

Liste des abréviations

OPA : O-phthalaldéhyde ;

DAO : Diamine Oxydase ;

TAC : Trichloro-Acétique ;

AOAC : Association of Official Agricultural Chemists ;

min : minute;

h : heure ;

ppm : Partie par million ;

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance ;

18 : Constante ;

SARL : Société à Responsabilité Limitée ;

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point;

AAM: AgroAnalyses Maroc Laboratoire ;

ABVT : Azote Basique Volatil Total ;

Liste des tableaux

Tableau 1: Destination des produits de la pêche de 2008 à 2014 en Atlantique (en tonnes). [4].....	12
Tableau 2 : Destination des produits de la pêche de 2008 à 2014 en Méditerranée (en tonnes). [4]	13
Tableau 3: Règlement Européen 1441 2007 décrivant les limites histaminiques dans différents produits halieutiques. [7].....	21
Tableau 4: Teneur en histamine dans des échantillons des conserves de sardines provenant des grandes surfaces.	23
Tableau 5: Teneur en histamine des échantillons des conserves de sardines destinées à l'export.	25
Tableau 6: Teneur histaminique des échantillons des semi-conserves des grandes surfaces.	26
Tableau 7: Teneur en histamine pour les semi-conserves destinées à l'export.....	27

Liste des figures

Figure 2: Processus de fabrication de semi-conserve d'anchois salé.....	9
Figure 4: Processus de fabrication des conserves de sardine.	11
Figure 5: Production nationale en Atlantique d'anchois et de sardines (en tonnes) 2008-2014. [4]	12
Figure 6: Statistiques de la production nationale Méditerranéenne d'anchois et de sardines (en tonnes) 2008-2014. [4].....	13
Figure 7 : Evolution de l'exportation des semi-conserves d'anchois et de sardines ainsi que les conserves s de sardine au Maroc entre 2008 et 2014. [4].....	14
Figure 8: Fluorescence histaminique des conserves de sardine provenant des grandes surfaces.	24
Figure 9 : Fluorescence histaminique des conserves de sardines destinées à l'export.	25
Figure 10 : Fluorescence histaminique dans les semi-conserves d'anchois des grandes surfaces.	27
Figure 11: Fluorescence histaminique des semi-conserves destinées à l'export.	28

Table de matière

Liste des abréviations	1
Introduction	5
Chapitre I : Présentation de l'organisme d'accueil AAM :	7
Chapitre II : Espèces utilisées au niveau des analyses :	8
1. Les Anchois	8
2. Sardines	10
3. Statistiques.....	12
1. Zone Atlantique	12
2. Zone méditerranéenne :	13
3. Evolution des exportations des produits de la mer en Maroc :	14
4. Dangers liés à l'intoxication histaminique :	14
Chapitre 1 : Méthodes de dosage d'histamine :	16
1. Méthode AOAC	16
2. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) :	16
Chapitre 2 : Méthode de dosage d'histamine utilisée au sein du laboratoire :	18
Méthode spectrofluorimétrique de Lerke et Bell :	18
Objet et domaine d'application :	18
Réactifs :	18
Appareillage :	18
Préparation de l'échantillon :	19
Dosage	19
1. Taux d'histamine dans les Conserve de Sardine :	23
2. Taux d'histamine dans les semi-conserves d'anchois :	26
Conclusion générale :	29
Références bibliographiques :	30

Introduction

Le secteur de la pêche joue un rôle socio-économique de première importance et constitue l'un des piliers de l'économie nationale. En effet, les apports en devises et la richesse qu'il génère, font de lui un secteur stratégique, non seulement pour conforter les équilibres macroéconomiques, mais aussi pour contribuer de façon dynamique au développement du pays en termes d'emplois (plus 660.000 emplois faisant vivre 3 millions de personnes), de sécurité alimentaire et de revenu, ainsi que pour son effet d'entraînement sur les autres secteurs de l'économie nationale. Grâce à la richesse des ressources halieutiques et à la position géographique privilégiée, le secteur place le Maroc parmi les plus importants producteurs et exportateurs des produits de la mer en Afrique. Ces performances, certes significatives, restent néanmoins en deçà des potentialités du secteur qui recèlent des opportunités considérables pour l'amélioration de la compétitivité des exportations. En effet, la richesse de nos côtes en poissons, la proximité aux marchés, notamment européens, les accords de libre-échange signés avec les partenaires étrangers, l'expérience accumulée par les industriels marocains dans le domaine du conditionnement et de la transformation des produits de la pêche sont autant d'éléments qui confèrent au Maroc un avantage compétitif certain pour se positionner sur le marché mondial des produits de la mer.

L'amélioration de la qualité des produits halieutiques est devenue donc une préoccupation majeure des pouvoirs publics et de tous les acteurs opérant dans ce domaine : le contrôle des taux de substances générées dans les tissus des poissons, destinées à la consommation, telles que l'histamine, l'azote basique volatil total « ABVT » et récemment les métaux lourds (Hg, Cd, ...), est devenu obligatoire. Les teneurs en additifs, généralement ajoutés pour le traitement et la conservation des crustacés (crevettes, langoustines), font également l'objet d'une réglementation stricte et exigeante.

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

Le travail présenté dans ce projet de fin d'étude s'inscrit dans le cadre de la licence en Bioprocédés, Hygiène et Sécurité des Aliments de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès. Son objectif principal est de faire des analyses physicochimiques d'intérêt agro-alimentaire. Il s'agit de l'évaluation de la teneur en histamine qui est un déterminant important de la qualité des produits halieutiques : Notre travail vise en effet à comparer le taux d'histamine dans les semi-conserves d'anchois et de sardines.

Ce rapport est divisé en trois parties :

- ✚ La revue bibliographique dont on a présenté les produits qui sont sujet de l'analyse ainsi que leurs statistiques.
- ✚ La partie expérimentale qui est consacré à la description de la méthode d'analyse ainsi que ses différentes étapes et des autres méthodes utilisées.
- ✚ La partie résultats et discussion et une conclusion générale.

