

**Licence Science et Technique(LST)**

**GENIE CHIMIQUE**

**PROJET DE FIN D'ETUDE**

Détermination du taux d'histamine en poissons par la méthode  
spectrofluorométrique de LERK et BELL

**Présenté par:**

◆ Ed-dahmouni Nada

**Encadré par:**

◆ Mr.Elhamri Hecham

◆ Pr.El Asri Mohammed

**Soutenu Le 4 Juillet 2022 devant le jury composé de:**

**-Pr. El Asri Mohammed**

**-Pr. BOULAHNA Ahmed**

**-Pr. OUAZZANI CHAHDI Fouad**

**Stage effectué à Institut National d'Hygiène à Rabat**

**Année Universitaire 2021 / 2022**

## Dédicace

*Je dédie ce travail à :*

❖ **Mes très chers parents,**

*Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte.*

*En témoignage, je vous offre ce modeste travail qui représente le fruit de votre soutien moral et matériel, vos sacrifices, et vos encouragements.*

*Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation et mon bien être.*

*Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !*

❖ **Mes chères sœurs,**

*Que vous acceptiez ici l'hommage de ma gratitude, qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera jamais à la hauteur de votre tendresse et votre dévouement.*

*Puisse Dieu, le tout puissant nous unir pour toute la vie.*

❖ **Toute ma famille,**

*Aucun de mes mots ne saurait exprimer mes gratitudes et mes respects.*

❖ **Mes professeurs,**

*Mes professeurs que je remercie bien infiniment pour tous les efforts qu'ils ont fournis pour me former.*

*Que dieu vous préserve tous et vous procure sagesse et bonheur.*

## Remerciement

*Louange à notre Dieu.*

*De cette occasion Je tiens à remercier et exprimer ma gratitude respectueuse à :*

*Mr. Mohamed RHAJAOUI , directeur de l'Institut National d'Hygiène de Rabat, de m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein de cet établissement , Dr.Hecham ELhamri chef de département de Toxicologie pour m'avoir encadré tout au long du projet, pour sa disponibilité, pour ses conseils précieux, pour la confiance qu'il m'a témoigné, pour son aide et de son savoir-faire qui m'a donné la possibilité de mieux réaliser ce Mémoire, Pr.Mustapha IJJAALI, Doyen de la Faculté des Sciences et Technique (FST Fès).*

*Un remerciement particulier à Mr. El ASRI Mohammed professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès pour son encadrement et son aide durant ce travail.*

*Remerciements également à l'ensemble du personnel de l'Institut National d'Hygiène de Rabat plus particulièrement Madame Naima MAHNINE , ainsi que tous les enseignants de la licence Génie chimique pour leurs considérables efforts qui ont permis de mettre en place cette formation.*

*Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements aux membres de jury de m'avoir honoré en acceptant de juger ce travail.*

## Liste des abréviations

AFSSA : Agence Française de sécurité sanitaire des aliments

AOAC : Association of Official Analytical Chemists

CCM ou TLC : Chromatographie sur couche mince ou Thin Layer Chromatography

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

HPTLC : Chromatographie sur couche mince haute performance

INHR : Institut National d'Hygiène à Rabat

LC.MS/MS : Chromatographie en phase Liquide-Spectrométrie de masse en tandem

OPA : Ortho-phtaladeyde

TCA : Solution Trichloro-acétique

## Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>I. PRESENTATION GENERALE DE L'INSTITUT NATIONAL D'HYGIENE .....</b>	<b>2</b>
1. Historique .....	2
2. Mission .....	2
<b>II. DIFFERENTS DEPARTEMENTS DE L'INH.....</b>	<b>3</b>
<b>PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>5</b>
<b>I. LES PRODUITS DE PECHEES .....</b>	<b>6</b>
1. Composition de la chair des poissons :.....	6
2. Les contaminants .....	6
2.1. Contamination endogène.....	7
2.2. Contamination exogène.....	7
3. Qualité .....	7
<b>II. HISTAMINE .....</b>	<b>7</b>
1. Mécanisme de formation de l'histamine .....	8
1.1. Origine endogène .....	8
1.2. Origine exogène .....	8
2. Propriétés physico-chimiques de l'histamine .....	10
3. Seuil de toxicité.....	10
4. Effet de l'histamine (Aspect toxicologique) .....	11
5. Produits alimentaires susceptibles de contenir à taux élevé d'histamine .....	11
6. Aspect réglementaire et normatifs.....	12
6.1. Au niveau européen .....	12
6.2. Au niveau international .....	14
<b>III. METHODES DE DOSAGE DE L'HISTAMINE .....</b>	<b>14</b>
1. Méthodes chimiques séparative .....	14
1.1. Chromatographie sur couche mince(CCM ou TLC) .....	15

1.2.	Chromatographie liquide haute performance .....	15
1.3.	La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	17
1.4.	Chromatographie sur couche mince haute performance(HPTLC) .....	19
1.5.	Association officielle des chimistes analystes (AOAC).....	19
1.6.	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) .....	19
<b>PARTIE II : MATERIELS ET METHODES .....</b>		<b>21</b>
<b>I. METHODE SPECTROFLUORIMETRIQUE DE LERKE ET BELL POUR LA DETERMINATION DE L'HISTAMINE EN POISSONS.....</b>		<b>22</b>
1.	Objet et domaine d'application .....	22
2.	Principe de la méthode .....	22
3.	Réactifs et leurs préparations :.....	22
4.	Matériel de laboratoire .....	24
5.	Mode opératoire.....	24
<b>PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>27</b>
1.	Expression des résultats .....	28
2.	Taux d'histamine dans les conserves de sardine .....	28
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>		<b>30</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>31</b>

## Liste des figures

Figure 1: Organigramme de différents départements de l'INH.....	3
Figure 2 : Organigramme présentant le département de toxicologie [1].....	4
Figure 3: Mécanisme de formation de l'histamine. [5].....	9
Figure 4: Plaque de chromatographie sur couche mince- Conservation des échantillons à 30 °C : la tâche d'histidine disparaît alors que celle d'histamine se développe (d'après Nerisson, 1975).[9].....	15
Figure 5: Principe du fonctionnement de HPLC.....	16
Figure 6: chromatographie liquide à haute performance.....	17
Figure 7: L'appareil utilisé pour réaliser une analyse par chromatographie en phase gazeuse	18
Figure 8: Chromatographie en phase gazeuse.....	18
Figure 9: Principe de fonctionnement de LC.MS/MS.....	20
Figure 10: Réactif préparé pour le dosage de l'histamine.....	22
Figure 11: Appareil despectrofluorimètre.....	24
Figure 12 : Courbe d'étalonnage	
Figure 13 : Colonne chromatographie contenant la résine Aberlite GC-50.....	24

## Liste des Tableaux

Tableau 1:Composition chimique moyenne de la chair de poisson .....	6
Tableau 2:Bactéries contribuant à la formation d’histamine.[5].....	9
Tableau 3:propriétés physico-chimiques de l’histamine.[6] .....	10
Tableau 4:Règlement Européen 11441 2007 décrivant les limites histaminiques dans différents produits halieutiques. [7] .....	13
Tableau 5: Instruction de préparation des réactifs chimiques pour le dosage de l’histamine ..	23
Tableau 6:Préparation des solutions étalon .....	26
Tableau 7:Teneur en histamine dans des échantillons des conserves de sardines provenant des grandes surfaces .....	28

## INTRODUCTION GENERALE

Les amines biogènes sont des substances toxiques qui causent des maladies chez l'homme et les animaux. L'histamine en particulière, peut causer des symptômes sévères au-delà de sa limite de tolérance, elle à l'origine de certaines allergies (allergies à effets immédiats) qui provoquent des troubles respiratoires, des démangeaisons, une hypersécrétion gastrique de l'acide chlorhydrique, des troubles de la vigilance, des crampes, des vomissements et de diarrhée. Il n'est pas possible de comprendre la formation d'histamine chez les poissons en regardant l'aspect extérieur, l'odeur ou la couleur du poisson. A très faible teneur, cette substance joue un rôle régulateur important dans le système immunitaire de l'organisme.

