge : Solution étalon de 1 ppm.

Avant l'étape de complexation diluer au 1/5 l'extrait dans de l'eau ultra pure.

Procédure :

Dans un tube en plastique de 10 ml, incorporer :

- 135 µl de filtrat (étalon ou extraits)
- 1,85 ml d'eau distillée → Agiter au vortex puis laisser réagir 1 min à l'obscurité
- 0,4 ml d'NaOH 1N
- 0,1 ml d'OPA (orthophtalaldéhyde) → Vortex puis 4 min à l'obscurité
- + 0,2 ml d'HCl 3N
- Agiter, filtrer, puis injecter en HPLC.

b) Conditions HPLC

- Vanne d'injection rhéodyne avec boucle de 20 µl
- Colonne C18
- Détecteur : fluorimètre réglé sur les paramètres suivants: ex: 350 nm et em: 450 nm
- Enregistreur: Intégrateur VARIAN 4400, vitesse du papier: 0,25 cm/min; Atténuation: 16
- Eluant = 0,556g NaH₂PO₄, H₂O + 300 ml H₂O ultra pure + 200 ml CH₃CN + 0,05 ml Triéthylamine
- Débit de passage de l'éluant dans la colonne : 0,7 ml /min

Dans ces conditions, le temps de rétention de l'histamine est d'environ 14 min. Le temps de passage dans la colonne est de 25 minutes ; temps minimum à respecter avant de procéder à une nouvelle injection.

c) Détermination de la concentration en histamine de l'échantillon

- $[Hist]_{vol\ injecté} = Ae / (Aet * [Hist]_{étalon})$: mg/l
avec Ae : Aire sous le pic de l'extrait et Aet : Aire sous le pic de l'étalon

$$= Ae / (Aet * 1000): mg/ml$$

- m Hist dans 50mL d'extrait = [Hist] vol injecté * V extrait * facteur dilution = $(Ae*50*5)/(Aet*1000)$
 : mg
 $[Hist]_{\text{broyat}} = (Ae*50*5)/(Aet*1000*PE)$: mg/g de broyat
 avec PE : prise d'essai (g).
 $= (Ae*50*5*1000)/(Aet*1000*PE)$: mg/kg ou ppm

D'où le calcul permettant de connaître la quantité, en ppm, de mon échantillon = $(Ae*250)/(Aet*PE)$

II-2-3 La spectroscopie en proche infrarouge

II-2-3-1 Préparation des échantillons pour la SPIR

Le matériel SPIR utilisé est un appareil ASD-Labspec Pro en mode réflectance (figure 8). Ce modèle a la particularité d'être transportable. Une cellule en quartz conçu pour la SPIR sert à contenir les échantillons. Les échantillons sont passés manuellement les uns après les autres. Le Logiciel Indico Pro v3.1 est utilisé pour la collecte des données. Le logiciel WinISI II Project Manager v1.50 est utilisé pour le traitement des données.

Les échantillons destinés à la SPIR sont disposés dans une cellule en quartz. Environ 10 grammes de morceau entier ou broyat de l'échantillon sont disposés dans la cellule, puis cette dernière est placée sur le manchon du spectromètre à proche infrarouge (figure 7). Un test de référence sur le blanc est réalisé avant chaque série expérimentale.

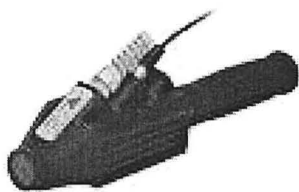


Figure 7: Manchon



Figure 8 :Spectromètre

II-2-3-2 Acquisition des spectres

Les spectres sont acquis en réflexion diffuse de 350 nm à 2500 nm (visible et proche infrarouge), avec un pas d'1 nm. Le spectre est divisé en trois segments : le segment 1 (350 à 1001 nm), le segment 2 (1002 à 1800 nm) et le segment 3 (1801 à 2500 nm). Une mesure de référence sur le blanc est effectuée avant le passage d'une vingtaine d'échantillons. Le spectre d'absorbance en log (1/R) est obtenu par la moyenne de ces mesures et la comparaison avec la référence.

II-2-3-3 Test de répétabilité

Ce test a été réalisé pour voir si l'appareil donne le même résultat pour une même cellule scannée plusieurs fois et remplie avec un morceau de thon (mesure sur face supérieure et sur face inférieure) et un broyat.

Ensuite, les erreurs quadratiques moyennes (RMS) ont été calculées pour chaque échantillon à partir des spectres d'absorption obtenus sur la même cellule (tableau 2).

Echantillons utilisés	Nombre de cellules remplies	Nombre de scan par cellule
Morceaux face supérieure	1	5
Morceaux face inférieure	1	5
Broyats	1	5

Tableau 2 : Test de répétabilité de l'appareil SPIR

Le test de répétabilité permet de mesurer l'homogénéité des spectres sur l'échantillon étudié et ainsi orienter le manipulateur sur le type d'échantillon à utiliser pendant l'étude (broyats ou morceaux entiers).

L'erreur quadratique moyenne (RMS) qui permet d'évaluer la répétabilité spectrale est établie sur une différence entre deux ou plusieurs analyses effectuées sur le même appareil et calculée suivant la formule :

$$\text{RMS}(i) = \sqrt{\sum_j^p \frac{(\bar{X}_j - X_{ij})^2}{p}}$$

Moyenne de l'absorbance pour la longueur d'onde j .

$$\bar{X}_j = \frac{1}{n} \sum_i^n X_{ij}$$

n est le nombre de spectres comparés (i varie de 1 à n).

p est le nombre de longueurs d'onde (j varie de 1 à p).

X_{ij} est la valeur d'absorbance du i éme spectre pour la longueur d'onde j .

II-2-4 Construction des bases de la population

II-2-4-1 Eléments statistiques

La SPIR repose sur l'analyse d'un jeu d'échantillons bien défini pour une calibration et sur un modèle mathématique optimal du point de vue de la précision de la calibration. Le jeu d'échantillons doit être représentatif de la variabilité de la population à prédire.

Le modèle est valide s'il respecte les deux conditions suivantes :

- Le modèle est construit à partir d'un nombre et d'une variabilité suffisante d'échantillons pour que tous les cas possibles soient prévus.
- Les données sur lesquelles le modèle est bâti doivent être fiables et sûres ; les échantillons hors normes seront donc écartés de la base.

L'opération de définition des limites a pour but d'accroître la stabilité du modèle en éliminant les données entachées d'erreurs de mesure ou de manipulation.

Nous disposons d'un grand nombre de spectres (430 spectres de broyats et 134 de morceaux) et d'une variable à corrélérer (la teneur en histamine). Il faut donc extraire l'information de cette matrice spectrale et définir une distance par rapport au spectre moyen. La distance généralisée de **Mahalanobis (H)** apporte une aide précieuse dans la construction du jeu d'échantillons, en définissant les limites et les similarités entre échantillons.

II-2-4-2 Distance de Mahalanobis

Le calcul de ces distances standardisées, donne pour chaque échantillon, la distance par rapport à un spectre moyen. Elle permet d'établir un environnement global sur la base du H et ainsi, de définir des échantillons éloignés (et donc spectralement différents). Ainsi nous pouvons identifier des échantillons hors normes, sur la base du spectre moyen en estimant leurs valeurs de H ($H > 3$). Ces hors normes sont à observer de près. En effet, si aucune erreur de mesure n'est identifiée, il s'agit certainement d'un échantillon d'origine différente dont la composition chimique est particulière. Il peut être intéressant de conserver cet échantillon en attendant d'en avoir d'autres pour consolider la base. En revanche, si une erreur est identifiée, le ou les spectres sont éliminés du jeu de données.

II-2-5 Calibration de la SPIR : Eléments statistiques

Les calculs pour la calibration sont effectués sur un ensemble d'échantillons représentatifs de la population de tous les échantillons existants. L'effectif des échantillons représentatifs de la population d'échantillon doit être le plus élevé possible (environ cent échantillons).

II-2-5-1 Méthode de régression PLS

La méthode de régression utilisée est la régression PLS (*partial least squares*) qui fait partie des méthodes de régression avec compression des données. De nouvelles variables sont construites à partir des données spectrales d'origine. Il s'agit ainsi de réduire le nombre de variables sans perte d'informations utiles.

Les échantillons sont représentés dans un espace à p dimensions (longueurs d'onde). Le moyen le plus simple de réduire les dimensions de l'espace est de projeter ces points sur un espace de dimension inférieure. Si l'on projette les points sur un axe on obtient une combinaison linéaire des variables d'origines. On effectue ensuite la régression des y sur cet axe. Les axes calculés sont orthogonaux, ce qui supprime les phénomènes de colinéarité.

Le modèle théorique s'écrit :

$$\begin{aligned} \mathbf{X}_0 &= \mathbf{T} \mathbf{P} + \mathbf{E} \quad (1) \\ \text{Et} \quad \mathbf{Y}_0 &= \mathbf{T} \mathbf{q} + \mathbf{F} \end{aligned}$$

Avec :

X : la matrice centrée des données spectrales,

Y : le vecteur des données chimiques,

T : la matrice des combinaisons linéaires des variables de X,

P et q décrivent comment T est relié à X et Y,

E et F correspondent au bruit ou à de l'information non fiable.

Le type de réduction des données dépend du choix des directions des axes pour effectuer les projections.

La méthode PLS permet de relier un ensemble de variables expliquées (Y) à un ensemble de variables explicatives (X) lorsque le nombre de variables indépendantes est élevé. La régression PLS consiste à réaliser une Analyse en Composantes Principales de l'ensemble des variables X, sous la contrainte que les composantes calculées (T) soient aussi « explicatives » que possible de la matrice Y. Un terme PLS est obtenu en maximisant la covariance entre Y et les combinaisons linéaires de la matrice X. La contribution de cet axe est ensuite retranchée de X et Y, et un nouvel axe est calculé en utilisant les matrices résiduelles. La PLS permet, également, de prédire Y à partir de X en séparant au mieux le signal du bruit de fond.

II-2-5-2 Critères de jugement d'une régression

L'ajustement obtenu n'est jamais idéal. Un biais et un écart entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites peuvent être introduits et il existe une incertitude sur la valeur prédite. D'où l'intérêt de posséder des critères de sélection et de jugement des modèles. Ces critères sont les tests statistiques attachés aux différents types de régression.