Chapitre I : Présentation de l'organisme d'accueil AAM :

AgroAnalyses Maroc a été fondée en 2002, accrédité NM ISO 17025 en 2007 et agréé pour la 1^{ère} fois en 2008 par la CIPCARF puis en 2013 par l'ONSSA. Le laboratoire *AgroAnalyses Maroc* est actuellement une société privée et indépendante, sous forme juridique d'une SARL, sise au 19 rue Zyadah, Aviation, assurant les activités suivantes :

1. Analyses et contrôles des denrées alimentaires à différentes étapes de transformation depuis la matière première aux produits finis : bactériologiques et physico-chimiques ;
 2. Analyses et contrôles microbiologiques et physico-chimiques des eaux (potables, brutes, usées...)
 3. Accompagnement des industries agroalimentaires dans leurs démarches d'assurance qualité ;
 4. Assistance, conseil et audit HACCP ;
 5. Hygiène et sécurité sanitaire ;
 6. Formation en hygiène et sécurité sanitaire.
- L'effectif d'*AgroAnalyses* Maroc comprend 16 personnes de compétences pluridisciplinaires : microbiologistes, médecins, licenciés, biologistes et chimistes. Cette équipe bénéficie de l'apport de consultant externes : qualitatifs, hygiénistes, toxicologues en cas de besoin.
 - AAM est conçu de manière à répondre aux exigences d'un laboratoire agroalimentaire avec marche en avant.
 - *AgroAnalyses Maroc* est le premier laboratoire privé agréé par le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural pour les analyses bactériologiques alimentaires et hydriques et pour les analyses d'histamine et d'ABVT sur les produits de la pêche.[1]

Chapitre II : Espèces utilisées au niveau des analyses :

1. Les Anchois

Les anchois de la famille des *engraulidés* se regroupent en sept espèces de petits poissons pélagiques qui se rencontrent dans la mer Méditerranée, l'océan Atlantique, l'océan Pacifique et l'océan Indien. Les anchois sont consommés à l'état frais, congelés, salés, en semi-conserves, marinés ou sous forme de pâte d'anchois. Les semi-conserves d'anchois au sel sont des préparations élaborées à partir d'anchois ayant subi une maturation (ou anchoitage) pendant une durée minimale de 2 à 3 mois avant d'être conditionnées en fûts, boîtes ou en bocaux de verre étanches aux liquides. Traditionnellement, les unités d'anchoitage étaient localisées surtout dans les pays de l'Europe du Sud (Espagne, France et Italie). La préparation et la consommation de produits à base d'anchois y est connue depuis l'époque romaine. Pendant les dernières décennies, il y a eu une délocalisation de cette industrie, notamment vers l'Afrique du Nord, en particulier au Maroc qui est devenu un des plus importants exportateurs de semi-conserves d'anchois dans le monde. C'est pendant cette phase de développement de l'industrie de l'anchoitage au Maroc que les auteurs ont mené plusieurs études de recherche appliquée pour mieux élucider les aspects technologiques et biologiques de l'anchoitage, afin de mieux conseiller les professionnels et les responsables sanitaires.[2]

La technologie des semi-conserves d'anchois fait appel à l'action du sel seul sans intervention ni de traitement thermique ni d'adjonctions d'additifs en vue d'un effet stabilisateur pour la conservation. Le salage approprié de l'anchois conduit à une maturation caractéristique de la chair, le poisson est dit «anchoité». L'anchoitage est un processus complexe de réactions biochimiques qui dépendent de différents paramètres techniques (température, durée, pression, etc.) de la maturation (Figure 1). Dans cette technologie, la qualité de la matière première et des ingrédients conditionne la réussite de l'anchoitage et, par conséquent, l'obtention d'un produit final aux caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques désirées. Le choix de la matière première est donc une étape primordiale. [2]