L'analyse d'histamine joue un rôle important pour protéger les consommateurs. une nouvelle méthode efficace qui permettra de donner une réponse à toutes les insuffisances observées dans les méthodes actuelles (instabilité, interférences, longue durée et coût très élevé) de dosage de l'histamine dans les produits alimentaires (produits halieutiques et dérivés, fromages, etc.).D'où la nécessité de valider la méthode de dosage de ce composé chimique.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux de notre projet présentés dans cette étude. Pour ce faire, nous avons, en un premier temps, donné une simple présentation de lieu de notre stage (INHR).

La deuxième partie de ce travail concerne une synthèse bibliographique qui traite les généralités des produits de la pêche et d'histamine et sa réglementation. En suite une généralité sur la méthode de dosage de l'histamine et le matériel utilisé .

La troisième partie est dédiée à l'expérimentation dont laquelle on va présenter le mode opératoire et le matériel nécessaire pour la détermination de taux d'histamine en poisson par la méthode spectrofluorimétrie de LERK et BELL.

## I. Présentation générale de l'institut national d'hygiène

### 1. Historique

L'Institut d'Hygiène du Maroc a été inauguré le 30 décembre 1930 à Rabat par le Professeur Léon BERNARD, Président du Conseil Supérieur d'Hygiène de France, sous la présidence de Mr Lucien SAINT, Résident Général de la République Française au Maroc dans le but de prendre en charge les problèmes d'hygiène et d'épidémiologie des maladies transmissibles du Maroc et de diffuser les notions élémentaires de l'hygiène et de la prophylaxie pour protéger la santé de la population.

### 2. Mission

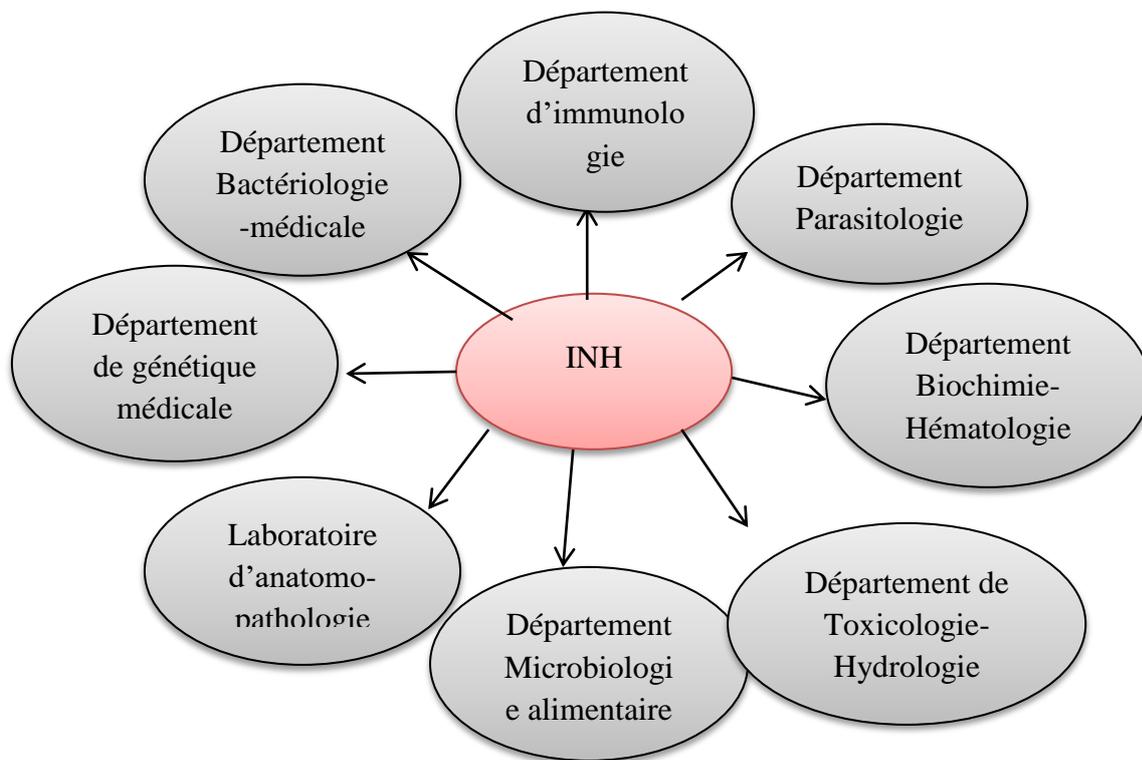
L'Institut National d'Hygiène sous tutelle du Ministère de la santé et la Direction de l'Epidémiologie et de la lutte contre les maladies, remplit plusieurs fonctions qui sont :

- Apporter un appui technique dans le domaine de la biologie pour l'évaluation des activités et de l'impact des programmes sanitaires ;
- Assurer la standardisation des méthodes de travail des protocoles et des produits ;
- Assurer le contrôle de la qualité des laboratoires cliniques hospitaliers et ambulatoires, des laboratoires d'épidémiologie et d'hygiène du milieu et des laboratoires spécialisés ;
- Participer à la formation et le recyclage dans le domaine de la biologie, des agents de la santé publique de toutes les catégories ;
- Apporter l'expertise scientifique et technique dans le domaine de la biologie humaine ;
- Assurer le contrôle de la qualité des laboratoires cliniques hospitaliers et ambulatoires, des laboratoires d'épidémiologie et d'hygiène du milieu et des laboratoires spécialisés.
- Participer à la formation et le recyclage dans le domaine de la biologie, des agents de la santé publique de toutes les catégories ;
- Apporter l'expertise scientifique et technique dans le domaine de la biologie humaine ;

- Développer la recherche opérationnelle et appliquée en biologie.
- Participer au système national de surveillance épidémiologique ;
- Assurer l'expertise médico-légale biologique à la demande des tribunaux du Royaume ;
- Etudier et suivre les problèmes relatifs au thermalisme en collaboration avec la division de l'hygiène du milieu ;
- Représenter le Ministère de la santé publique dans toutes les commissions interministérielles en matière de biologie.[1]

## II. Différents départements de l'INH

Les différents départements de l'Institut National d'Hygiène sont présentés dans cet organigramme :