Les critères statistiques de jugement que nous avons utilisé sont :

a) Coefficient de détermination R² (RSQ)

La formule de R² est la suivante :

$$R^2 = \frac{(SCE_t - SCE_r)}{SCE_t}$$

R² est la part de la variance de la variable dépendante expliquée par le modèle. Des valeurs de R² voisins de 1 indiquent que le modèle explique bien la variable à ajuster.

b) Ecart-type de calibration (SEC = Standard Error Calibration)

Formule :

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - k - 1}}$$

Le SEC statistique est l'estimation de l'écart type de l'erreur aléatoire entre les valeurs de références et les valeurs prédites. Le modèle est développé à partir de l'ensemble des échantillons représentatifs de la population.

c) Ecart-type de validation croisée (SECV = Standard Error of Cross Validation)

Formule :

$$SECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 1}}$$

Ce critère utilisé pour les méthodes de régression PLS et PCR, permet de fixer le seuil de redondance. Il sert à déterminer le nombre moyen de termes « idéal » à prendre en compte. Le jeu d'échantillons est divisé en n groupes. Le modèle est développé à partir des $(n-1)$ groupes, le groupe restant sert à valider le modèle. L'opération est reproduite n fois. Nous avons utilisé 4 validations croisées, soit 4 sous-groupes, chaque sous-groupe étant prédit par les trois autres. Cette technique permet de définir ce qui est dû au signal et ce qui provient du bruit.

II-2-5-3 Identification des spectres hors norme

Il est important de détecter les échantillons hors normes. Si un ou plusieurs échantillons du fichier de calibration sont « mauvais », cela induit des erreurs dans le modèle de calibration et finalement des prédictions médiocres pour des échantillons inconnus. Dans notre cas d'étude nous avons trois types d'échantillons hors normes :

- Ceux qui sont définis comme des spectres « loin » de la majorité des spectres. Le calcul de la distance H de Mahalanobis, détaillé précédemment, permet l'identification de ces échantillons.

- Ceux dont la teneur du composé chimique n'est pas précisément connue. Dans notre cas les échantillons notés arbitrairement [Histamine] = 2000 n'ont pas été utilisés pour les calculs des équations de calibration.
- Et dans notre cas d'étude nous avons décidé de ne pas utiliser les échantillons sans histamine car ce que nous voulons comparer ce sont les spectres des échantillons positifs à l'histamine.

II-2-6 Mesure de la couleur par colorimètre Minolta

Les colorimètres Minolta sont souvent utilisés pour mesurer la couleur dans une grande variété de domaines et notamment pour mesurer la couleur de produits alimentaires. De plus, ce sont des appareils légers et portables. Ils représentent un investissement d'environ 8000€.

L'appareil utilisé est un colorimètre Minolta CR-300. Le colorimètre CR-300 de Minolta est un analyseur de couleur tri stimulus (flash blanc émis et trois récepteurs différents : rouge, bleu et vert) compact destiné aux mesures de couleurs d'objets.

II-2-6-1 Mesure de la couleur : Système L^* , a^* et b^*

La couleur des échantillons est exprimée selon le système CIELAB L^* , a^* et b^* qui permet de faire une bonne distinction parmi les couleurs saturées comme le sont celles des chairs de thon rouge. L'échelle présente trois paramètres (figure 9).

Le paramètre L^* , facteur de clarté, représente une approximation mathématique non linéaire de la réponse de l'œil aux couleurs noires et blanches. Il a une valeur égale à 100 pour la couleur blanche et à 0 pour la couleur noire. Il donne une indication de la luminosité de la surface mesurée.

Les paramètres a^* et b^* sont les coordonnées de chromaticité :

Le paramètre a^* prend des valeurs comprises entre -60 et $+60$, les valeurs négatives indiquent les couleurs verdâtres et les valeurs positives les couleurs rougeâtres.

Le paramètre b^* prend également des valeurs entre -60 pour les couleurs jaunâtres à $+60$ pour les couleurs bleuâtres.

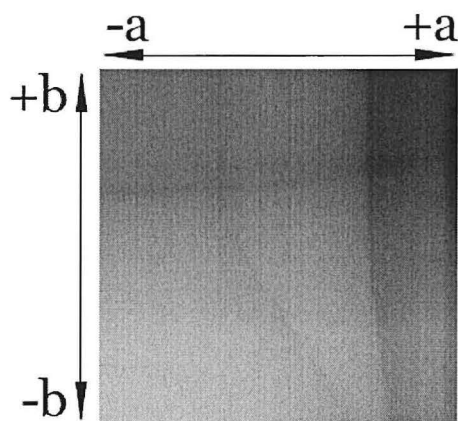


Figure 9 : Représentation de la mesure de la couleur par colorimètre (luminescence $L=50\%$)

II-2-6-2 Traitement statistique des données

Afin de savoir si le colorimètre est capable de faire la différence entre les couleurs de nos échantillons, nous disposons dans notre jeu de données de 15 mesures du paramètre L^* , 15 mesures du paramètre a^* et 15 mesures du paramètre b^* par jour et pour chaque échantillon. Nous avons fait plusieurs tests d'analyse de variance (tests ANOVA) pour étudier les différences de moyennes des paramètres « couleur ». L'analyse de variance nous permet de comparer des moyennes de différents groupes et de dire si, parmi l'ensemble, au moins l'une d'entre elles diffère des autres, au niveau de confiance 95%, mais on ne sait ni laquelle ni combien d'entre elles. Afin de déterminer si un échantillon, ou un groupe d'échantillons, est significativement différent des autres nous avons utilisé des tests de comparaison multiples. Ce test permet de regrouper les échantillons dont la moyenne de la variable étudiée est sensiblement la même et de les distinguer des autres groupes. La méthode utilisée pour discriminer entre les moyennes est la procédure des différences significatives minimales de Fisher (LSD).

III- Résultats et discussion

III-1 Problème de l'histamine

III-1-1 Dosage de l'histamine par HPLC

III-1-1-1 Discussion sur les chromatogrammes

Le chromatogramme présenté ci-dessous (Figure 10) montre le pic et le temps de rétention de l'histamine : 13,31 minutes. La relation entre l'aire sous le pic (délimitée par la ligne de base) et l'aire sous le pic de l'étalon permet de calculer la teneur en histamine de notre échantillon.

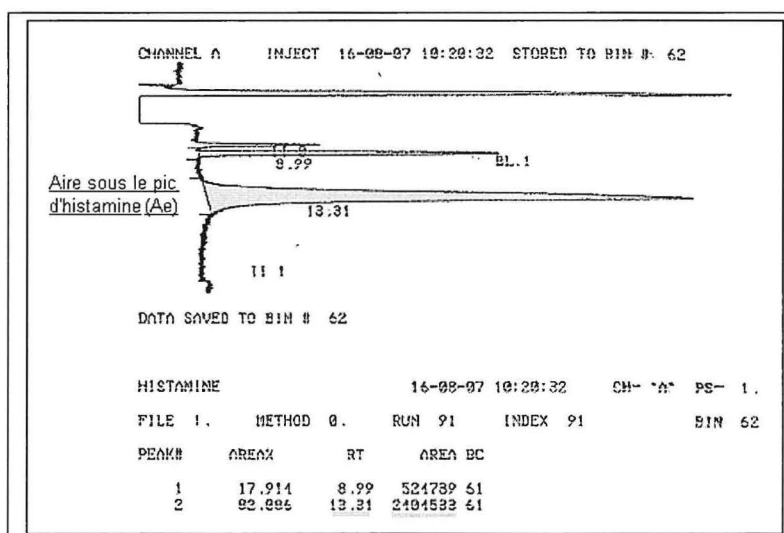


Figure 10 : Chromatogramme HPLC (échantillon 85)

III-1-1-2 Résultats

Le tableau des résultats obtenus est présenté en annexe 1. Ce tableau donne les teneurs en histamine en mg/kg de chair de poisson.

Les teneurs en histamine sont comprises entre 0 et 370,76 ppm.

Les valeurs arbitrairement notées 2000 ppm correspondent aux échantillons dont la valeur en histamine n'est pas exactement connue car nous avons atteint les limites de l'HPLC, soit 500 ppm environ.

Variabilité des teneurs en histamine

Le tableau descriptif des résultats en HPLC présenté ci-dessous montre l'hétérogénéité des teneurs en histamine avec et sans traitement (incubation par *M. morgani*). Ce tableau reprend les valeurs 0 et 2000 ppm.

Nous pouvons voir que les échantillons qui n'ont pas été l'objet d'un traitement particulier ont des teneurs en histamine très faibles, voir nulles.

En revanche, les échantillons incubés sont un peu mieux répartis sur la gamme mais les valeurs restent fortes avec de nombreux points à 2000 ppm.

	classes	Nombre de spectres	Minimum (ppm)	Maximum (ppm)	Etendue (ppm)	Moyenne (ppm)	Ecart-type (ppm)
[Histamine] en ppm	0	117					
	0 < [Hist.] < 370,76	135	1,44	18,48	17,04	5,53	3,96
	Arbitrairement 2000	0					
[Histamine] en ppm après ensemencement	0	6					
	0 < [Hist.] < 370,76	102	2,64	370,76	368,12	92,83	129,58
	Arbitrairement 2000	69					

Tableau 3 : Tableau descriptif des résultats en HPLC

L'histogramme présenté ci-dessous (figure 11) a été construit sans les valeurs 0 et 2000 ppm. Seuls les spectres relatifs aux échantillons qui ont servi pour faire la calibration sont représentés. Nous pouvons voir que la grande majorité des échantillons (202) sont dans la fourchette 0-38 ppm. Nous retrouvons quelques échantillons avant 76 ppm puis plus rien avant 152 ppm. Enfin, quelques rares échantillons ont été dosés entre 152 et 380 ppm.