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

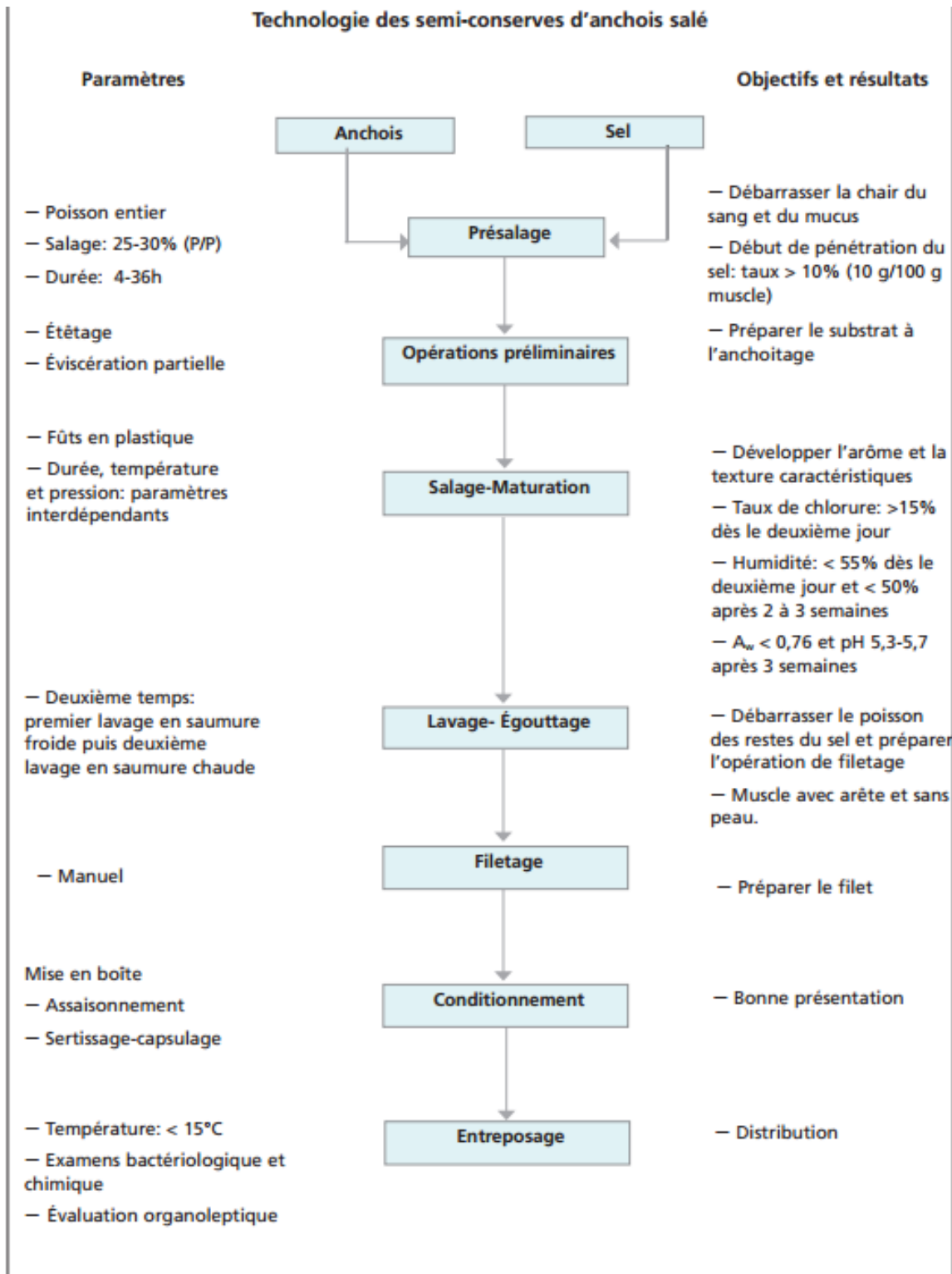


Figure 1: Processus de fabrication de semi-conserve d'anchois salé.

2. Sardines

La sardine est un poisson téléostéen appartenant à sous famille des *culpeinae* et à la famille des **clupéidés**. Dans les pays méditerranées, le mot sardine est affecté aussi bien à la *sardina pinchards* qu'à la *sardinella aurita*. La sardine; en, général, est une espèce pélagique côtière dont la chair présente deux types de muscle : les muscles blancs et les muscles rouges. Les premiers, riches en protéine et en eau, constituent plus de 83% de la musculature. Les seconds forment une bande latérale située juste au-dessous de la peau, d'une profondeur de 1 à 2 mm. Les muscles rouges sont riches en myoglobine, en mitochondries et surtout en lipide, mais ils contiennent moins d'eau.

La sardine est un produit fragile hautement dégradable sous l'action de la température et les conditions atmosphériques externes, d'où la nécessité d'un moyen capable de conserver la qualité nutritionnelle, organoleptique et hygiénique de la sardine pendant une longue durée. Parmi les moyens les plus utilisés pour la conservation de la sardine est la conservation dans des boites hermétiquement clos et étanches vis-à-vis les échanges atmosphériques et microbiologiques qu'elles peuvent avoir lieu entre le milieu externe et le contenu de la boite. Cette technique de conservation permet de répondre aux exigences de consommateur comme un produit disponible pendant toute l'année sans tenir compte des contraintes climatiques et les saisons de pêche de sardine.

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

Pour la fabrication des conserves de sardine, et après réception au niveau de la conserverie, les sardines subissent l'ensemble des étapes suivantes (Figure 2):

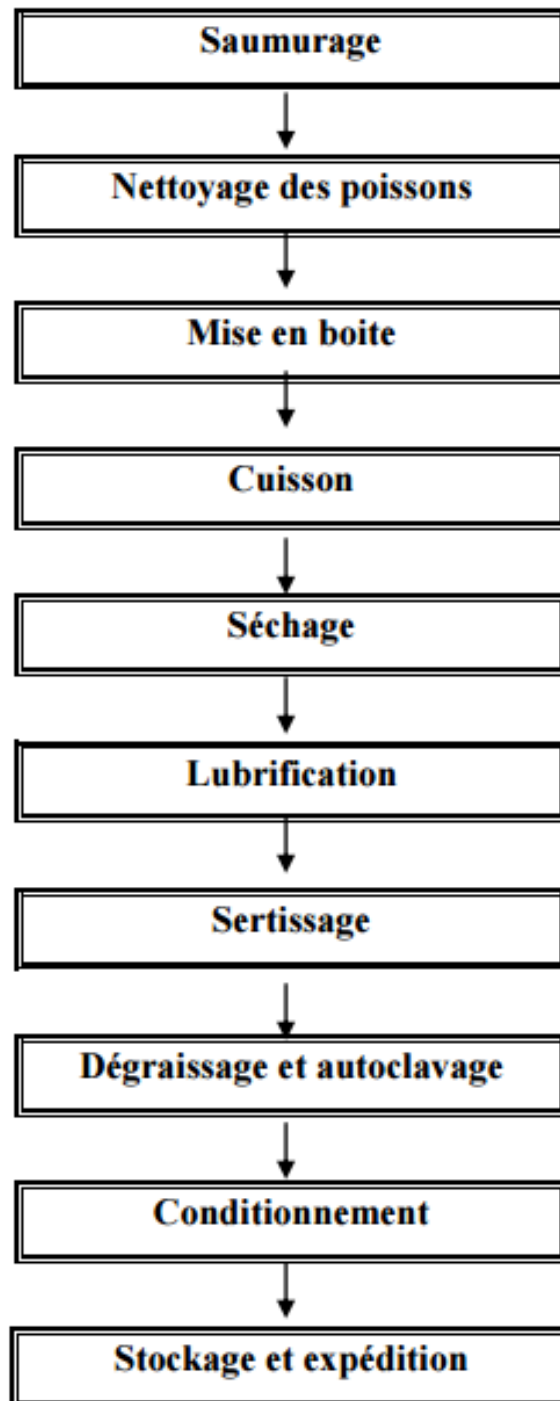


Figure 2: Processus de fabrication des conserves de sardine.