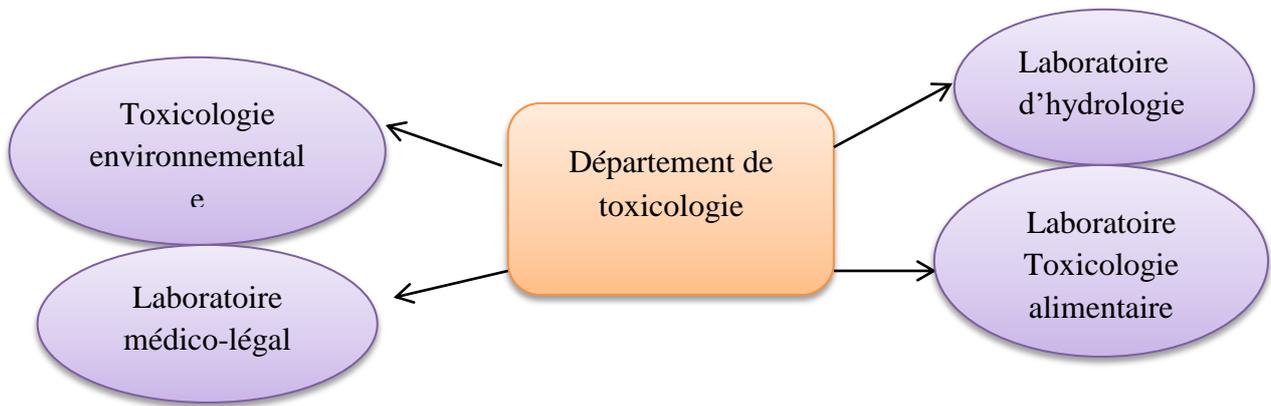


**Figure 1: Organigramme de différents départements de l'INH**

J'ai effectué mon stage au sein du département de toxicologie et plus précisément dans l'unité toxicologie-alimentaire.

Depuis sa création en 1946 le département de toxicologie, hygiène industrielle et médico-légal de l'INH demeure le seul support technique dans les domaines de la toxicologie (contrôle des eaux désignées à la consommation) et l'hygiène environnementale.

Le département de Toxicologie et Hydrologie de l'institut National d'Hygiène (INH) est composé de 4 laboratoires :



**Figure 2 : Organigramme présentant le département de toxicologie [1]**

**PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. LES PRODUITS DE PECHEES

Les poisson se composent de nombreux tissus, dont les muscles du tronc (la partie qui composent la nourriture humaine normale), la peau, le squelette, nageoires, sang, tête, et les entailles. Ce sont des aliments périssables et comme d'autres aliments, se gâtent immédiatement après avoir été pêchés, deviennent rapidement impropres à la consommation et même dangereux pour la santé, en raison de la croissance microbienne, des modifications chimiques et de la dégradation endogène.

### 1. Composition de la chair des poissons :

La composition chimique de la chair diffère pour la teneur en protéines ou en minéraux et la teneur en sucres (principalement glycogène) est faible et très variable au sein d'une espèce.

Les constituants chimiques de la chair des poissons sont :

- ✓ L'eau de 66 à 84%
- ✓ Les protéines de 15 à 24%
- ✓ Les glucides de 0,1 à 22%
- ✓ Les vitamines 0,3%, avec une teneur très faible en lipide.

**Tableau 1:** Composition chimique moyenne de la chair de poisson

Type de poisson	Eau	Protéines	Lipides	Glucides
Poisson gras	68,6	20	40	0,03
Poisson plat	77,2	19	2,5	0,03
Poisson maigre	81,2	16,4	0,5	0,03

Ces teneurs varient selon l'espèce considérée, la taille, le statut physiologique (maturité des gonades, cycle sexuel, les conditions d'élevage et l'âge) [2].

### 2. Les contaminants

Habituellement, la chair de poisson est stérile. La zone contaminée est le mucus recouvrant la peau, les branchies et le tube digestif (BAROSS et LISTON, 1970 ; SHENAN 1977).[3]

La contamination bactérienne de la chair ne se produit qu'après la capture. Les sources de cette contamination sont diverses et peuvent divisées en deux groupes :

- ✓ La contamination endogène
- ✓ La contamination exogène

### **2.1. Contamination endogène**

Cette contamination a lieu du vivant de l'animal. Elle se fait via la respiration, l'alimentation et lors des déplacements. La composition et la quantité de cette flore bactérienne dépend de l'origine, de la température de l'eau, de l'alimentation ...[3]

### **2.2. Contamination exogène**

Après capture, le poisson est sujet à de nombreuses manipulations qui sont à l'origine de la contamination bactérienne. Les germes apportés par cette contamination secondaire sont des salmonelles, des coliformes thermotolérants, des *Staphylococcus* présumés pathogènes, des bactéries anaérobies sulfite-réductrices, des levures et moisissures, la flore mésophile aérobie total.....[3]

## **3. Qualité**

La qualité d'un produit de la pêche est en définitive un concept de consommateur qui englobe une vaste gamme de conditions. Les consommateurs peuvent prendre en compte la satisfaction, la valeur nutritive, la saveur, l'apparence, la sécurité, la présentation, la confiance et le prix. Le pêcheur et les propriétaires intermédiaires qui capturent, transforment, emballent, transportent et stockent le produit en route vers le consommateur auront chacun un concept plus limité basé sur la qualité requise et le prix attendu du prochain acheteur. Chacun sera enclin à ne traiter qu'une partie des attentes du consommateur. La plupart des concepts de qualité incluent des jugements difficiles à quantifier, mais quelques-uns sont largement acceptés et mis en œuvre par les gouvernements ou concernés par l'industrie dans son intérêt général. Ceux-ci incluent des facteurs de santé, de sécurité, d'étiquetage honnête, de poids correct, de manque de contaminants et de substances offensantes.

## **II. HISTAMINE**

Cette molécule a été découverte par AKERMAN en 1910, est d'une part produite par l'organisme et d'autre part fournie par l'alimentation. C'est un neuromédiateur largement impliqué dans les phénomènes inflammatoires et allergiques. Elle est synthétisée à partir de

l'histidine, il est principalement stocké dans la cellule immunitaire qui le libère et stimulée par la molécule étrangère comme un allergène.

Dans le domaine alimentaire, elle se forme au cours de la fermentation microbienne de l'alimentation comme conséquence de sa détérioration. [4]

## 1. Mécanisme de formation de l'histamine

### 1.1. Origine endogène

La muqueuse gastro-intestinale est l'endroit du corps le plus riche en histamine : 17g/g au 10g/g au niveau gastrique, niveau Dodunom jéjunal . Ces fortes teneurs s'expliquent par la synthèse et le stockage de l'histamine dans les mastocytes, cellules très abondantes dans la muqueuse digestive. L'histamine peut également être formée par le phénomène d'autolyse tissulaire : sous l'action d'enzymes histidine décarboxylases tissulaires, il y a formation d'histamine post-mortem