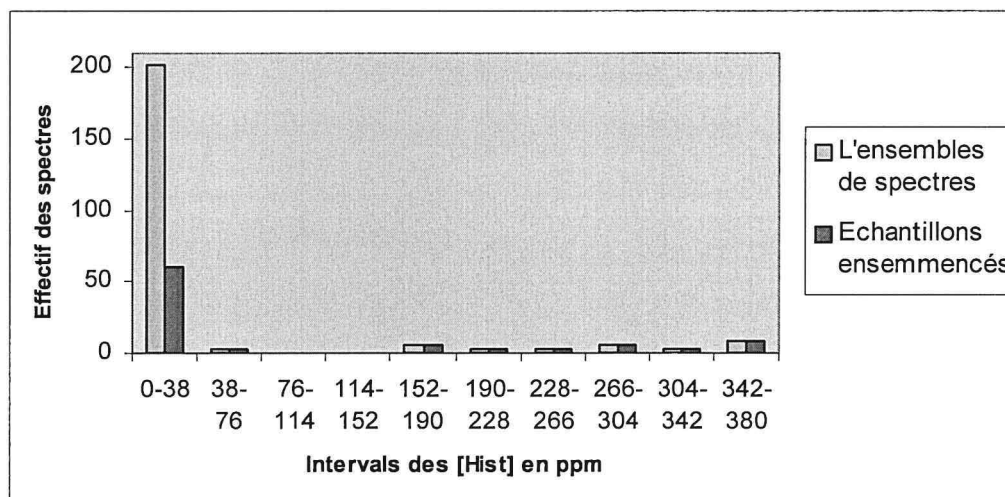


Figure 11 : Distribution des teneurs en histamine

Pour avoir une calibration plus juste lors de l'analyse des spectres, il aurait fallu compléter la gamme afin d'avoir des points dans chacune des fourchettes. Mais les difficultés rencontrées pour trouver des échantillons positifs et pour contrôler la production de cette amine biogène par la souche *Morganella morganii* ne nous ont pas permis d'obtenir ces points dans le temps qui nous a été imparti pour cette étude. Nous aurions également pu mélanger des chairs de thons fortement contaminées avec des chairs indemnes d'histamine pour obtenir la gamme recherchée.

III-1-2 Résultats des tests de la SPIR : Répétabilité spectrale et estimation de l'erreur quadratique moyenne (RMS)

III-1-2-1 Test de répétabilité sur morceaux entiers

Les calculs de RMS en dérivé seconde ont montré une bonne répétabilité des résultats lors des 5 mesures successives sur chacune des faces étudiées.

En revanche, nous pouvons observer une différence significative des spectres entre la face supérieure et la face inférieure (figure 12).

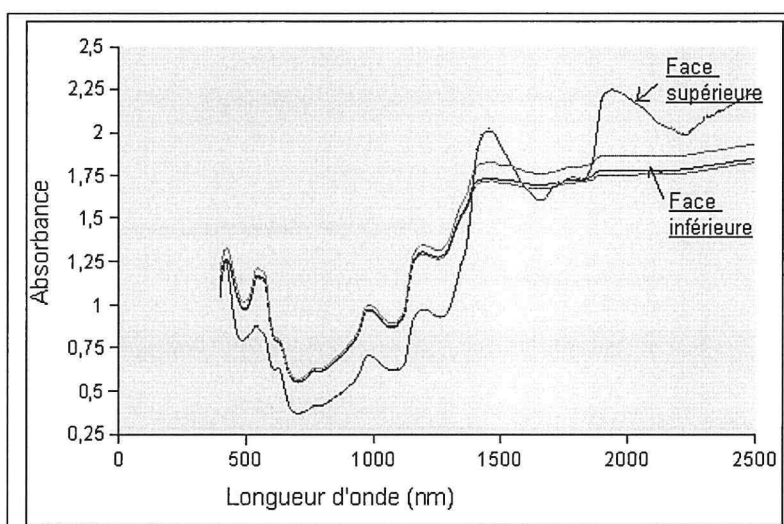


Figure 12 : Spectres obtenus sur les faces supérieure et inférieure d'un morceau de thon.

Les différences spectrales montrent une différence de composition chimique entre les deux faces.

Nous avons donc regardé dans un second temps si cette différence peut être effacée si les morceaux de chair sont broyés.

III-1-2-2 Test de répétabilité sur broyats

Les valeurs de RMS calculés sur les broyats montrent une bonne répétabilité des résultats mais également une bonne homogénéité d'une mesure à l'autre. En effet, en broyant l'échantillon nous pouvons nous assurer de gommer l'effet hétérogénéité de la composition chimique de la chair de thon rouge rencontré sur les différentes faces des morceaux de thons entiers.

Lors des expérimentations à venir nous avons donc décidé de travailler sur broyats. Il est également important de broyer l'intégralité de l'échantillon à afin de se rapprocher le plus possible d'un «morceau représentatif» contenant toute l'hétérogénéité de la chimie de la chair du thon mais également l'homogénéité d'un échantillon à l'autre.

III-1-3 Analyse des spectres de la SPIR

III-1-3-1 Analyse des spectres

Nous avons obtenu un total de 429 spectres représentant les 143 échantillons (trois spectres par échantillon). Ces spectres sont répartis de la manière suivante :

- 252 spectres sur thons sans traitement,
- 177 spectres sur thonsensemencés.

Les RMS en dérivées secondes (2, 5, 5) ont été calculées pour l'ensemble des spectres et les valeurs obtenues n'ont pas montré de différence significative des trois spectres sur l'ensemble des échantillons de l'étude.

De plus, l'observation des spectres nous permet d'affirmer qu'il n'y a pas de spectre « atypique ». En revanche, dans la zone du visible (entre 350 et 500 nm) et en fin d'infrarouge (entre 1800 et 2500 nm) les spectres sont difficilement interprétables car il y a de nombreuses interférences (= bruit).

III-1-3-2 Analyse en composante principale sur l'ensemble de mes spectres

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est réalisée sur les données du fichier contenant tous les spectres de tous les échantillons. Nous avons travaillé avec un spectre réduit, de 500 à 1800 nm, en dérivée seconde et corrigé pour la dispersion de la lumière (correction SNVD). La matrice X des données spectrales a pour dimension 429 lignes (correspondant aux spectres) et 142 colonnes (correspondant au nombre de longueurs d'onde). Les deux premières Composantes Principales expliquent 91,31 % de l'inertie totale du nuage de spectres (tableau 4).

Composante Principale	Variance expliquée (%)	Cumul (%)
CP 1	84,81	84,81
CP 2	6,5	91,31

Tableau 4 : Variances expliquées par les deux premières Composantes Principales

20 spectres ont des valeurs de $H > 3$ et sont donc considérés hors normes. 17 des 20 spectres dont la distance de Mahalanobis est supérieure à 3 sont des spectres dont la teneur en histamine de l'échantillon référent n'est pas quantitativement connue et a été ramené arbitrairement à 2000 ppm.

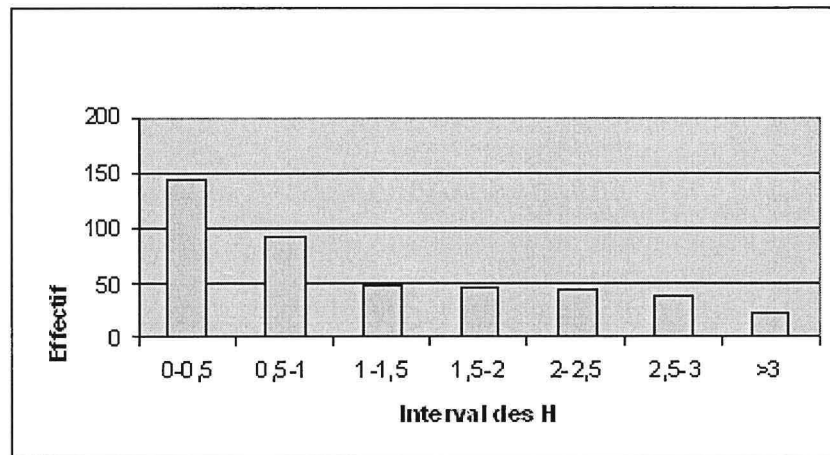


Figure 13 : Distribution des H statistiques

La représentation graphique du nuage de spectres sur les deux premiers axes, qui explique 91,31% de la dispersion totale des spectres est présentée sur la figure 14 ci-dessous. Ce graphique montre une structure en « papillon » des différents échantillons. On peut alors valider, du fait de cette structure, que les échantillons sont groupables car spectralement proches et que ces groupes sont distinctement différents les uns des autres. On peut alors penser que les « paquets » sont structurés en fonction de la variabilité due aux différences de concentration. Or, il s'avère que si l'on regarde les échantillons dont la teneur en histamine est comprise entre 0 et 30 ppm, 0 ppm exclu, ils sont largement dispersés.

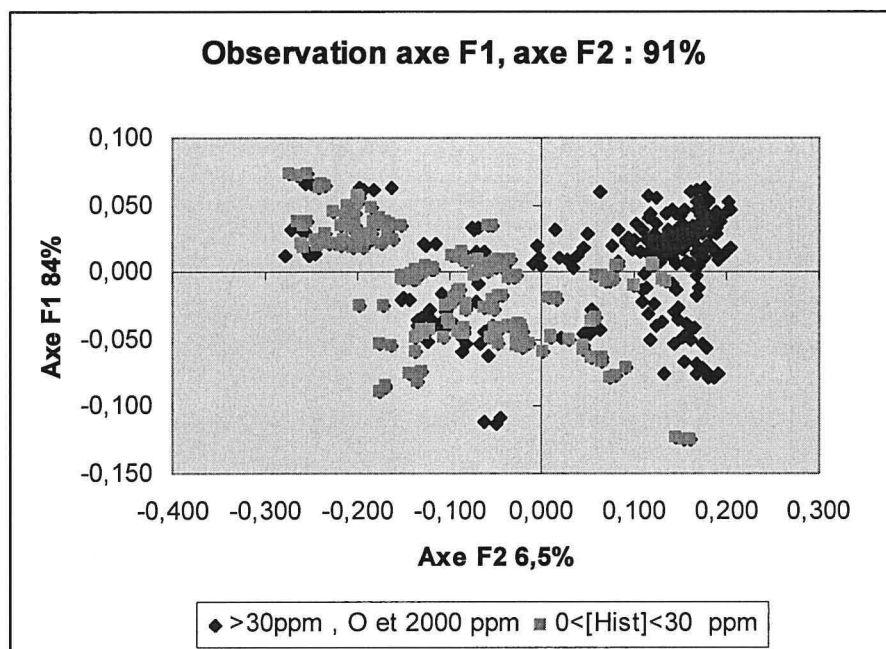


Figure 14 : Représentation graphique des spectres SPIR dans l'espace formé par les 2 premières Composantes Principales

A ce stade de l'analyse des résultats nous pouvons dire que les spectres sont significativement différents les uns des autres et qu'un regroupement des échantillons est visible sur la représentation graphique. Mais il paraît évident, au vu de la dispersion des spectres, que ces regroupements par échantillon sont indépendants de la concentration en histamine.

III-1-4 Calibration de la SPIR et prédictions de teneurs en histamine

III-1-4-1 Résultats et équations de calibration de la SPIR

Pour la base spectrale des teneurs en histamine nous avons développé une calibration permettant de faire les prédictions sur les teneurs de l'amine biogène des autres échantillons.