3. Statistiques

1. Zone Atlantique

Le graphe ci-dessous représente l'évolution de la production marocaine de sardine et d'anchois dans la zone atlantique. On remarque que la production d'anchois reste toujours faible par rapport à celle des sardines.

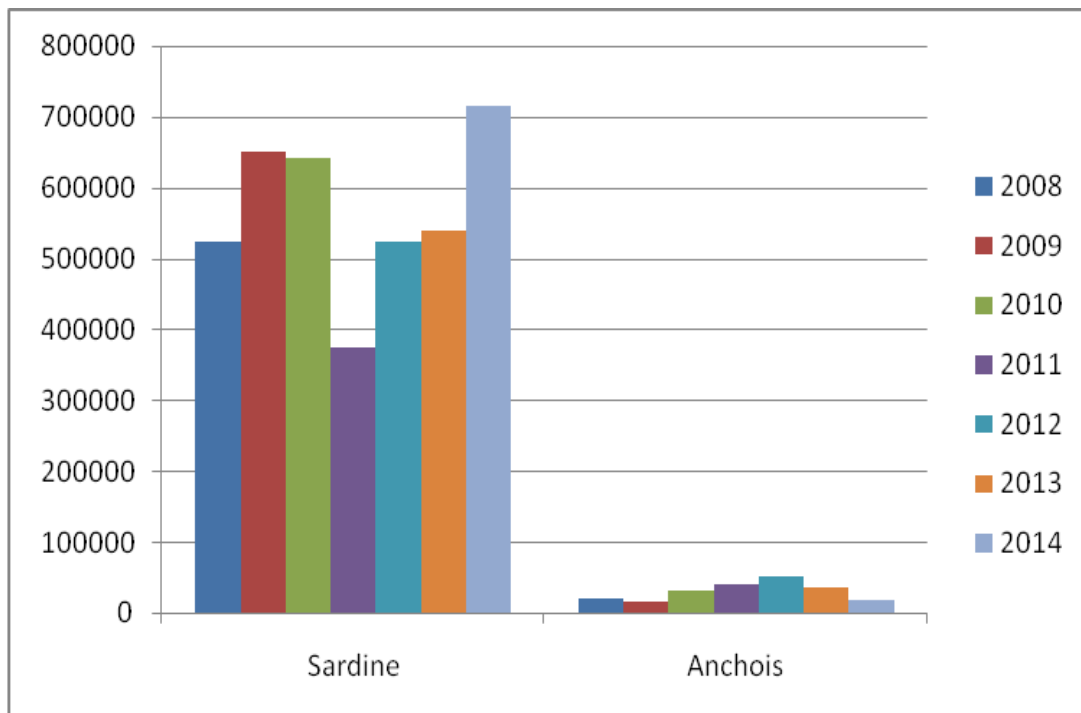


Figure 3: Production nationale en Atlantique d'anchois et de sardines (en tonnes) 2008-2014. [4]

Tableau 1: Destination des produits de la pêche de 2008 à 2014 en Atlantique (en tonnes). [4]

D'après le tableau ci-dessous, la plupart des destinations des produits de la pêche marocaine sont des conserves. On trouve de nombreux d'eux sont les conserves de sardines.

Produit/ Années	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Conserve	122696	109053	182783	116891	149223	153523	205960
Semi-conserve	9281	9282	7368	2495	7551	5963	4731

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

2. Zone méditerranéenne :

Le graphe ci-dessous représente la production nationale d'anchois et de sardine dans la zone méditerranéenne. On remarque que comme la zone atlantique, la production en sardine reste bien élevée par rapport à celle d'anchois.

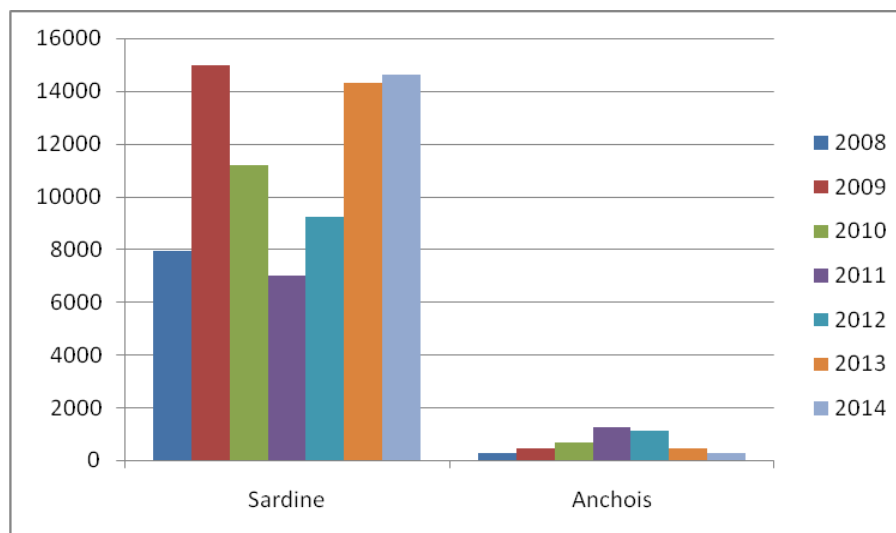


Figure 4: Statistiques de la production nationale de la zone Méditerranéenne d'anchois et de sardines (en tonnes) 2008-2014. [4]

Tableau 2 : Destination des produits de la pêche de 2008 à 2014 en Méditerranée (en tonnes). [4]

D'après le tableau ci-dessous les produits de la pêche nationale de la zone méditerranéenne ne sont destinés à aucune production industrielle.

Produit/ Années	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Conserve	0	0	0	0	0	0	0
Semi-conserve	0	0	0	0	0	0	0

3. Evolution des exportations des produits de la mer en Maroc :

Le graphe ci-dessous présente les différentes formes d'exportation des produits de pêche marocaine, dont on remarque que la majorité exportée est sous forme de conserve de sardine.