### 1.2. Origine exogène

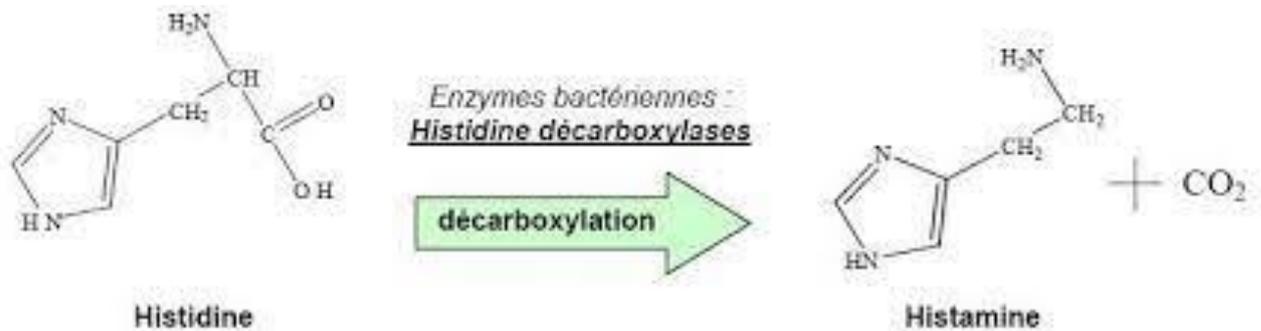
L'histamine est une amine biogène dérivé d'un acide aminé appelé histidine les enzymes responsable de cette réaction est appelé l'histidine-décarboxylase(HDC) ; qui sont libérés par les bactéries .l'histamine produit au cours des processus de décomposition, se trouve dans les tissus des poisson après sa mort est rarement trouvé dans les poissons frais. [5]

La formation d'histamine dans les tissus des poissons repose sur 3 facteurs essentiels :

- La teneur en histidine libre, directement liée à l'espèce animale ;
- La présence des bactéries capable de la synthèse de l'histidine-décarboxylase ;
- L'absence de congélation ou retard à la congélation au bord des bateaux de pêche.

La production endogène de ces amines (autolyse par les enzymes tissulaires) est beaucoup moins importante que celle par la voie exogène bactérienne (**WENDAKOON** et **SAKAGUCHI** 1992). Les opérations liées à la préparation et à la transformation du poisson sont très importantes car elles peuvent éviter la contamination du poisson par la croissance bactérienne qui produisant l'histidine décarboxylase. Les conditions de stockage (de conservation) ont également un impact important à propos de la formation d'histamine lorsqu'elles multiplient ces bactéries .Faire cela l'histamine ne peut s'accumuler ni dans le poisson congelé ni dans les aliments en conserve stérilisés par la chaleur. La stabilité thermique de l'histamine ne permet pas de diminuer les risques à la cuisson (**Ijomah et al. 1992**). Elle n'est pas détruite ni par la congélation, ni par le salage et ni par la stérilisation et peut être présente dans les conserves (**Dalgaard 2007**), d'où la nécessité de la maîtrise de la chaîne du froid et l'application stricte des règles d'hygiène.

La Figure ci-dessous montre le mécanisme par lequel l'histamine est formée



**Figure 3:** Mécanisme de formation de l'histamine. [5]

Les microorganismes responsables de la formation de l'histamine se développent principalement à des températures supérieures à 7-10°C dans les ouïes et les viscères des poissons. Parmi elles, il y a *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Hafnia alvei*...

**Tableau 2:** Bactéries contribuant à la formation d'histamine. [5]

Type respiratoire	Famille	Principe espèce
Aérob-anaérobies facultatifs	Enterobactériaceae	- <i>Morganella morganii</i> - <i>Morganella psychrotolerans</i> - <i>Raoultella planticola</i> - <i>Enterobacter aérogène</i>
Aérob-anaérobies Gram négatif	Vibrionaceae	- <i>Photobacterium phosphoreum</i> - <i>Photobacterium damsela</i>
	Bactéries lactiques	- <i>Tetragenococcus myriaticus</i> - <i>Lactobacillus spp</i>

Il faut souligner que l'importance des bactéries ou des enzymes bactériennes dépend des facteurs suivants :

- Le degré de contamination précédant de l'entreposage.

- Des conditions de conservations.
- L'impact technologique.

## 2. Propriétés physico-chimiques de l'histamine

**Tableau 3:**propriétés physico-chimiques de l'histamine.[6]

L'histamine	Nomenclature chimique	Caractéristique chimique	Caractéristique physique
<b>Cristaux incolore</b>	4-(2-aminoéthyl)-1,3-diazole ou 2-(4-imidazolyl) éthylamine	-Formule moléculaire C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> -Masse moléculaire 111,15 - pKa =9,8(25°C)	-T° de fusion =86°C -T° ébullition=209,5°C -Solubilité : soluble dans l'eau et l'éthanol, établissant d'une liaison hydrogène mais peu soluble dans les solvants organiques apolaires(comme par exemple l'éther)

## 3. Seuil de toxicité

Il est difficile de définir un seuil de toxicité exact, parce que cela dépend de nombreux facteurs, surtout la grande différence de sensibilité entre les individus :

- La teneur en histamine n'est pas uniforme dans toutes les parties du poisson.
- La toxicité de l'histamine peut être augmentée par la présence d'autres amines : gènes biologiques pouvant agir en synergie.
- Consommation d'alcool ou de médicaments (comme les antidépresseurs) il peut également augmenter la toxicité de l'histamine en inhibant l'enzyme détoxification de cette molécule.

Dans le cas de l'agence français de sécurité sanitaire des aliments(AFSSA) ,des teneurs en histamine inférieures à 50mg/Kg sans effet toxique ,celles de 50à100mg/Kg provoque une légère intoxication, mais la concentration est de 100-1000mg/Kg , le produit est considéré comme toxique.

#### 4. Effet de l'histamine (Aspect toxicologique)

L'histamine est la source d'une intoxication dite histaminique .Ceci arrive lorsque le consommateur mange le poisson contenu une forte teneur en histamine par contre une faible dose d'histamine joué un rôle bénéfique dans le système nerveux en qualité de neurotransmetteur .Lorsqu'elle consommé ,il sera responsable de symptômes d'intoxication semblables à ceux d'un allergie.

-Les symptômes les plus souvent rencontré sont :

- 1er symptômes : une réaction allergique au visage et au cou, sensation brûlure dans la gorge, un goût de poivre dans la bouche, l'éruption cutanée, nez qui coule, des démangeaisons et des picotements de la peau ;
- Symptômes cutanés : maux de la tête, vertige (étourdissements), palpitation cardiaque ;
- Symptômes secondaires de type gastro-intestinal : nausées, constipation, diarrhée, reflux gastrique, maux du l'estomac, vomissements.

Les temps d'incubation sont généralement courts, allant de quelques minutes à quelques heures .Les symptômes disparaissent généralement spontanément en 3 heures.

Exceptionnellement, dans les cas les plus graves, elles peuvent durer plusieurs jours, Les antihistaminiques peuvent arrêter ces symptômes en bloquant les effets de l'histamine.

L'intolérance à l'histamine reflète clairement la prédisposition d'un individu parce qu'il limite, il est inclus dans le domaine de la maladie appelée fausses allergies alimentaires, allergies alimentaires cliniquement sans implication de mécanismes immunologiques. Faire cela manger des aliments qui contiennent de fortes doses d'histamine peut entraîner n'importe quoi provoque une réaction semblable à une réaction anaphylactique proportionnellement grave apport pouvant entraîner un choc histaminique.[5]

#### 5. Produits alimentaires susceptibles de contenir à taux élevé d'histamine

L'histamine présente chez tous les poissons mais à des niveaux généralement bas. Certaines espèces peuvent présenter un taux élevé d'histamine appartenant aux familles suivantes :

- Scombridés : thon, bonite, maquereau, thonine, thazard .....
- Scombérésocidés :saurel, scombérésocé.....
- Pomatomidés : tassergal....
- Clupéidés : sardinelles,hareng....[6]

## 6. Aspect réglementaire et normatifs

### 6.1. Au niveau européen

La concentration d'histamine ne doit pas dépasser quelque limites qui sont définis par le règlement CE n°2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la méthode d'analyse de référence pour les espèces contenant une grande quantité d'histamine comme : les scombridaees, clupeidés, engraulidés, cryphaeidés.