Les paramètres suivants sont identiques pour chaque équation :

- dérivée seconde des spectres (2, 5, 5),
- correction de dispersion de la lumière de type SNVD,
- régression PLS,
- valeur de rejet du test de t de Student pour les échantillons hors normes en Y est fixée à 2,5.

Le tableau 5 présente les résultats de 4 calibrations :

	Traitement		N	Moy	ET	SEC	R ² (RSQ)	SECV
	Longueurs d'onde	Spectres						
1	Totalité du spectre	Sans échantillons "2000" et 0 ppm	207	15,5	37,8	4,2	1,0	17,4
2	Spectre réduit 500-1800 nm	Sans échantillons "2000" et 0 ppm	207	17,4	44,4	10,0	0,9	16,9
3	Spectre réduit 500-1800 nm	Sans échantillons "2000", avec 0=0,001 ppm	309	4,3	10,3	3,7	0,9	12,0
4	Spectre réduit 500-1800 nm	Sans échantillons "2000", sans 0 et sans échantillons >30 ppm	177	5,4	3,5	2,2	0,6	2,3

Tableau 5 : Résultats des équations de calibration en SPIR

N : Nombre d'échantillons retenus par le modèle (test t)

Moy : Moyenne

R² : Coefficient de détermination

ET : Ecart-type de la population de calibration

SEC : Erreur standard de calibration

SECV : Erreurs standard de validation croisée

Sur la première équation, la base spectrale initiale contenant les 429 spectres a été triée pour ne garder que les 207 spectres en vue de la calibration. Puis un fichier « PLS calibration » a été créé, contenant ces 207 références qui associent les données spectrales aux données HPLC. Les spectres associés aux valeurs « 2000 » et « 0 » ppm ont été initialement écartés de la base de données utilisée pour le calcul de l'équation de calibration. R² est proche de 1 car les échantillons forment deux groupes de points (< 30 ppm et > 150 ppm) bien séparés. Le SEC montre que le modèle considère qu'il peut prédire les teneurs en histamine à 4,2 ppm près. En revanche la valeur de SECV est inquiétante car élevée et éloignée du SEC. Conserver un spectre dont une partie est bruitée n'est pas très judicieux pour obtenir une bonne calibration. Nous avons donc effectué une seconde calibration en réduisant le spectre (équation 2).

Pour cette nouvelle équation, la valeur de SEC est plutôt forte mais elle se rapproche de SECV. R^2 est plutôt bon car les différentes valeurs forment également 2 groupes.

L'équation 3 intègre à la base de données les spectres des échantillons 0 ppm. Dans ce nouveau dossier, 309 spectres ont été sélectionnés. On peut voir que dans ce nouveau cas les valeurs de SEC et de SECV sont relativement meilleures que pour les deux premières équations. Mais on remarque également que la moyenne est très faible. Les prédictions seront donc de mauvaise qualité.

L'équation 4 est établi à partir des échantillons 0 à 30 ppm, sans les valeurs « 0 », pour voir si les prédictions des teneurs en histamine sont meilleures. En retirant les valeurs supérieures à 30 ppm on obtient un échantillonnage qui recouvre plus largement la gamme que dans les trois premières équations ou on avait 2 groupes. Le coefficient de détermination tombe alors dans ce nouveau cas de figure à 0,6. Les valeurs de SEC et de SECV sont relativement faibles et plutôt proches.

III-1-4-2 Prédiction des teneurs en histamine sur l'ensemble des échantillons

Nous avons décidé de travailler avec les équations de calibrations 2 et 4 pour établir les prédictions sur l'ensemble des échantillons. L'équation 1 n'a pas été utilisée car elle a été établie sur l'ensemble du spectre. L'équation 3, quand à elle, prend en compte les « 0 » ppm, ce qui peut fausser l'équation car la variable étudiée, l'histamine, est absente de ces échantillons.

Les résultats des valeurs prédites à partir des deux équations de prédiction sont présentés en annexe 2.

Nous pouvons observer que, quelle que soit l'équation de calibration utilisée, les valeurs prédites pour les échantillons «2000» ont des valeurs de prédiction très faible, comprises entre 10 et 200 ppm. En revanche, les échantillons « 0 » ppm sont parfois prédits à des teneurs en histamine très élevés pouvant atteindre les 200 ppm.

Il semble évident que les performances des deux modèles utilisés en prédiction ne sont pas suffisantes et qu'en extrapolant aux échantillons « 0 » et « 200 » ppm les performances des modèles sont très mauvaises.

III-1-5 Analyse factorielle discriminante (AFD)

L'analyse factorielle discriminante (AFD) est une méthode descriptive et explicative, apparentée à l'analyse en composantes principales (ACP) s'appliquant à des données quantitatives sur lesquelles est déjà définie une typologie. Dans notre cas, des données spectrales associées à des teneurs en histamine < à 30 ppm et > à 30 ppm. Nous avons choisi la valeur de 30 ppm qui nous semble être un bon seuil pour faire un premier tri des poissons destinés à l'exportation. De plus, à dire de pêcheurs, au-delà de cette valeur de 30 ppm la concentration en histamine augmente rapidement dans la chair de thon. L'analyse factorielle discriminante a été réalisée sur la base des composantes principales (les 10 premières) extraites de la matrice spectrale centrée après prétraitement des spectres : segment des longueurs d'onde hors bruit 500 nm-1800 nm, dérivée seconde des spectres, correction SNVD de dispersion de la lumière.

Le tableau de valeurs présenté ci-dessous (tableau 6) montre les résultats de l'analyse factorielle discriminante effectuée sur les 329 spectres :

de \ Vers	< 30 ppm	> 30 ppm	Total	% correct
< 30 ppm	316	2	318	99,37%
> 30 ppm	22	89	111	80,18%
Total	338	91	429	94,41%

Tableau 6 : Tableau de répartition des spectres suite à une AFD

D'après les données du tableau de résultats de l'AFD :

- 99,37% des spectres du groupe < 30 ppm sont correctement placés. Seuls deux échantillons auraient été préférentiellement placés dans le groupe > 30 ppm.
- 80,18% des spectres du groupe > 30 ppm sont correctement placés. Mais 22 spectres sur un total de 111 ne sont pas dans le groupe d'après l'analyse.

Si un poisson présente une teneur en histamine strictement inférieure à 30 ppm, il y a plus de 99% de chance que le poisson soit effectivement identifié comme tel.

En revanche, si un poisson présente une teneur supérieure à 30 ppm, il y a une chance sur 5 pour qu'il soit considéré comme non satisfaisant.

Ce résultat est intéressant car il montre que la probabilité de consommer un poisson contaminé est faible. Par contre, on prend le risque de retirer du lot des poissons indemnes d'histamine.

Donc si les résultats sont confirmés on fait courir, aux professionnels de la pêche palangrière réunionnais, un risque économique (perte sur le retrait d'un poisson sain) mais ils sont à l'abri d'un risque de santé publique (intoxication par les consommateurs).

III-1-6 Discussion sur l'analyse des premiers résultats

Les spectres de la SPIR sont le reflet de la composition chimique des échantillons analysés par HPLC.

Le SPIR est utilisé dans cette étude pour voir s'il peut être utilisé pour distinguer rapidement les échantillons contaminés des échantillons sains. Nous avons également pour objectif de quantifier grâce à cet outil d'analyse, rapide et non destructeur, la teneur en histamine.

Les prélèvements réalisés pendant la durée du stage n'ont pas permis de recouvrir correctement l'ensemble de la gamme 0-300 ppm. En effet, en raison de l'absence d'échantillons contaminés, nous avons cherché à produire cette amine biogène par l'utilisation de *Morganella morganii*. Dès lors, il est très difficile de caler temps et température d'incubation avec la quantité d'amine produite et c'est pour cette raison que des points manquent entre 50 et 200 ppm. De plus, par ce processus artificiel de contamination des échantillons, nous sortons des conditions standard d'accumulation d'histamine dans le thon. On prend alors le risque d'observer des différences spectrales dues à l'activité du micro-organisme et non plus à la présence de l'histamine.

Il est important de préciser que la méthode possède quelques limites. En effet nous avons vu que dans la plupart des cas les substances présentes à l'état de traces (< 1%) dans les échantillons ne peuvent pas être prédites par la technique car le signal leur correspondant est trop faible. Comme nous travaillons avec des teneurs de l'ordre du ppm c'est le changement global de la chimie de la chair de thon que nous avons espéré observer.

La comparaison des résultats de prédiction SPIR aux résultats des analyses en HPLC nous a permis d'ajuster une équation de régression linéaire pour l'histamine. Globalement les valeurs prédites sont proches des valeurs de référence à l'exception des échantillons rejetés pour la calibration suite au test *t* de Student et pour les échantillons 0 et 2000 ppm. Mais l'analyse ACP nous a montré que les différences spectrales, visibles, ne sont pas dues à l'histamine et qu'il est par conséquent très difficile d'espérer un jour quantifier l'histamine par SPIR pour des valeurs aussi faibles.

En revanche, avec les premiers résultats de l'analyse factorielle discriminante nous pouvons penser que la méthode SPIR pourra être un jour efficace pour faire un premier tri. Par contre, pour les échantillons dont la teneur en histamine est supérieure à 30 ppm, les résultats de la SPIR doivent être confirmés par une autre méthode d'analyse. Nous pensons qu'un kit peut être l'outil le plus adapté pour confirmer les résultats.

III-1-6 Evaluation des kits de dosage rapide de l'histamine

Après avoir procédé à l'inventaire des tests de dosage rapide de l'histamine (cf. partie I-3-1-2 b) qui existent sur le marché nous avons essayé 3 des ces kits. Plusieurs critères d'évaluation ont été pris en considération pour cette étude : Le coût, la sensibilité, la rapidité ainsi que le niveau de complexité de la mise en œuvre sont les principaux critères de « notation » (tableau 7).