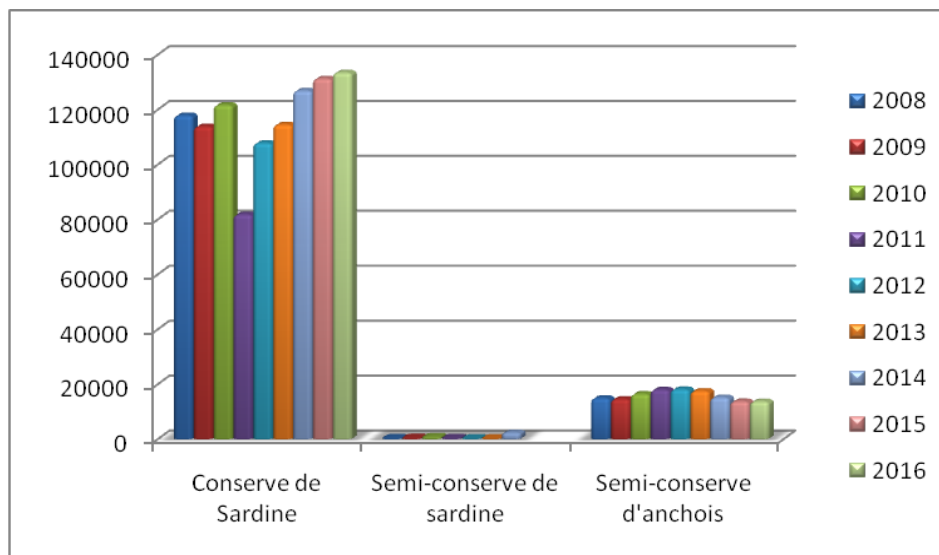


Figure 5 : Evolution de l'exportation des semi-conserves d'anchois et de sardines ainsi que les conserves s de sardine au Maroc entre 2008 et 2014. [4]

4. Dangers liés à l'intoxication histaminique :

L'histamine, naturellement présente dans l'organisme, est un neuromédiateur largement impliqué dans les phénomènes inflammatoires et allergiques. Elle est synthétisée par décarboxylation à partir de l'histidine (acide aminé) et est stockée principalement dans les cellules immunitaires, les mastocytes, qui la libèrent lorsqu'ils sont stimulés par la présence d'une molécule étrangère comme un allergène.

La formation de l'histamine dans les aliments dépend de trois facteurs essentiels:

- La teneur en L histidine libre
- La présence de bactéries capables de synthétiser l'histidine décarboxylase.
- Les conditions permettant leur croissance et la production d'enzymes actives (température, pH essentiellement). [5]

L'ingestion de doses élevées d'histamine conduit à la saturation des enzymes digestives catabolisant l'histamine et à l'intoxication par absorption intestinale de l'histamine non métabolisé. L'ingestion de doses plus faibles d'histamine en combinaison avec d'autres amines biogènes présentes dans l'aliment peut produire le même effet par inhibition compétitive des enzymes de dégradation de l'histamine. Les principaux symptômes de

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

l'intoxication histaminique (ou syndrome de pseudo-allergie alimentaire) sont liés à l'effet vasodilatateur (qui permet de dilater les vaisseaux sanguins) de l'histamine capillaires, qui entraîne des phénomènes d'hémoconcentration. [5]

Principaux aliments à considérer parmi les espèces de poissons, dont leur chair se compose d'une grande quantité d'histidine, celles appartenant à la famille des Scombridés (thon, maquereau). Ils sont en effet considérés comme la source la plus courante d'intoxication à l'histamine (d'où le terme anglais très répandu de « Scombroid Fish Poisoning »). Les conditions d'hygiène et de conservation des poissons conditionnent aussi la contamination et la multiplication des bactéries capables de synthétiser l'histidine décarboxylase. Le thon, pêché en mer chaude, a une température interne dès la capture supérieure à celle des autres espèces de poisson et est aussi particulièrement sensible aux fluctuations de température durant sa manipulation. Par ailleurs, les poissons à haute teneur en histidine qui ont subi un traitement de maturation enzymatique dans la saumure (ex : anchois salés, produits à base d'anchois salés, sauce de poisson) peuvent avoir des teneurs en histamine plus élevées.

Premiers symptômes remarqués :

- ❖ 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,
- ❖ céphalées, palpitations cardiaques, étourdissements.
- ❖ Symptômes secondaires, de nature gastro-intestinale : nausées, maux d'estomac, vomissements, diarrhée.

La durée de ces symptômes peut aller de quelques heures à plusieurs jours dans certains cas. Pire, les conséquences d'une absorption de l'histamine peuvent être très graves pour l'homme (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et conduire à la mort.

On admet généralement que des teneurs en histamine inférieures à 50 mg.kg^{-1} sont sans effet toxique. De 50 à 100 mg.kg^{-1} , on observe quelques intoxications légères. De 100 à 1000 mg.kg^{-1} , le produit est toxique. [5]

Chapitre 1 : Méthodes de dosage d'histamine :

L'histamine est une amine biogène provenant de la dégradation de l'histidine par décarboxylation dans la chair du poisson. Elle est très toxique. Sa présence à des teneurs élevées dans les produits halieutiques est susceptible de provoquer des problèmes sanitaires graves (intoxication, allergies, troubles respiratoires, vomissements, diarrhées, etc.)

Nombreuses sont 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.) et les liquides physiologiques (sang, plasma, urine, larmes, etc.). Le dosage de ce paramètre représente un enjeu sanitaire et économique très important. [6]

Depuis sa découverte, diverses méthodes ont été utilisées pour son dosage dans différentes matrices, on note la méthode de référence utilisée au niveau de notre travail qui est l'HPLC, et la méthode normalisée européenne l'AOAC :

1. Méthode AOAC

C'est une méthode de référence pour les Etats-Unis et le Codex Alimentarius.