-La quantité du produit est satisfaisante si :

- La teneur moyenne en histamine ne dépasse pas 100mg/Kg(100ppm ou 10mg/100g) ;
- Les deux échantillons peuvent dépasser 100mg/Kg d'histamine sans atteindre 200mg/Kg ;
- Aucun échantillon ne dépasse 200mg d'histamine /Kg.[4]

**Tableau 4:**Règlement Européen 11441 2007 décrivant les limites histaminiques dans différents produits halieutiques. [7]

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes/ toxines, métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites		Méthodes de référence
		n	C	m	M	
<b>Produits de la pêche fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine.</b>	Histamine	9	2	100 mg/Kg	200 mg/Kg	HPLC
<b>Produits de la pêche ayant subi un traitement de maturation aux enzymes dans la saumure, fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine.</b>	Histamine	9	2	200 mg/Kg	400 mg/Kg	HPLC
<b>Sauce de poisson produite par fermentation de produits de la pêche</b>	Histamine	1	0	400		

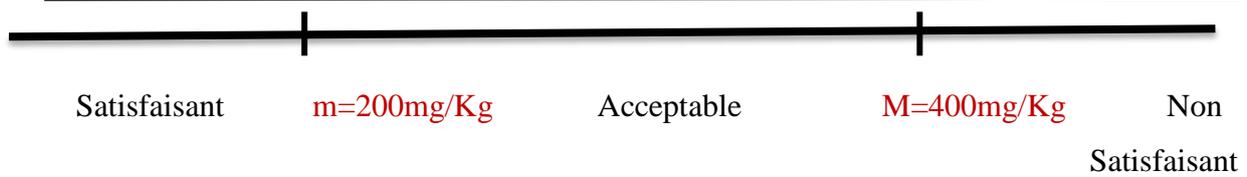
c :nombre maximum de résultats pouvant présenter des valeurs comprises entre m et M pour le nombre d'unités n réalisé ;

m :limite inférieure

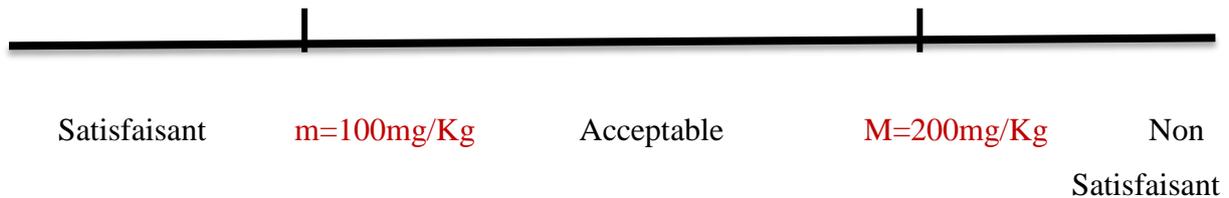
M :limite supérieure

Donc selon le règlement en tenant compte ppm=mg /Kg

- Les semi-conserves d'anchois :



- Les conserves de sardine :



## 6.2. Au niveau international

La norme du codex alimentaire (FAO,2001) qui a fixé les limite de concentration à ne pas dépasser ces 2 seuils :

- Le premier est le seuil de qualité, qui est un indicateur de dégradation de la qualité produit 100mg/Kg ;
- Le seconde est une norme de santé publique, qui ne devrait pas plus de 200mg/Kg.

## III. METHODES DE DOSAGE DE L'HISTAMINE

Il existe différentes méthodes d'analyse de l'histamine chez les poissons. La méthode la plus couramment utilisée est la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et LC-MS/MS. Bien que chaque méthode présente des avantages et des inconvénients, et qu'elles varient en termes de coût, de compétence de l'opérateur, de temps nécessaire pour obtenir un résultat, de portabilité, la plupart des méthodes offrent un bon accord et permettent de mesurer de manière fiable l'histamine dans les fruits de mer à des niveaux d'intérêt.

### 1. Méthodes chimiques séparative

En effet, nous remarquons que la totalité des protocoles de dosage chimique de l'histamine comprennent les étapes suivantes : Echantillonnage- Extraction –Purification- Séparation- Dosage quantitatif

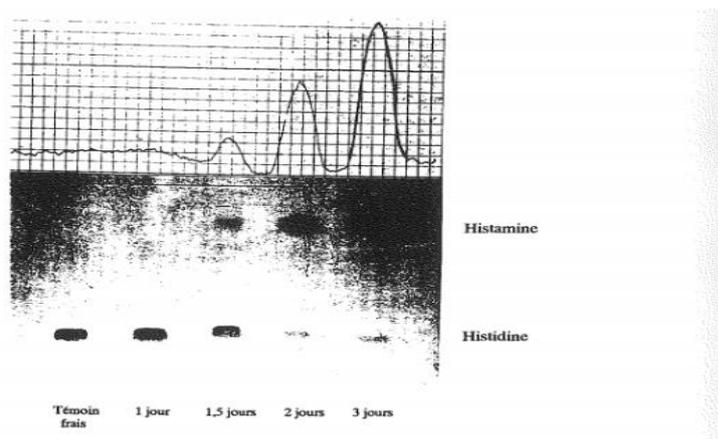
En laboratoire, de nombreuses méthodes sont utilisées pour mesurer les niveaux d'histamine chez les poissons.

Selon le règlement européen n°2073/2005 , on peut utiliser une des méthodes suivantes :

### 1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC)

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

Globalement, le principe consiste à extraire l'histamine puis à déposer l'extrait obtenu sur un support solide appelé phase stationnaire (est un adsorbant) qui est fixé sur une plaque (habituellement du gel de silice, de l'oxyde de l'aluminium ou de la cellulose). Au contact avec la phase mobile liquide ou l'éluant (solvant ou mélange de solvant de migration), l'histamine est soumise à une force d'entraînement. En fonction du degré d'adsorption des substances en présence, la phase stationnaire, nous obtenons une séparation des molécules. La détermination de l'histamine est possible par comparaison des rapports frontaux ou rétention frontale ( $R_f$ ) des échantillons, à celles des standards. [8]



**Figure 4:** Plaque de chromatographie sur couche mince - Conservation des échantillons à 30 °C : la tâche d'histidine disparaît alors que celle d'histamine se développe (d'après Nerisson, 1975). [8]

Cette méthode vous permet de tester plusieurs échantillons en même temps, est peu coûteuse, ne nécessite pas de matériel très spécifique, élimine les échantillons négatifs et conserve les autres pour une analyse plus précise. Mais le seuil de détection de la présence de l'histamine par cette méthode est relativement haut 50 mg/Kg et certains des réactifs employés sont toxiques.

### 1.2. Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance est également nommée CLHP ou HPLC, la plus ancienne est celle de Mietz and Karmas (1977); cette technique lors d'une analyse

d’histamine présente des atouts considérables en terme de spécificité de dosage et de reproductibilité. Elle utilisée pour le dosage de l’histamine et des amines biogènes .Ainsi, elle est actuellement considérée comme méthode de référence, utilisé pour le dosage fin et quantitatif de l’histamine.