Test	Determination	Etapes expérimentales	Durée test	Technicité	Echantillon/Kit
Transia Histamine (Diffchamb)	Semi-quantitatif. Gamme= 0; 25; 50; 100 et 200 ppm	Extraction, dilution, complexation, test immunoenzymatique et lecture (5)	3 Heures	Importante car 5 étapes expérimentales et manipulation de petits volumes	48 (- 5 à chaque gamme)
RidaQuick Histamine (R-Biopharm)	Quantitatif Sans lecteur la lecture semi-quantitative est possible; gamme de 0; 2,5; 5; 10; 20 et 40 ppm	Extraction, passage en colonne échangeuse d'ions (purification), coloration et lecture (4)	1 Heure	Faible.	48
Histamarine (Immunotech)	Quantitatif Gamme de 1, 10, 50, 100 et 500 ppm	Extraction, dilution, acylation, test immunoenzymatique et lecture (5)	2 Heures	Importante car 5 étapes expérimentales et manipulation de petits volumes	38

Test	Coûts		Sensibilité	Gamme de détection
	Passage	Investissement départ		
Transia Histamine (Diffchamb)	315/48=6,56€	<u>Important:</u> spectrophotomètre, micropipettes, balance, verrerie,...	+/- 5 ppm	Entre 25 et 200 ppm
RidaQuick Histamine (R-Biopharm)	355/48=7,39€	<u>Important:</u> Micropipettes, centrifugeuse, balance,... à <u>très important:</u> Lecteur de micro-plaques	+/- 0,5 ppm	Entre 0,5 et 40 ppm
Histamarine (Immunotech)	420/38=11,05€	<u>Très important:</u> Lecteur de micro-plaques, micropipettes, balance, centrifugeuse,...	+/- 1 ppm	Entre 1 et 500 ppm

Test	Avantages	Inconvénients	Note/20
Transia Histamine (Diffchamb)	Gamme de standardisation;	Consommation de 5 tubes pour les étalons, le prix, durée du test, manipulation de petits volumes et la technicité importante	12
RidaQuick Histamine (R-Biopharm)	Rapide, facile à mettre en place, lecture semi quantitative facile, très sensible, pas trop cher.	N'indique pas les concentrations au dessus de 40 ppm, formation conseillée	18
Histamarine (Immunotech)	Facile à mettre en place, dosage teneurs en histamine sur une gamme importante	Chers au passage et en investissement de départ, nécessite un laboratoire et nécessite une petite formation.	15

Tableau 7 : Comparaison de 3 kits de dosage rapide d'histamine

Nous avons trouvé que le kit qui répondait le mieux aux objectifs que nous nous sommes fixés est le kit quantitatif Ridaquick histamine. Ce test offre la possibilité de lire, très facilement, les concentrations de façon semi quantitative et dans une gamme étalon très intéressante pour les pêcheurs (0 à 40 ppm). De plus il est facile à mettre en place et il ne nécessite pas une grande technicité. Ce test est de plus le plus rapide et celui qui demande le moins de petit matériel. Les résultats obtenus avec le kit sont les mêmes que ceux obtenus avec un dosage HPLC (Tableau 8).

	Echantillon 113	Echantillon 117	Echantillon 122	Echantillon 129
[Histamine] en ppm : HPLC	4,81	12,64	33,06	50,45
[Histamine] en ppm : kit ridaquick histamine	Entre 2,5 et 5	Entre 10 et 20	Entre 20 et 40	> 40

Tableau 8 : Teneurs en histamine détectés par deux analyses différentes

Ce que nous pouvons principalement lui reprocher c'est qu'il ne permet de connaître avec précision des valeurs en histamine supérieures à 40 ppm du fait d'une gamme étalon trop faible sur les grandes valeurs. Mais si le SPIR se montre utile comme outil pour faire un premier tri entre les poissons dont la teneur est inférieure à 30 ppm, alors on peut très bien envisagé que le Kit Ridaquick histamine soit l'outil idéal pour confirmer les échantillons supérieurs à 30 ppm.

III-2 Phénomène de chair brûlée

A chaque temps de mesure, 15 mesures de L^* , a^* et b^* ont été réalisés par échantillon. Le tableau ci-dessous présente ces valeurs (tableau 9).

Numéro échantillon	Code couleur	Paramètre	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
Echantillon 1	A+	L^*	30,95	31,23	32,52	32,43	33,05
		a^*	10,07	10,45	10,38	9,28	9,43
		b^*	4,40	4,87	4,28	3,54	4,11
Echantillon 2	A+	L^*	31,33	30,69	33,23	33,78	33,76
		a^*	8,45	8,38	9,56	8,97	9,98
		b^*	3,36	3,43	4,31	4,02	4,80
Echantillon 3	A	L^*	34,21	35,26	40,80	39,07	39,28
		a^*	11,94	11,74	9,72	10,49	10,06
		b^*	6,27	6,60	5,53	6,33	6,39
Echantillon 4	A	L^*	30,96	32,08	31,57	32,60	31,82
		a^*	6,36	6,42	6,32	6,09	5,71
		b^*	2,59	2,30	2,68	2,38	2,44
Echantillon 5	B+	L^*	40,03	36,99	40,44	39,82	40,60
		a^*	10,70	10,09	10,25	9,47	9,51
		b^*	4,95	4,50	5,23	5,28	5,72
Echantillon 6	B	L^*	40,39	41,28	41,71	42,94	41,35
		a^*	11,84	11,85	11,94	10,73	10,17
		b^*	6,22	6,66	6,81	6,33	6,15
Echantillon 7	B	L^*	43,83	44,84	44,07	47,30	47,61
		a^*	8,49	8,33	7,36	7,00	6,50
		b^*	4,56	4,64	4,56	4,99	4,99

Tableau 9 : Valeurs moyennes de L^* , a^* et b^* pour les 7 échantillons et à chaque temps de mesure

III-2-1 Distinction des différentes couleurs

III-2-1-1 Analyse du paramètre L^*

→ Analyse statistique des résultats

Toutes les analyses statistiques qui suivent ont été réalisées à partir des valeurs du paramètre L^* au temps de mesure Jour 1.

a) L'analyse de variance : ANOVA

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	2590,83	6	431,806	17,22	0
Intra-groupes	2457,82	98	25,0798		
Total (Corr.)	5048,65	104			

Tableau 10 : Tableau de l'ANOVA du paramètre L^* au jour 1

L'ANOVA (tableau 10) décompose la variance des données en deux composants : un composant inter-groupes et un composant intra-groupes. Le rapport F, qui dans ce cas est égal à 17,22, est un rapport de l'estimation inter-groupes par rapport à l'estimation intra-groupes. Comme la valeur de la probabilité pour le test F est inférieure à 0,05, il y a une différence statistiquement significative entre les moyennes des 7 échantillons au niveau de confiance de 95%.

Pour déterminer quelles moyennes sont significativement différentes les unes des autres, nous avons réalisé un test des étendues multiples.

b) Test des étendues multiples

Le test utilisé permet des comparaisons multiples pour déterminer les moyennes qui sont significativement différentes les unes des autres. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous et montrent que 3 groupes homogènes sont identifiés. Les mesures de L^* des échantillons 1, 2, 3 et 4 forment le premier groupe à l'intérieur duquel il n'y a pas de différences statistiquement significatives. Les échantillons 5 et 6 forment un deuxième groupe. On peut noter que l'échantillon 6 trouve une place dans 2 groupes et forme avec l'échantillon 7 le troisième groupe. On retrouve au final le même classement que celui, beau à moche, des pêcheurs.

Echantillon et code couleur	Nbre de mesures de L	Moyenne	Groupe homogène
Ech 1: A+	15	30,952	X
Ech 4: A	15	30,9567	X
Ech 2: A+	15	31,3307	X
Ech 3: A	15	34,208	X
Ech 5: B+	15	40,0313	X
Ech 6: B	15	40,3927	X X
Ech 7: B	15	43,8267	X

Tableau 11 : Classement et regroupements des catégories selon le paramètre L^* des 7 échantillons au jour 1

III-2-1-1 Paramètres a^* et b^*

Dans les deux cas (a^* et b^*), l'ANOVA montre qu'il y a une différence statistiquement significative entre les moyennes des 7 échantillons au niveau de confiance de 95%. Pour déterminer quelles moyennes sont significativement différentes les unes des autres, nous avons réalisé un test des étendues multiples (tableaux 12 et 13).

Echantillon et code couleur	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
Ech 4: A	15	6,36	X
Ech 2: A+	15	8,45133	X
Ech 7: B	15	8,48933	X
Ech 1: A+	15	10,072	X
Ech 5: B+	15	10,7013	X X
Ech 6: B	15	11,8367	X
Ech 3: A	15	11,9413	X

Tableau 12 : Regroupement et catégories selon le paramètre a^* des 7 échantillons au jour 1

Echantillon et code couleur	Effectif	Moyenne	Groupe Homogène
Echantillon 4: A	15	2,59	X
Echantillon 2: A+	15	3,36	X
Echantillon 1: A+	15	4,04	X
Echantillon 7: B	15	4,56	X
Echantillon 5: B+	15	4,95	X
Echantillon 6: B	15	6,22	X
Echantillon 3: A	15	6,27	X

Tableau 13 : Regroupement et catégories selon le paramètre b^* des 7 échantillons au jour 1

Les tests des étendues multiples réalisés montrent un regroupement de nos échantillons qui ne correspond pas aux codes couleurs initialement établis avec les pêcheurs.

En conclusion, seul le paramètre L^* est utilisable pour distinguer et classer les thons selon leur niveau de brunissement. Aussi, pour le suivi de la couleur en conservation nous avons décidé d'utiliser uniquement le paramètre L^* .

III-2-2 Suivi de la couleur de la chair de thon en conservation

A partir des données du paramètre L^* mesurés chaque jour nous observons graphiquement (figure 15) que la couleur d'un échantillon à l'autre évolue peu. Les tests d'ANOVA réalisés sur chaque échantillon ne montrent pas de différences statistiquement significatives d'une valeur moyenne de L^* d'un jour sur l'autre. Seul l'échantillon 7 (code B) a évolué de façon significative.