L'histamine est extraite de l'échantillon avec une solution de méthanol à 75%. L'extrait méthanolique est passé dans une colonne échangeuse d'ions puis l'histamine éluée est complexée avec OPA, qui est un dérivé fluorescent.

Le résultat est mesuré par fluorimétrie.

Avantages :

Cette méthode est très précise, sensible et reproductible.

Inconvénients

Cette méthode est longue à mettre en œuvre et elle doit être effectuée par des analystes expérimentés.

2. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) :

Méthode de référence pour l'Union Européenne.

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. 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 dérivation de ces amines (avant ou après passage dans la colonne). La solution à tester est ensuite injectée dans la colonne où les constituants vont être retenus inégalement en fonction de leur taille et de leur composition. Ils vont donc mettre 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.

Avantages :

Cette méthode est très précise, sensible et reproductible.

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

Inconvénients :

Cette méthode nécessite un équipement sophistiqué (cher) et du personnel spécifiquement formé à ce matériel. [6]

Sur le plan production et mise sur la marché des produits de la mer, la réglementation établie par la commission (règlement communautaire CE n° 2073/2005) fixe les règles sanitaires régissant ces procédures de surveillance. En effet, lors d'un plan de surveillance, neuf échantillons sont prélevés sur chaque lot:

- ✓ La teneur moyenne ne doit pas dépasser 100 mg/kg de chair de poisson ;
- ✓ Deux échantillons peuvent dépasser 100 mg/kg sans atteindre 200 mg/kg;
- ✓ Aucun échantillon ne doit dépasser 200 mg/kg.

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

- > *Scombridés* : maquereaux, thons, thonites, auxides, bonites, palomettes,... ;
- > *Clupéidés* : harengs, ethmaloses, sardines, sardinelles, sardinops,..... ;
- > *Engraulidés* : anchois ;
- > *Coryphaenidés* : coryphènes commune (mahi-mahi) ;
- > *Pomatomidés* : tassergal ;
- > Espadon, le marlin. [6]

Chapitre 2 : Méthode de dosage d'histamine utilisée au sein du laboratoire :

Méthode spectrofluorimétrique de Lerke et Bell :

Les conserves et semi-conserves de poisson peuvent faire l'objet d'analyse d'histamine. Lors de l'évaluation organoleptique des échantillons, le taux d'histamine est déterminée sur tout échantillon suspect, notamment ceux qui induisent des picotements sur la langue.

Objet et domaine d'application :

La méthode Lerke et Bell (1976) adoptée dans plusieurs pays européens tels que la France et l'Allemagne.

Cette méthode de dosage de l'histamine est applicable à tous les produits de la pêche quelque soit, leur mode de conditionnement ou de préparation. [1]

Réactifs :

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être distillée ou déminéralisée.

- Solution tampon (137g d'acétate de sodium+ 58 mL d'acide acétique + 10 L d'eau distillée) à pH 4.62 ;
- TCA : solution trichloro-acétique à 10 g/100 mL ;
- Solution d'acide chlorhydrique à 0.2N ;
- Solution d'acide chlorhydrique à 0.7N ;
- Solution d'hydroxyde de sodium 1N ;
- Solution d'O-phthalaldéhyde (OPA) à 1g/100 mL d'alcool méthylique ;
- Solution-mère d'histamine à 1g/1000 mL préparée en dissolvant 0.1656 g de chlorhydrate d'histamine dans 100mL d'acide chlorhydrique 0.1N ;
- Résine Amberline CG 50 type 1 :75 à 150 microns, 100 à 200 mesh.

Appareillage :

On doit disposer du matériel suivant :

- ❖ Balance analytique
- ❖ Colonnes de verre de 150 x 9 mm munies de robinet et d'un réservoir de 250 mL ;
- ❖ Spectrofluorimètre avec cuves spéciales ;

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

- ❖ pH-mètre au centième ;
- ❖ Broyeur à grande vitesse (entre 8000 et 45000 tours/min) ;
- ❖ Système de filtration rapide avec des filtres de porosité de 0,45;
- ❖ Micropipettes 1mL et 200microlitre réglables et étalonnées ;
- ❖ Verreries standards du laboratoire à usage multiples ;
- ❖ Matériel courant du laboratoire (pots en plastique, entonnoirs.....)

Contrôle qualité :

Pour avoir des résultats fiables, le laboratoire effectue :

- Des contrôles qualité internes
 - Un blanc
 - Une solution dopée à 90 ppm avec un suivi sur carte de contrôle ;
 - Un contrôle par un Matériau de Référence certifié et relié au SI avec un suivi sur carte de contrôle ;
- Des essais inter laboratoires annuels organisés par l'ONSSA avec établissement d'un z-score ;
- Calibrage mensuel du fluorimètre
- Etalonnage annuel du fluorimètre pour la gamme basse et la gamme haute.

Préparation de l'échantillon :

- Préparer la solution tampon.
- Régler le pH de cette solution tampon à 4.62, qui sera utilisée au niveau des résines échangeuses d'ions ;
- Hacher soigneusement l'échantillon représentatif de poisson. 10 g de la masse broyée sont placés dans des sacs **stomacher** auquel 90 ml de solution d'acide trichloracétique TCA (10%) sont ajoutés. L'homogénéisation du mélange est réalisée via un mixeur rapide.
- Filtrer le mélange dans des flacons en verre en utilisant le système de filtration.

Dosage

1. **Etape d'extraction ou séparation de l'histamine :** Une aliquote de 0.2 mL de l'extrait obtenu après filtration, est injectée à 20 mL d'une solution tampon de pH = 4.62 dans une colonne remplie de résine échangeuse d'ions (de cations). Traiter dans les mêmes conditions 0.1mL de solution étalon pour un contrôle du 90 ppm.
2. **Etape de purification :** l'élimination des substances non fixées est réalisée par l'ajout de 100 mL du tampon acétate.