Cette méthode repose sur l’utilisation d’une phase mobile et d’une phase stationnaire , dans ce cas ,la phase stationnaire est un adsorbant et la phase mobile est un solvant( éluant).la HPLC repose sur la circulation d’un fluide (phase mobile) dans une colonne (phase stationnaire).

Les amines biogènes sont extraites de l’échantillon à tester puis on pratique une dérivatisation de ces amines (avant ou après passage dans la colonne).La solution à tester est ensuite injectée dans la colonne où les constituants vont donc mette plus ou moins de temps à la parcourir.

Le fluide est récupéré à la sortie de la colonne. On peut alors déterminer la quantité et le type de constituants dans le fluide ( car ils arrivent les uns après les autres dans le récipient) à l’aide de méthodes de mesure précises, en général par fluorimétrie.

Les résultats sont exprimés en mg d’histamine /Kg.

Son inconvénient est qu’elle nécessite un équipement sophistiqué (donc cher) et du personnel spécifiquement formé à ce matériel.[8]

❖ Appareillage en HPLC

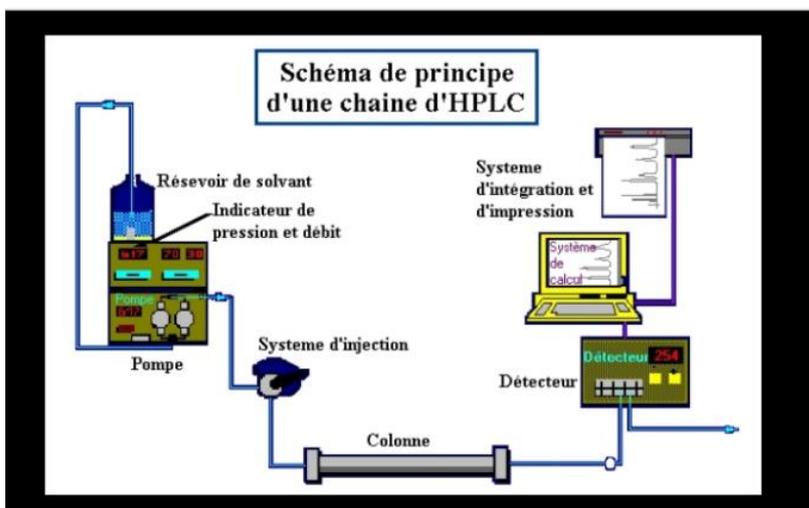


Figure 5:Principe du fonctionnement de HPLC

Il est constitué d’un :

- Réservoirs de la phase mobile

- dégazeur
- Pompe
- Les systèmes d'injection
- Colonnes en HPLC
- Les détecteurs pour mesurer l'absorbance
- Enregistrement des chromatogrammes



**Figure 6:** chromatographie liquide à haute performance

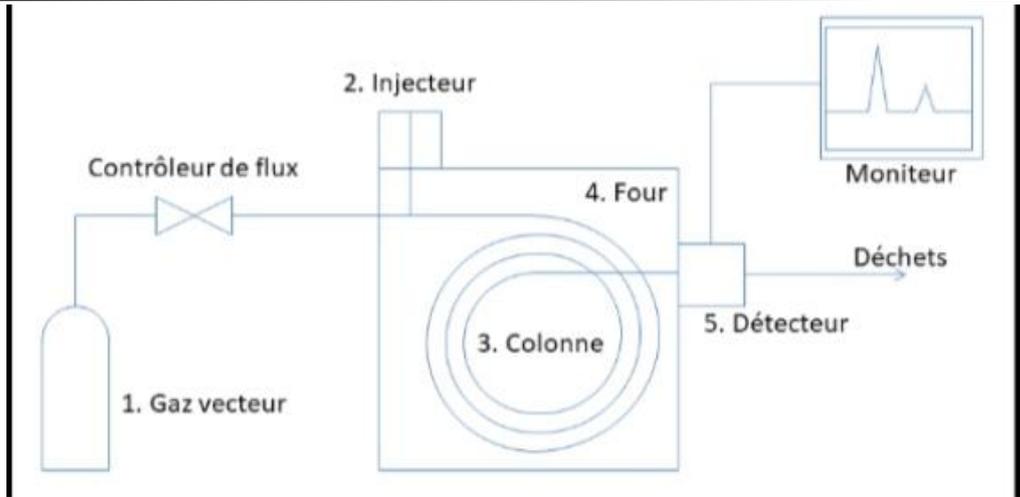
### 1.3. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Comme toutes les chromatographies, cette vise à séparer les composants du mélange et repose sur l'utilisation de phases mobiles et stationnaire. Dans ce cas la phase stationnaire est la colonne et la phase mobile est le gaz porteur.

Les amines biogènes sont extraites d'un produit tester (avec du méthanol alcalin), puis le mélange est décomposé par chauffage à l'entrée de la colonne. A la sortie de cette colonne ,la détection se fait à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme.

Cette méthode est très précise, reproductible, sensible et rapide(10 minutes par échantillon).Son inconvénient est qu'elle nécessite un équipement sophistiqué (donc cher) et du personnel spécifiquement formé à ce matériel.[8]

- ❖ appareillage en chromatographie en phases gazeuse :



**Figure 7:** L'appareil utilisé pour réaliser une analyse par chromatographie en phase gazeuse

Il est constitué d'un :

- Gaz vecteur (l'azote, hélium, Argon) ;
- Injecteur ;
- Colonne contenu dans une enceinte thermo statée ;
- Four ;
- Détecteur reliée à un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme.



**Figure 8:** Chromatographie en phase gazeuse

#### **1.4. Chromatographie sur couche mince haute performance(HPTLC)**

Comme toutes les chromatographies, cette méthode vise à séparer les constituants d'un mélange et repose sur l'utilisation d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. Dans ce cas, la phase stationnaire est un adsorbant (gel de silice souvent) et la phase mobile est un solvant.

L'histamine sont extraites avec un solvant puis les différents composants du fluide vont migrer plus ou moins en fonction de leur solubilité dans le solvant et de leur affinité pour la gel de silice.

Cette méthode est très précise, reproductible, rapide(car elle permet d'analyser plusieurs test inter-laboratoires et certains des réactifs employés sont toxiques).[8]

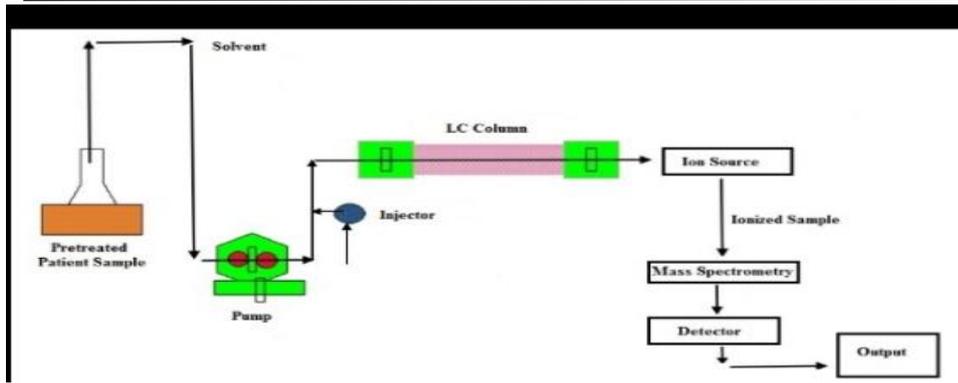
#### **1.5. Association officielle des chimistes analystes (AOAC)**

Méthode de référence pour les Etats-Unis et le codex alimentaire ; le résultat est mesuré par fluorimétrie. C'est une méthode très précise, reproductible. Son inconvénients est qu'elle longue à mette en œuvre et elle doit être effectuée par des analystes expérimentés.[8]

#### **1.6. Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)**

La chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique analytique puissante qui associe le pouvoir de séparation de la chromatographie en phase liquide à la capacité d'analyse de masse, peut donner des résultats même en présence d'autres produits chimiques. L'échantillon est pompé à travers une phase stationnaire (colonne LC) par une phase mobile s'écoulant à haute pression. L'interaction chimique entre les composants de l'échantillon, la phase stationnaire et la phase mobile affecte différentes vitesse de migration à travers la colonne LC, ce qui affecte la séparation. Après élution de la colonne LC, l'effluent est dirigé vers le spectromètre de masse.