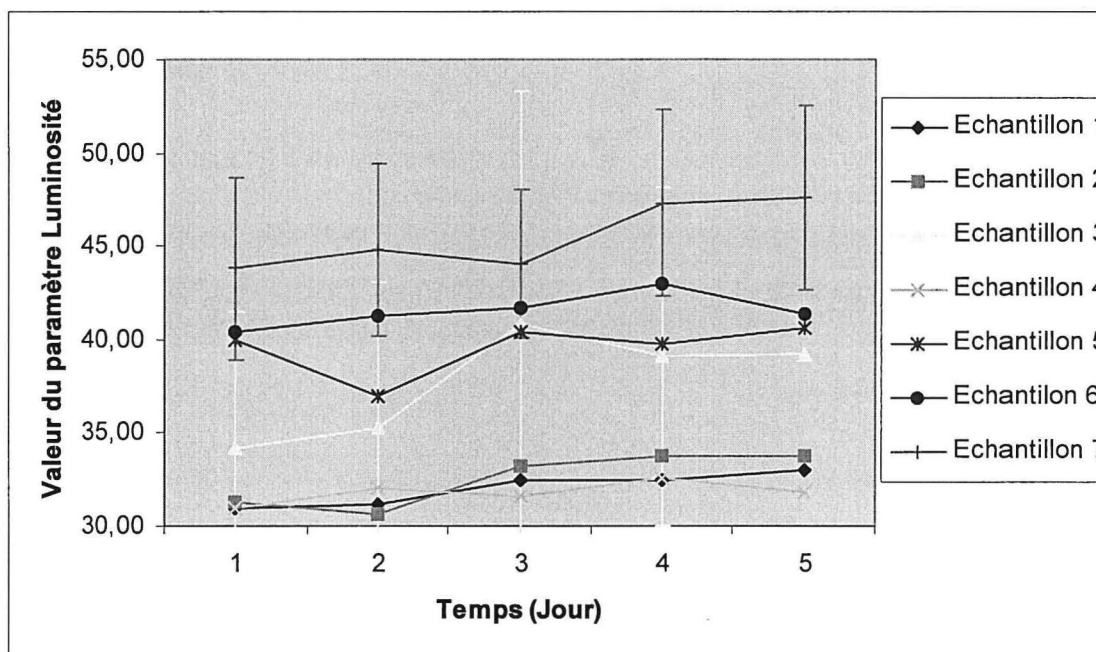


Figure 15: Evolution du paramètre L^* au cours de la conservation des échantillons

Les résultats de l'étude montrent que le Minolta peut être utilisé pour évaluer de façon objective la couleur des chairs de thon. Le paramètre L^* est le plus approprié pour évaluer le brunissement de la chair. On peut voir également que les échantillons 1, 2 et 4 pour qui la valeur initiale de L^* est d'environ 30 n'ont pas évolué lors de la conservation. Il semblerait donc qu'un échantillon dont le paramètre colorimétrique L^* est inférieur ou égal à 30 arrivera à Rungis, 4 jours après sa débarque, sans avoir perdu de sa qualité de couleur s'il est conservé au froid.

Comme le phénomène se produirait notamment lorsque le pH est bas (production d'acide lactique) il aurait été intéressant de prendre les valeurs de pH de la chair de thon en parallèle du suivi visuel ou par le paramètre L^* de la couleur.

Conclusions et perspectives

Une partie du travail proposait d'évaluer le potentiel du SPIR pour la détection et le dosage de l'histamine dans la chair de thon. L'HPLC a été utilisée comme méthode de référence pour le dosage de l'amine biogène étudiée afin de calibrer le SPIR.

Nous avons rencontré beaucoup de problèmes pour avoir des échantillons naturellement riches en histamine. Pour ce faire nous avons été contraints d'ensemencer quelques échantillons avec *Morganella morganii*. Cette méthodologie nous a permis d'obtenir des broyats de thon avec une teneur en histamine dans la gamme désirée (0 à 300ppm). Cependant la distribution n'est pas parfaite car il manque des échantillons entre 50 et 150 et le nombre d'échantillons supérieurs à 30 ppm n'est pas suffisant.

Nous avons ainsi pu calibrer le SPIR. Les résultats montrent qu'une discrimination entre les poissons non ou faiblement contaminés (< 30 ppm) et les poissons dont la teneur en histamine est supérieure à 30 ppm est possible. Toutefois l'AFD montre une faille pour les échantillons > 30 ppm : 1 échantillon sur 5 dont la teneur en histamine est inférieure à 30 ppm serait jugée par le SPIR supérieure à 30 ppm. Aussi, un contrôle de la teneur en histamine pour les échantillons concernés par une analyse de référence (HPLC ou CCM) ou avec un kit de dosage rapide pourrait s'avérer nécessaire. Cette hypothèse doit cependant être confirmée car il serait peut être moins rentable pour le pêcheur de faire cette confirmation que de mettre à l'écart un thon qui n'aurait pas du l'être.

Des prélèvements supplémentaires pour obtenir une meilleure gamme sont nécessaires. On peut essayer de faire des prélèvements à d'autres saisons. Ou mélanger des broyats de thon non contaminés avec le même broyatensemencé avec *M. morganii* ou encore essayer de mieux caler les temps d'incubation.

La deuxième partie de notre travail consistait à faire un inventaire des méthodes de dosage rapide de l'histamine commercialisés sous la forme de kits. Trois kits ont été essayés et nous avons pu voir que le kit Ridaquick histamine est le kit de dosage le plus facile à utiliser directement à la débarque par les pêcheurs. Il est le plus rapide, ne demande pas un matériel de laboratoire conséquent et coûteux et sa prise en main est facile. En revanche, la gamme de concentration en histamine qu'il recouvre (de 0,5 à 40 ppm) n'est pas satisfaisante si on se contente de simplement répondre à la norme européenne (inférieure à 100 ppm et deux échantillons au maximum entre 100 et 200ppm). Par contre elle est suffisante si on souhaite savoir si la teneur en histamine du thon est supérieure ou non à 30 ppm ou pour confirmer les échantillons supérieurs à 30 ppm détectés par le SPIR. Le SPIR pourrait à l'avenir être utilisé pour trier les poissons selon que leur teneur en histamine est inférieure ou supérieure à 30 ppm. Le Kit Rida Quick histamine serait alors utilisé en complément pour confirmer les échantillons supérieurs à 30 ppm.

L'étude sur la mesure de la couleur du thon a montré que le paramètre L^* du colorimètre Minolta peut être utilisé pour différencier une chair rouge d'une chair brune. Ce résultat reste à confirmer sur un grand nombre d'échantillons. Si tel est le cas, il est directement transférable aux pêcheurs pour une utilisation du colorimètre à la débarque.

De plus, il semble qu'un échantillon dont la valeur L^* est initialement proche de 30 ne perdra pas en qualité durant une période de conservation de 4 jours. Des analyses complémentaires de suivi du paramètre L^* en conservation en simulant des ruptures de chaîne de froid, couplées à une observation visuelle du brunissement du thon pourrait permettre de mettre en évidence une valeur de L^* à ne pas dépasser à la débarque pour garantir un thon qui n'a pas brunie au moment de l'arrivée sur le point de vente.

BIBLIOGRAPHIE

Ababouch L., Afilal M.E., Benabdeljijelil H., et Busta F.F. 1991. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardines stored at ambient temperature and in ice. *International journal of food science and technology* 26, p. 297-306.

Abbas A., Lichtman A. et Pober J. 1994. *Immunologie cellulaire et moléculaire*. Philadelphie, PA : W.B. Saunders Compagny.p. 287

Gouygou J.P., Sinquin C. et Durand P. 1987. High pressure liquid chromatography determination of histamine in fish. *Journal of Food Science* 52 , p. 925-927.

Kawabata T. et al. 1955. Studies of the food poisoning associated with putrefaction of marine products. *Ibid* 22, p. 41-47.

Klausen N.K. et Huss H.H. 1987. Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions. *International journal of food science and technology* 5, p. 147-156.

Mietz J. et Karmas E., 1977. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of food of science* 42, p. 155-158.

Sompayrac et Lauran. 1999. Comment le système immunitaire fonctionne. Malden, mA : La science de blackbell. p 37-38, 88.

Sonné A., La Vallée H, Ritter M., et Gardner P. 1995. *Pharmacologie*. New York: Churchill Livingstone. p. 226-229.

Réglementation:

Journal officiel de l'union européenne ; Règlement (CE) n° 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, 2005, p.11

Annexes

Annexe 1

Concentration en histamine des échantillons prélevés (dosage HPLC)

No Echant.	[Hista] ppmHPLC								
E1LOT1S	9,45	E31LOT3	4,16	E61S	0	E90S	2000	E122S	33,06
E2LOT1S	8,22	E32LOT3	3,2	E62S	0	E91S	2000	E123S	2,09
E3LOT1S	10,54	E33LOT3	1,77	E63S	0	E92S	2000	E124S	12,62
E4LOT1S	9,8	E34LOT3	0	E64S	0	E93S	2000	E125S	5,95
E5LOT1S	9,34	E35LOT3	4,65	E65S	0	E94S	2000	E126S	2,64
E6LOT1S	12,84	E36LOT4	0	E66S	0	E95S	2000	E127S	232,58
E7LOT1S	18,48	E37LOT4	3,12	E67S	0	E96S	2000	E128S	370,76
E8LOT1S	15,23	E38LOT4	2,35	E68S	0	E97S	2000	E129S	50,45
E9LOT1S	10,27	E39LOT4	0	E69S	0	E98S	2000	E130S	3,73
E10LOT1S	10,62	E40LOT4	0	E70S	0	E99S	2000	E131S	367,99
E11LOT1S	8,44	E41LOT4	2,43	E71S	0	E100S	2000	E132S	7,39
E12LOT1S	13,66	E42LOT4	2,45	E72S	0	E101S	2000		
E13LOT2S	2,14	E43LOT5	3,11	E73S	0	E102S	2000		
E14LOT2S	2,3	E44LOT5	2,8	E74S	0	E103S	2000		
E15LOT22S	4,36	E45LOT5	0	E75S	0	E104S	2000		
E16LOT2S	4,08	E46LOT5	5,11	E76S	0	E105S	3,07		
E17LOT2S	5,96	E47LOT5	1,58	E77S	0	E106S	4,86		
E18LOT2S	4,61	E48LOT5	0	E78S	0	E107S	30,71		
E19LOT2S	3,75	E49LOT5	2,11	E79S	2000	E108S	2,65		
E20LOT2S	3,35	E50LOT5	5,17	E801S	2000	E109S	286,6		
E21LOT2S	3,79	E51S	0	E80S	2000	E110S	167,01		
e22LOT2S	11,45	E52S	0	E811S	165,06	E111S	34,2		
E22LOTS	8,22	E53S	0	E81S	9,95	E112S	16,69		
E23LOT2S	6,01	E54S	0	E821S	291,27	E113S	4,81		
E24LOT2S	7,76	E55S	0	E82S	2000	E114S	10,05		
E25LOT2S	7,15	E56S	0	E831S	2000	E115S	0		
E26LOT3S	1,44	E57S	0	E84S	322,49	E116S	3,84		
E27LOT3S	2,04	E58S	0	E85S	2000	E117S	12,64		
E28LOT3S	0	E59S	0	E86S	211,12	E118S	0		
E29LOT3S	0	E60S	0	E87S	2000	E119S	8,79		
E30LOT3S	0			E88S	357,7	E120S	14,89		
				E89S	2000	E121S	2,03		

Annexe 2

Tableau des teneurs en histamine prédites à partir des équations de calibration 2 et 4.