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

3. **Etape d'éluion Récupération de l'histamine :** elle est réalisée en ajoutant 20 mL d'HCl (acide chloridrique) à 0.2N, elle consiste à éluer l'histamine dans HCl.
4. **Etape de complexation :** Après la récupération de l'éluât dans, on transfère 2mL de ce dernier (l'éluât) dans des petits tubes en verre. On lui ajoute dans l'ordre : 1mL de NaOH à 1N + 0.1 mL d'OPA. Après exactement 3min50s, ajouter 2mL d'HCl à 0.7N pour arrêter la réaction (Formation d'un complexe OPA-Histamine).
5. **Etape de lecture :** Effectuer tout d'abord un essai à blanc dans les mêmes conditions en remplaçant les 2 mL de l'éluât par 2 mL d'eau distillée. Mesurer la fluorescence à des longueurs d'onde d'émission et d'excitation respectives de 450 nm et 360 nm.

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

Au cours de ce travail, on a analysé des échantillons provenant des grandes surfaces ainsi que certains produits destinés à l'export dont le laboratoire dispose.

Suivant le règlement européen 1441, on a utilisé un plan d'interprétation de qualité des échantillons à 3 classes (Tableau 3):

Tableau 3: Règlement Européen 1441 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	
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.	Histamine	9	2	200 mg/kg	400 mg/kg	HPLC
Produits de la pêche fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine.	Histamine	9	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

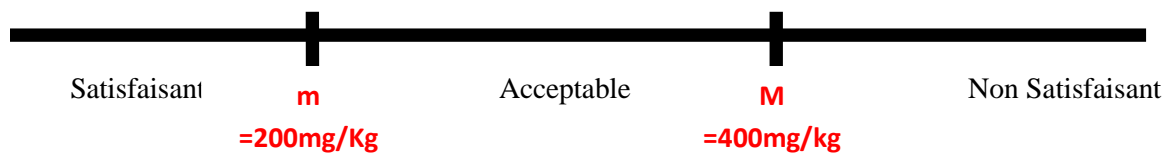
m et M : Critères ou valeurs du règlement.

n : Nombre d'unités composant l'échantillon.

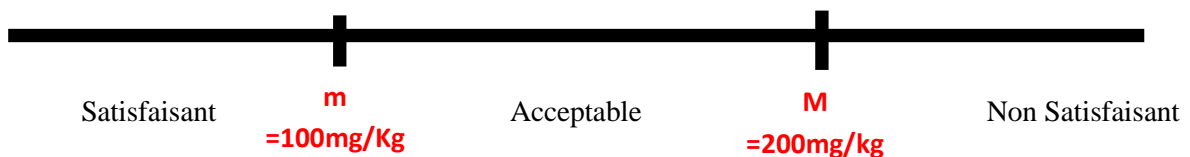
c : Nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre m et M.

Donc selon le règlement en tenant compte ppm = mg/kg :

Pour les semi-conserves d'anchois :



Pour les conserves de sardine :



1. Taux d'histamine dans les Conserve de Sardine :

✓ Echantillons provenant des grandes surfaces :

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

Tableau 4: Teneur en histamine dans des échantillons des conserves de sardines provenant des grandes surfaces.

Assaisonnement	Code de l'échantillon	Taux d'histamine en ppm
Huile végétale	6	3.245
	4	2.985
	3	2.755
	2	28.365
Huile de soja+piments+légumes +épices	1	4.375
Sauce de tomate	5	3.055

On remarque d'après le tableau ci-dessus, que tous les échantillons testés présentent des taux d'histamine inférieurs à 100 ppm.

Ainsi, l'ensemble des échantillons sont satisfaisants même si l'échantillon 2 présente un taux plus élevé. Ceci peut être 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, on entre dans un intervalle thermique favorisant le développement de quelques espèces comme *Klebselia Pneumonia* et *proteus morgannii* qui dégradent l'histidine en histamine par l'histidine décarboxylase.

En utilisant la relation suivante on peut tirer l'intensité fluorescence de l'échantillon :

$$\text{Quantité d'histamine en mg/100g de poisson} = T * 18 / Z$$

Donc :

$$\text{Intensité fluorescence de l'échantillon} = [\text{Quantité d'histamine (en mg / 100g de poisson)} * Z] / 18 + \text{intensité fluorescence de l'étalon}$$

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

En tenant compte que :

$T = \text{intensité fluorescence de l'échantillon} - \text{intensité fluorescence du blanc}$.

$Z = \text{intensité fluorescence de l'étalon (90ppm)} - \text{intensité fluorescence du blanc}$.

Avec : intensité fluorescence du blanc = 8651.

Intensité fluorescence de l'étalon (90 ppm) = 129145,7.

Pour le passage de ppm en mg/100 g, on doit diviser nos résultats sur 10.

Fluorescence d'histamine :

Cette fluorescence représente le complexe OPA-histamine qui est détectée par l'appareil sous forme fluorimétrique (Figure 8).

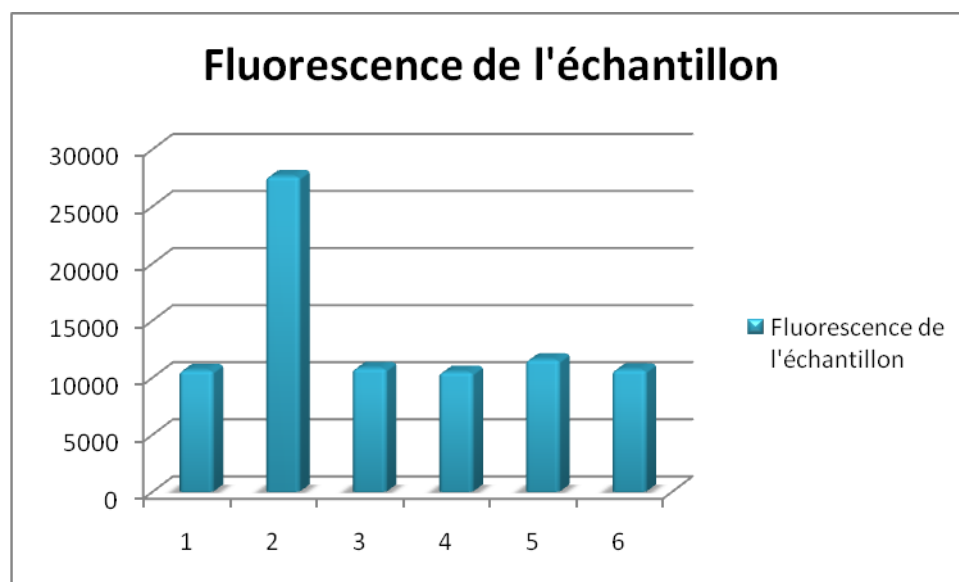


Figure 6: Fluorescence histaminique des conserves de sardine provenant des grandes surfaces.