❖ Appareillage en LC-MS/MS



**Figure 9:** Principe de fonctionnement de LC.MS/MS

Il est constitué d'un :

- ✓ Réservoir de la phase mobile liée à un dégazeur pour éliminer les bulles d'air
- ✓ Pompe
- ✓ Colonne LC
- ✓ Ion source
- ✓ Masse spectrométrie
- ✓ Détecteur



**Figure 10:** Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

## PARTIE II : MATERIELS ET METHODES



## I. METHODE SPECTROFLUORIMETRIQUE DE LERKE ET BELL POUR LA DETERMINATION DE L'HISTAMINE EN POISSONS

### 1. Objet et domaine d'application

La présente procédure décrit le mode opératoire de la détermination de la teneur en histamine dans la chair des poissons, cette procédure s'applique à toutes les espèces de poissons reçus à l'INH par la méthode spectrofluorométrique de LERK et BELL (1978).

### 2. Principe de la méthode

L'histamine est extraite par une solution d'acide trichloracétique puis fixé sur une colonne remplis d'une résine échangeuse d'ions et éluée par l'acide chlorhydrique. Le dosage est effectué par fluorométrie après addition d'ortho-phtaldéhyde.

### 3. Réactifs et leurs préparations :



Figure 10: Réactif préparé pour le dosage de l'histamine

**Tableau 5:** Instruction de préparation des réactifs chimiques pour le dosage de l'histamine

Réactif	Nature	Description
1	Préparation de solution d'acide trichloracétique à 10% (10g /100ml)	Peser 10g d'acide TCA pur et compléter le volume à 100ml de l'eau
2	Préparation de Tampon acétate (0,2N, pH =4,62)	Dissoudre 8,05 g d'acétate de sodium dans 1ml de l'eau, ajouter 5,7 ml d'acide acétique et complétant à un litre avec d'eau, le pH doit être à 4,62 : à ajuster avec l'acide acétique CH <sub>3</sub> COOH si le pH strictement supérieur à 4,62 A ajuster avec l'acétate de sodium CH <sub>3</sub> COONa si le pH est strictement inférieur à 4,62
3	Préparation de solution d'acide chlorhydrique 0,2 N	Pipeter 200ml d'acide chlorhydrique 1N et compléter le volume par l'eau jusqu'à un litre
4	Préparation de solution d'acide chlorhydriques 0,7 N	Pipeter 700ml de HCL 1N et compléter le volume par l'eau jusqu'à un litre
5	Hydroxyde de sodium 1N	
6	Préparation de la résine Amberlite CG-50type 1,75 minérons ,100 à 200mesch	introduire la laine de verre avec une pipette de 2ml+Mette en suspension 1,2g de résine Amberlite dans une quantité nécessaire et suffisante de tampon acétate (pH=4,62) transférer dans la colonne .la hauteur de la résine doit être de 5cm
7	Préparation de l'OPA à 1g /100ml d'alcool méthylique (1%)	Peser 0,1 g Orthophta-aldehyde et compléter le volume à 10ml avec de l'alcool méthylique ou méthanol (ou 1g dans un 100ml d'alcool méthylique)
8	Préparation de l'acétate de sodium à ph=4,62	Peser 13,6g d'acétate de sodium +11,4 ml de A. Acétique+ compléter à 2 L par l'eau

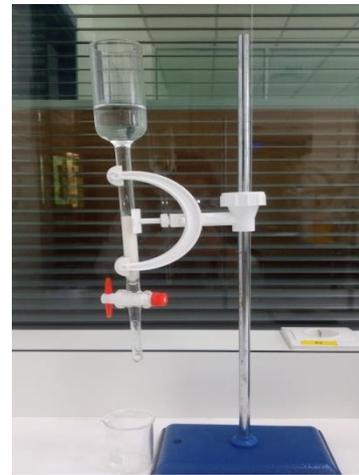
#### 4. Matériel de laboratoire

On doit disposer du matériel suivant :

- Colonne de verre de 150×9 mm munies d'un robinet et d'un réservoir de 250ml ;
- Fluorimètre ;
- pH-mètre au centième ;
- Mixeur pour hacher l'échantillon de poisson ;
- Mixeur à grande vitesse (entre 8000 et 45000 tours / min)
- Système de filtration rapide avec un diamètre de 150mm.



**Figure 11:**Appareil de Spectrofluorimétrie



**Figure 12:**Colonne chromatographique contenant la résine Amberlite GC-50

#### 5. Mode opératoire

##### ❖ Préparation de l'échantillon

1<sup>er</sup> étape : vérification de pH de la solution Tampon acétique avec calibrage pH mètre ;



2ème étape : Préparation de l'extrait TCA(ou séparation de l'histamine) :

- Hacher un échantillon représentatif de poisson ;
- Peser 5g de l'échantillon ;
- Ajouter 45 ml de l'acide trichloracétique à 10%(si on prélève 10g , on ajoute 90 ml de TCA) ;
- Homogénéisation ;
- Filtrer ensuite sur un papier filtre .L'extrait peut être gardé pendant 7 jour à une température de 2°C à 6°C.

3ème étape : Purification de l'histamine

- Dans un bêcher, placer 20 ml de Tampon acétate et ajouter 0,2 ml d'extrait TCA ;
- Transférer sur la colonne puis rincer le bêcher avec 30ml du Tampon acétate (fermer le robinet de la colonne) ;
- Laisser l'écoulement de liquide, rincer avec 100ml de Tampon acétate ;
- Eliminer les solutions de lavage.

4ème étape : Elution récupération de l'histamine

- Eluer l'histamine avec 20ml d'acide chlorhydrique 0,2N ;
- Recueillir l'éluant dans un bêcher ;

5ème étape : Etape de complication

- Transférer 2ml de l'éluant dans un tube et ajouter dans l'ordre en agitant après chaque addition : 1ml de NaOH (1N) et 0,1 ml de l'OPA à 1g/100ml (1%) ;
- Après exactement 3,5 minutes, ajouter 2ml de HCL 0,7N ;
- Agitation dans un vortex.

6ème étape : Lecture de la fluorescence :

-Mesurer la fluorescence par le fluorimètre à des longueurs d'ondes d'émission et d'excitation respectives 450nm et 360nm.

❖ Préparation des solutions étalons :

- ✓ Solutions mère à 1gr d'histamine/Litre (1000ppm) :

Dans une fiole jaugée de 100ml introduire 0.1656 g d'histamine et compléter jusqu'à le trait avec HCl 0.1N.