No Echant.	Prédiction (Equa 2)	Prédiction Equat 4	Valeur HPLC
E73S	180,1629333	12,3405628	0
E73S	94,2498703	49,7315063	0
E73S	82,3980179	50,3823166	0
E74S	72,5787048	49,2269554	0
E74S	157,2542267	73,0539169	0
E74S	96,3460693	43,6031075	0
E75S	105,985939	54,7191772	0
E75S	119,7421799	33,4259605	0
E75S	67,1829834	18,3481121	0
E76S	96,16716	36,5956726	0
E76S	99,4251022	40,9771652	0
E76S	80,6813583	54,6750183	0
E77S	188,1847382	172,6204681	0
E77S	207,3412933	181,6590576	0
E77S	213,0651855	173,6952667	0
E79S	47,7129173	42,345192	2000
E79S	44,5783234	62,7075653	2000
E79S	42,1366425	48,7674294	2000
E7LOT1S	15,6006155	13,0207052	18,48
E7LOT1S	21,7807026	13,5637341	18,48
E7LOT1S	19,0197353	7,7214603	18,48
E91S	163,6130676	142,1192322	2000
E91S	225,0439758	312,5234985	2000
E91S	205,6414185	85,3434143	2000
E92S	83,5732346	141,7018585	2000
E92S	207,0678711	177,9245911	2000
E92S	98,2256012	104,4910965	2000
E93S	207,0636902	188,1465607	2000
E93S	192,875412	193,2121429	2000
E93S	189,3721619	165,1889343	2000

No Echant.	Prédiction (Equa 2)	Prédiction Equat 4	Valeur HPLC
E84S	163,926712	137,5159607	322,49
E85S	108,8245163	192,4668579	2000
E85S	198,9266052	190,3032532	2000
E85S	167,8505554	172,2714996	2000
E86S	212,1158447	216,096756	211,12
E86S	231,8451385	209,0132751	211,12
E86S	156,7987823	184,7459564	211,12
E87S	113,365181	137,860321	2000
E87S	118,159668	124,1993027	2000
E87S	200,3865662	161,5138092	2000
E88S	209,4333954	195,5945129	357,7
E88S	229,6278839	146,5154266	357,7
E88S	272,4257202	170,31987	357,7
E89S	152,473877	171,9813843	2000
E89S	166,9695282	196,4892883	2000
E89S	129,2478485	178,64328	2000
E8LOT1S	8,150836	12,832715	15,23
E8LOT1S	16,338398	14,6365681	15,23
E8LOT1S	13,631319	15,7896118	15,23
E90S	197,1586304	195,8099213	2000
E90S	152,6169891	146,735321	2000
E90S	227,4191895	146,1690979	2000
E94S	202,9347229	180,2716217	2000
E94S	256,7963257	181,5726776	2000
E94S	238,7453003	180,0222626	2000
E95S	224,0870209	182,2992401	2000
E95S	120,5891724	114,223114	2000
E95S	262,5988464	117,491684	2000
E96S	207,8456573	126,6959305	2000
E96S	153,0463409	137,4803619	2000
E96S	153,019516	103,019516	2000

No Echant.	Prédiction (Equa 2)	Prédiction Equat 4	Valeur HPLC
E23LOT2S	7,5369477	1,3484377	6,01
E23LOT2S	10,4216518	46,6767998	6,01
E23LOT2S	7,6758533	25,4512749	6,01
E24LOT2S	10,6961851	14,8553343	7,76
E97S	209,2457123	155,3328247	2000
E97S	177,3007202	167,3703918	2000
E97S	159,0188904	137,9199677	2000
E98S	166,6099091	189,5922089	2000
E98S	205,3901215	229,0655212	2000
E98S	148,4056396	137,9527893	2000
E39LOT4S	-38,8759575	10,299221	0
E39LOT4S	-35,9863281	17,5566254	0
E39LOT4S	-3,2667704	8,123415	0
E3LOT1S	9,5394402	17,5504303	10,54
E3LOT1S	9,6414719	13,8213987	10,54
E3LOT1S	9,2487535	14,6121616	10,54
E40LOT4S	34,4716301	8,6735277	0
E40LOT4S	8,7909756	13,2380075	0
E40LOT4S	-34,5317383	9,0820608	0
E41LOT4S	1,6098098	3,8720725	2,43
E41LOT4S	2,9747248	9,3732214	2,43
E41LOT4S	1,7703832	10,3005085	2,43
E42LOT4S	9,7253075	25,6057911	2,45
E42LOT4S	6,8404121	18,2238255	2,45
E42LOT4S	1,9485875	16,2004833	2,45
E44LOT5S	5,288764	4,503056	2,8
E44LOT5S	5,1425557	0,9811742	2,8
E45LOT5S	-3,1798491	6,2027888	0
E45LOT5S	-3,1492913	17,495945	0
E46LOT5S	4,0135345	7,2397022	5,11
E46LOT5S	1,9031421	17,1888485	5,11
E46LOT5S	2,7437327	9,7222128	5,11
E47LOT5S	2,3258619	6,0112338	1,58
E47LOT5S	-0,8798358	3,312717	1,58
E47LOT5S	-3,759989	14,5073662	1,58
E49LOT5S	3,5401776	9,5272799	2,11
E49LOT5S	3,7640824	6,0224667	2,11
E49LOT5S	6,7311707	13,0652685	2,11
E4LOT1S	6,3518343	7,3234806	9,8
E4LOT1S	14,5634212	12,8093338	9,8
E4LOT1S	16,5756588	24,4368	9,8
E50LOT5S	5,8511791	2,9822519	5,17
E51S	159,2081909	126,5427856	0
E51S	85,6844025	73,9886169	0
E51S	175,1669769	117,3288498	0
E52S	61,1616745	87,3359604	0
E52S	164,7624054	86,6694717	0
E52S	114,3959351	56,4911194	0
E53S	138,3222809	91,6678696	0
E53S	123,0176544	88,6875381	0
E53S	124,9270325	116,5112457	0
E66S	41,1492157	53,0276909	0
E67S	121,4582062	32,6374474	0
E67S	105,630455	36,744194	0
E67S	76,6413879	61,182827	0
E68S	171,4943848	177,9868622	0
E68S	183,4055023	165,4692383	0
E68S	115,0669632	157,3332825	0
E69S	190,6581726	202,2155457	0
E69S	100,5223694	179,585495	0
E69S	181,0901337	187,7894897	0
E6LOT1S	17,6119175	6,8005767	12,84
E6LOT1S	10,7618504	9,9865475	12,84
E70S	79,4149017	90,9424133	0
E70S	87,6852875	91,7223892	0
E70S	85,7844086	92,0322495	0
E71S	84,7196579	37,716114	0
E71S	86,8651505	42,7820969	0
E71S	102,893692	13,0577221	0
E72S	78,2365265	42,2304764	0
E72S	82,1045227	59,3716507	0
E72S	61,916584	47,4674568	0

No Echant.	Prédiction (Equa 2)	Prédiction Equat 4	Valeur HPLC
E36LOT4S	-13,6811619	6,6833982	0
E37LOT4S	0,9642738	10,3299065	3,12
E38LOT4S	1,0359216	17,6608562	2,35
E38LOT4S	5,5026007	17,2518711	2,35
E99S	158,0809479	156,0455627	2000
E99S	216,9548798	193,9538269	2000
E99S	206,3180542	133,8456268	2000
E9LOT1S	12,6398411	10,3679667	10,27
E9LOT1S	13,2759104	11,9117298	10,27
E9LOT1S	8,1454268	18,1901493	10,27
E54S	90,1497803	110,1078262	0
E54S	101,8221054	102,534874	0
E54S	93,0579529	110,7146912	0
E55S	106,1522675	121,5024185	0
E55S	110,9431076	121,7313995	0
E55S	108,0526352	125,9513626	0
E56S	145,6731873	156,7028961	0
E56S	129,0177307	174,7028656	0
E56S	153,1768646	163,1578217	0
E57S	77,7187576	81,5200653	0
E57S	147,6381836	132,7590942	0
E57S	70,2105331	90,5166931	0
E58S	133,6047211	65,1327057	0
E58S	74,4112778	58,3128548	0
E58S	153,7375031	42,3170662	0
E59S	112,0179214	58,9807205	0
E59S	219,9069061	50,5008659	0
E59S	134,2691345	49,2372437	0
E5LOT1S	8,412096	9,0835953	9,34
E5LOT1S	12,0919065	10,4561958	9,34
E5LOT1S	3,7776365	13,4729671	9,34
E60S	120,946991	55,2648392	0
E60S	88,6186752	42,1694031	0
E60S	138,3958282	31,2404442	0
E61S	101,2004929	113,6302948	0
E61S	45,9732018	91,2165375	0
E61S	145,2920685	117,7945786	0
E62S	86,5619888	98,7496948	0
E62S	80,6306152	102,3718338	0
E62S	83,6882782	101,236908	0
E63S	76,3799667	78,8834076	0
E63S	58,623024	75,0745697	0
E63S	61,8234215	63,6590652	0
E64S	129,1661835	190,5266571	0
E64S	176,1088104	173,9457922	0
E64S	154,4490356	173,360611	0
E65S	156,6141052	192,6437988	0
E65S	127,1897812	163,2771759	0
E65S	150,4696045	163,9253235	0
E66S	81,9581604	33,1886978	0
E66S	45,6187134	35,8620567	0
E801S	190,9455414	155,9043884	2000
E801S	169,6862335	168,8877411	2000
E801S	151,2347107	145,7372589	2000
E80S	-2,6933787	22,6892929	2000
E80S	-7,5163379	24,2382145	2000
E80S	-5,6487465	24,3890934	2000
E811S	160,9501038	143,9637451	165,06
E811S	162,5224915	167,6203308	165,06
E811S	160,8529358	147,8465118	165,06
E81S	167,7149353	125,4762497	9,95
E81S	163,5100708	158,3034668	9,95
E81S	104,8864517	128,8539886	9,95
E821S	129,8442535	193,6283264	291,27
E821S	151,7305756	166,5169067	291,27
E821S	179,5800018	146,2279205	291,27
E82S	13,6680145	9,443944	2000
E831S	109,9826508	163,223526	2000
E831S	178,3695068	167,3066406	2000
E831S	227,2470703	169,4164886	2000
E84S	123,177002	148,1044159	322,49
E84S	137,1007996	142,5261536	322,49