- ✓ Solution fille 0.02g d'histamine /Litre (20ppm)

Préparer les solutions de travail de 0.05-0.1-0.2 comme suit :

Tableau 6:Préparation des solutions étalon

Numéro de l'étalon	Volume à Prélevé de la solution fille 20ppm (ml)	Volume finale en HCl 0.2N (ml)	Concentration de l'étalon (ppm)	Concentration Equivalente (ppm)
1	0.25	100	0.05	45
2	0.5	100	0.1	90
3	1	100	0.2	180

**PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

### 1. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en mg/Kg ou ppm en poisson

Standard en ppm	Absorbance en RFU
0	7488,9
45	49159,7
90	130655,3
180	254779

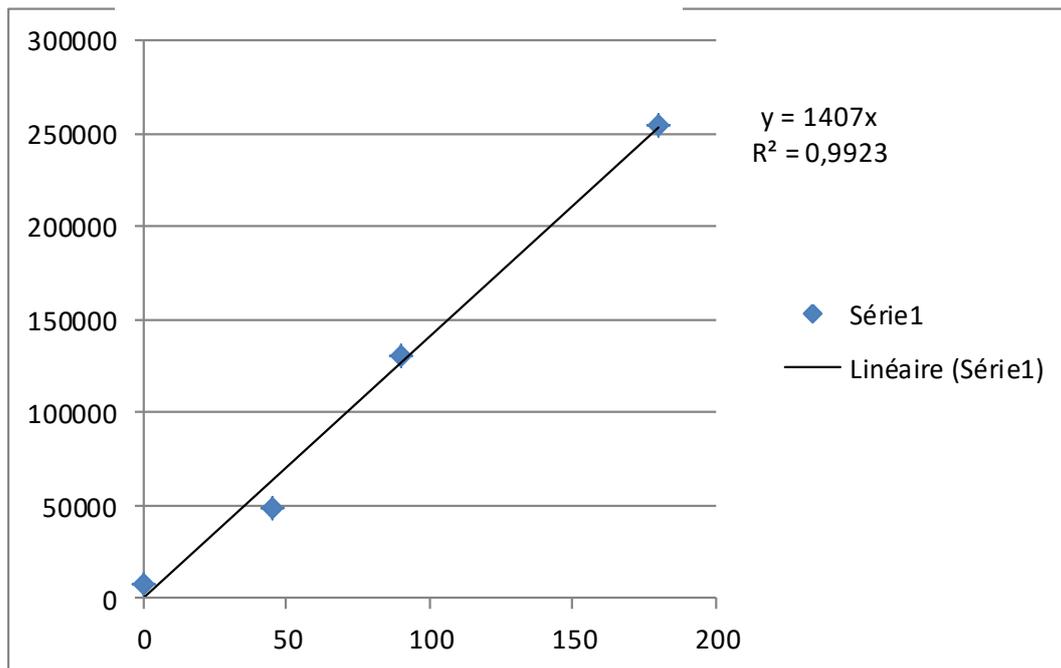


Figure 13 : Courbe d'étalonnage

### 2. Taux d'histamine dans les conserves de sardine

Le tableau ci-dessous représente les résultats de la teneur en histamine des conserves de sardines de 2 marques collectées des grandes surfaces.

Tableau 7: Teneur en histamine dans des échantillons des conserves de sardines provenant des grandes surfaces

Echantillon de sardine à l'huile végétale	Taux d'histamine en ppm
1	2,77
2	3,77



Figure 14 : Résultats affiché par spectrofluorométrie

On remarque d'après le tableau ci-dessus, que les deux échantillons testés présentent des taux d'histamine inférieurs à 100ppm (Selon l'arrête n°293-19 du 9 jourmada II 1440(15 février 2019 ou selon le règlement (CE) N° 2073/2005). Donc ce sont des échantillons conformes.

Ainsi l'ensemble de deux échantillons sont satisfaisants ,dû à la méthode de conservation utilisée au niveau du processus de fabrication des conserves de sardine qui permet de garder le produit bien à l'abri de toute altération ou développement microbien. Cette augmentation de la teneur en histamine peut également due à un problème au niveau du stockage.

Des études faites par BARANOWSKI, OLLEY et LERK ont montré qu'en dépassant la Température optimale de conservation des conserves, entre dans un intervalle thermique favorisant le développement de quelques espèces comme *Klebselia Pneumonia* et *proteus Morgannii* qui dégrade l'histidine en histamine par l'histidine décarboxylase.

## CONCLUSION GENERALE

L'amélioration de la qualité sanitaire des produits de mer est devenue une préoccupation majeure des pouvoirs publics et de tous les acteurs dans ce domaine; particulièrement le contrôle du taux d'histamine dans les produits halieutiques. L'histamine, considérée comme médiateur chimique auprès de l'adrénaline, joue un rôle important dans le système nerveux.

Pour Contrôler la qualité des aliments plusieurs méthodes ont été établies pour le dosage de l'histamine. Dans cette étude nous avons utilisé la méthode Spectrofluorométrique de LERK et BELL(1978).

Selon le règlement européen N°2073/2005 du 15 Novembre 2005, le taux limite d'histamine est fixé à 100mg/Kg. Cependant, ces limites d'acceptabilités de l'histamine dans les poissons changent d'un pays à un autre.

Après l'analyse et le dosage, les principaux résultats sont les suivants : 100% des échantillons ont été conformes au règlement (CE) N° 2073/2005 du 15 novembre 2005 sur la teneur d'histamine dans les conserves de sardine.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### SITES WEBS :

[1] : Site officiel de l'Institut National de Rabat. [www.inh.ma](http://www.inh.ma)

[7] : <http://www.bibliomer.com/> (IFREMER, 2008).

### Références divers:

[2]: DIB AMIRA Leila HIDA OA «les produits de la pêche», Institut des Sciences Vétérinaires Université Frères Mentouri, Constantine , page 4

[3] : Kokou ABOTCHI « Evolution de la qualité microbiologique des poissons fumés artisanalement Autogo», mémoire du Master , l'école inter-Etats des sciences et Médecine vétérinaires (EISMV), Dakar (sénégal),2010,page 2-3.

[4] :Dieudonné TIALLA«Etude de la relation entre le taux d'histamine dans le thon frais et le niveau de contamination par les bactéries histaminogènes», mémoire de diplôme de master ,Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires (EISMV), Dakar,2010 page 2-8.

[5] : EL Mountassir Hassan «Validation et estimation de l'incertitude de la méthode LERK et BELL de dosage de l'histamine par une nouvelle approche statistique basée sur le concept d'erreur total», mémoire de diplôme de master, Faculté des sciences et techniques, page 11-12.

[6] : Stéphy Edgard DOUABALE «Mise au point d'une nouvelle méthode spectrofluorimétrique détermination du taux d'histamine dans les produits halieutiques à partir de la cinétique de formation du complexe orthophthalaldéhyde –histamine en milieu alcalin», thèse de doctorant de 3<sup>ème</sup> cycle, Faculté de sciences et techniques cheikh Anta DIOP, 2005, page 8

[8] : Nelly BREGEON «dosage rapide de l'histamine dans le thon mise au point optimisation-Application»,Rapports internes de la direction des ressources vivantes de l'Ifremer, 1992, page 37