No Echant.	Prédiction (Equa 2)	Prédiction Equat 4	Valeur HPLC
E100S	188,6271362	175,1233215	2000
E100S	194,0877991	166,8241882	2000
E100S	169,0377197	188,8263397	2000
E101S	160,5471802	173,1608276	2000
E101S	245,0497742	190,4837646	2000
E101S	194,6306305	195,8471222	2000
E102S	192,6542206	166,3015137	2000
E102S	157,9997864	175,7513275	2000
E102S	195,5042419	196,6099548	2000
E103S	130,0140991	149,7536621	2000
E103S	126,4445496	182,5278625	2000
E103S	209,6978607	157,1949158	2000
E104S	250,7589722	215,5836639	2000
E104S	237,0583191	195,6310272	2000
E104S	122,3376923	214,4535065	2000
E105S	8,3977737	2,0046921	3,07
E105S	8,7603521	7,8021021	3,07
E105S	5,4366159	1,7686361	3,07
E106S	8,5946674	10,6840696	4,86
E106S	8,4764814	37,8275871	4,86
E106S	8,1932964	6,7110219	4,86
E107S	24,4298401	6,6604538	30,71
E107S	30,8373909	10,6436863	30,71
E107S	28,953371	22,1866035	30,71
E108S	-0,4180884	1,586731	2,65
E108S	11,6915627	18,4100266	2,65
E108S	10,1990137	17,0601387	2,65
E109S	186,6558533	222,1517487	286,6
E109S	222,2505341	288,1810608	286,6
E109S	227,9693909	235,7085419	286,6
E10LOT1S	13,0870695	17,3149223	10,62
E10LOT1S	13,7790861	11,697402	10,62
E10LOT1S	11,2585917	17,3672218	10,62
E110S	164,0678101	174,8342285	167,01
E110S	162,3300171	165,2986145	167,01
E110S	169,059494	155,8405304	167,01
E111S	28,7019825	4,752986	34,2
E111S	24,8643055	19,2628517	34,2
E111S	21,6075668	12,4194679	34,2
E125S	99,162674	28,1560059	5,95
E125S	8,1894197	8,8100452	5,95
E126S	8,6220741	27,1513004	2,64
E127S	230,4912872	226,3955383	232,58
E127S	236,9758759	232,6680756	232,58
E127S	183,5286407	207,4285431	232,58
E128S	222,8328094	207,201828	370,76
E128S	242,8867035	236,6261749	370,76
E128S	303,3743591	215,7292175	370,76
E129S	12,5066843	15,0824919	50,45
E129S	47,9899178	33,1603317	50,45
E129S	52,5317612	24,9067497	50,45
E12LOT1S	14,9152451	12,3285427	13,66
E12LOT1S	10,4580688	12,8373127	13,66
E12LOT1S	9,8093987	11,3535137	13,66
E130S	6,4729509	14,1023979	3,73
E130S	12,8556967	20,3511696	3,73
E130S	6,1396785	5,2001271	3,73
E131S	193,3569794	168,2986908	367,99
E131S	179,8591309	187,6734772	367,99
E131S	159,8983917	191,6224823	367,99
E132S	10,3313847	29,2325039	7,39
E132S	9,5757494	18,5223827	7,39
E132S	11,0778847	18,9241161	7,39
E14LOT2S	2,3097403	7,0878568	2,3
E14LOT2S	-6,0024867	1,3611737	2,3
E14LOT2S	-1,6999589	8,8843775	2,3
E15LOT2S	8,0186472	15,3514366	4,36
E15LOT2S	2,7418809	0,2664862	4,36
E15LOT2S	3,7778881	11,6686115	4,36
E16LOT2S	1,0963138	5,246943	4,08
E17LOT2S	5,7692552	8,3610268	5,96
E17LOT2S	5,1803169	2,0770407	5,96
E18LOT2S	9,6113091	3,025454	4,61
E19LOT2S	-3,9434459	7,250236	3,75
E1LOT1S	9,0688419	25,9327335	9,45
E1LOT1S	4,935463	13,6539602	9,45
E20LOT2S	12,1510735	8,7832785	3,35
E20LOT2S	7,4633965	8,0149021	3,35
E21LOT2S	9,1057272	11,6241541	3,79
E21LOT2S	7,7843318	10,0640984	3,79
E21LOT2S	4,4043088	6,1010294	3,79

No Echant.	Prédiction (Equa 2)	Prédiction Equat 4	Valeur HPLC
E112S	14,1601772	10,6014795	16,69
E112S	14,6949472	11,629302	16,69
E112S	22,3116856	8,9698963	16,69
E113S	5,2268443	7,1533704	4,81
E113S	5,9006395	12,4961281	4,81
E113S	6,6509147	19,3134003	4,81
E114S	13,723237	2,8349838	10,05
E114S	9,5061111	7,244544	10,05
E114S	8,8472013	22,1721516	10,05
E115S	77,5005722	3,5236428	0
E115S	50,5291824	28,0035172	0
E115S	-2,0979249	23,5845013	0
E116S	2,957957	7,9712882	3,84
E117S	12,3821821	7,7047229	12,64
E117S	9,9522123	11,6074533	12,64
E117S	7,9540801	19,5916576	12,64
E118S	13,0499668	33,6364594	0
E118S	-1,7178779	33,850647	0
E118S	-14,4738817	22,1529903	0
E119S	8,921257	20,8530655	8,79
E119S	9,2313671	23,8462715	8,79
E119S	9,9613161	14,4065275	8,79
E11LOT1S	13,5460691	11,736928	8,44
E11LOT1S	10,2452154	7,2652421	8,44
E11LOT1S	-0,3198257	9,9864302	8,44
E120S	19,7634506	11,1801662	14,89
E120S	2,8723581	7,4870267	14,89
E121S	4,2326951	11,4497938	2,03
E121S	8,9840956	21,3607121	2,03
E121S	53,2876854	19,2791996	2,03
E122S	29,3254471	24,8355541	33,06
E122S	28,8610973	24,921854	33,06
E122S	29,6655502	28,2469654	33,06
E123S	6,8440933	4,2490325	2,09
E123S	1,334501	16,232069	2,09
E123S	2,100827	9,8870878	2,09
E124S	12,3153419	7,7021751	12,62
E124S	14,6384268	6,6025662	12,62
E124S	19,6554565	14,976759	12,62
E25LOT2S	4,6839461	6,2664943	7,15
E26LOT3S	2,6599293	6,1511312	1,44
E27LOT3S	2,8866293	3,6396213	2,04
E27LOT3S	2,1311312	1,4238502	2,04
E27LOT3S	3,9613175	18,5613079	2,04
E27LOT3S	3,9776998	17,4110909	2,04
E27LOT3S	7,8994007	21,7331085	2,04
E28LOT3S	16,5601807	9,7592487	0
E28LOT3S	13,4466419	9,6701584	0
E28LOT3S	-5,3794241	6,1666694	0
E28LOT3S	5,3857455	0,7548115	0
E28LOT3S	12,6143417	3,5843325	0
E28LOT3S	1,0137724	0,0125615	0
E29LOTS	-26,5943508	4,7437816	0
E2LOT1S	7,6266642	7,6933055	8,22
E2LOT1S	4,0436258	7,3045154	8,22
E2LOT1S	10,0975618	12,0019388	8,22
E30LOT3S	11,0905752	4,6726046	0
E30LOT3S	-1,261611	1,0949862	0
E30LOT3S	-19,9595699	10,8407927	0
E30LOT3S	8,8327332	18,2386684	0
E31LOT3S	8,3618603	1,5103356	4,16
E31LOT3S	6,0406523	3,9934061	4,16
E31LOT3S	4,3162494	9,1996384	4,16
E31LOT3S	2,8930311	10,6819	4,16
E31LOT3S	3,3315659	5,8320255	4,16
E32LOT3S	7,807313	12,8223162	3,2
E32LOT3S	2,4998455	17,6360226	3,2
E32LOT3S	-8,3000727	4,163259	3,2
E32LOT3S	5,9198008	4,3722277	3,2
E32LOT3S	11,4917927	10,4784107	3,2
E33LOT3S	0,3889233	6,331255	1,77
E33LOT3S	-1,6316007	6,2635007	1,77
E33LOT3S	4,0599265	0,8752165	1,77
E33LOT3S	7,7289996	7,3262658	1,77
E34LOT3S	-0,6654061	8,7549849	0
E34LOT3S	-1,6411582	8,2242441	0
E34LOT3S	2,4417205	7,1308556	0
E35LOT3S	6,6087742	6,7738314	4,65
E35LOT3S	-2,9531813	14,3628054	4,65
E36LOT4S	-10,6230717	0,127896	0
E36LOT4S	-1,5951686	0,1625301	0

	Determination	Etapes expérimentales	Durée test	Echantillon/ Kit	Investissement départ	Sensibilité	Gamme de détection	Fournisseurs
ALERT for Histamine	Qualitatif : > ou < à 50ppm	Extraction, dilution, complexation, test immunoenzymatique et lecture (5 étapes)	20 minutes	<u>20</u>	+ (Micropipettes, balance,...)	2,5 ppm	?	Neogen corporation
Transia Histamine	Semi-quantitatif: Gamme= 0; 25; 50; 100 et 200 ppm	Extraction, dilution, complexation, test immunoenzymatique et lecture (5)	3 Heures	48 (- 5 à chaque gamme)	++ (spectro, micropipettes, balance,verrerie,...)	5 ppm	Entre 25 ppm et 200 ppm	Diffchamb
HISQUICK Histamine et RidaQuick Histamine	Quantitatif Sans lecteur la lecture semi- quantitative est possible; gamme de 0; 2,5; 5; 10; 20 et 40 ppm	Extraction, passage en colonne échangeuse d'ions (purification), coloration, lecture micro-plaques (4)	1 Heure	48	++ (Micropipettes, centrifugeuse,balance, ...) à +++ si achat d'un lecteur de micro- plaques	0,5 ppm	Entre 0,5 et 40 ppm	Rocky Mountain Diagnostic et labor diagnostiska nord (LDN) et R- Biopharm
RIDASCREEN Histamin	Quantitatif Gamme: 0; 0,5; 1,5; 5; 15 et 50 ppm	Extraction, acylation, test immunoenzymatique, coloration, lecture micro- plaque (5)	3 Heures	48	+++ (Lecteur de micro- plaques, micropipettes, balance,...)	0,5 ppm	Entre 0,5 et 50 ppm	R-Biopharm, Rocky Mountain Diagnostic, labor diagnostiska nord (LDN) et Immunotech
VERATOX for Histamine et Histamarine	Quantitatif Gamme: 0; 1; 10, 50; 100 et 500 ppm	Extraction, dilution, complexation, test immunoenzymatique et lecture (5)	2 Heures	<u>38</u>	+++ (Lecteur de micro- plaques, micropipettes, balance,...)	0,5 ppm	Entre 0,5 et 500 ppm	Neogen corporation et Immunotech