D'après la figure 6, on remarque que la fluorescence d'histamine de l'échantillon 2 est élevée par rapport aux autres produits et ceci confirme bien les résultats des valeurs histaminiques obtenus précédemment (Tableau 4).

✓ Echantillons destinés à l'export :

Les échantillons présentés dans le tableau ci-dessous sont des produits destinés à l'export dont le laboratoire a effectué les analyses pour évaluer leurs conformités.

Les valeurs représentées dans ce tableau sont une moyenne de 9 échantillons (1 lot).

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

Tableau 5: Teneur en histamine des échantillons des conserves de sardines destinées à l'export.

Assaisonnement	Code de l'échantillon	Taux d'histamine en ppm
Sauce de tomate	7	24
	8	51
	9	32
	10	16

On remarque que par rapport aux échantillons des grandes surfaces, ceux destinés à l'export ont des valeurs plus élevées en histamine mais ne dépassant pas la limite de 100 ppm. Donc ce sont des échantillons conformes.

Fluorescence d'histamine :

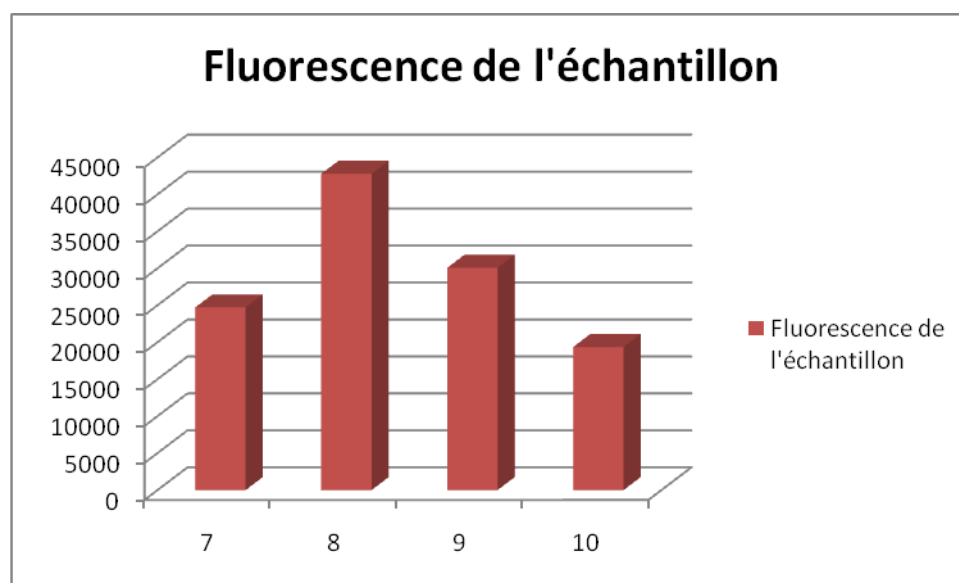


Figure 7 : Fluorescence histaminique des conserves de sardines destinées à l'export.

Néanmoins que nos échantillons sont satisfaisant, on remarque que le 8 a une fluorescence élevée par rapport aux autres cela est peut être due au traitement thermique qui n'était pas suffisant ou lors du conditionnement la température du stockage a été modifiée. Mais il ne dépasse pas la norme de 200ppm selon le règlement 1441, alors il reste parmi les satisfaisants.

2. Taux d'histamine dans les semi-conserves d'anchois :

✓ Echantillons provenant des grandes surfaces :

Les résultats consignés dans le tableau 6 représentent la teneur histaminique des semi-conserves d'anchois provenant de grandes surfaces.

Tableau 6: Teneur histaminique des échantillons des semi-conserves des grandes surfaces.

Marinade	Code de l'échantillon	Taux d'histamine en ppm
Mariné à la provençale	A	326.535
Mariné à l'orientale	B	324.185
Mariné à l'huile	C	5.81
Mariné à l'ail et au persil	D	506.235
Filé d'anchois salé	E	13.73

On remarque que les échantillons C et E sont satisfaisants car la teneur est inférieure à 200ppm.

Alors que les échantillons A et B sont acceptables parce que la teneur est située entre 200ppm et 400ppm.

Cependant, l'échantillon D est non satisfaisant et dit non conforme car sa valeur est supérieure à 400ppm. On suppose que cela revient à la rupture de la chaîne soit au niveau du transport entre l'usine et la grande surface, soit de froid au niveau du stockage dans la grande surface ou bien la présence d'un des ingrédients (ex : persil) qui n'était pas bien lavé, dans le cas où c'est un persil non commercial, cela engendrera la multiplication bactérienne qui par la suite dégradera l'histidine présente dans le poisson puis augmentera la teneur en histamine dans le produit final. Ceci engendre un grand risque d'intoxication en consommant ce produit. C'était l'un des but de la comparaison analytique entre les produits vendus dans les grandes surfaces pour le consommateur marocain et ceux destinés à l'export qui sont plus satisfaisants.

Fluorescence d'histamine :

D'après la figure 8, on remarque toujours que l'échantillon D dépasse les limites de la satisfaction donc il est non conforme. Alors que A et B ont des fluorescences proches. L'échantillon C et E ont des fluorescences plus faibles.

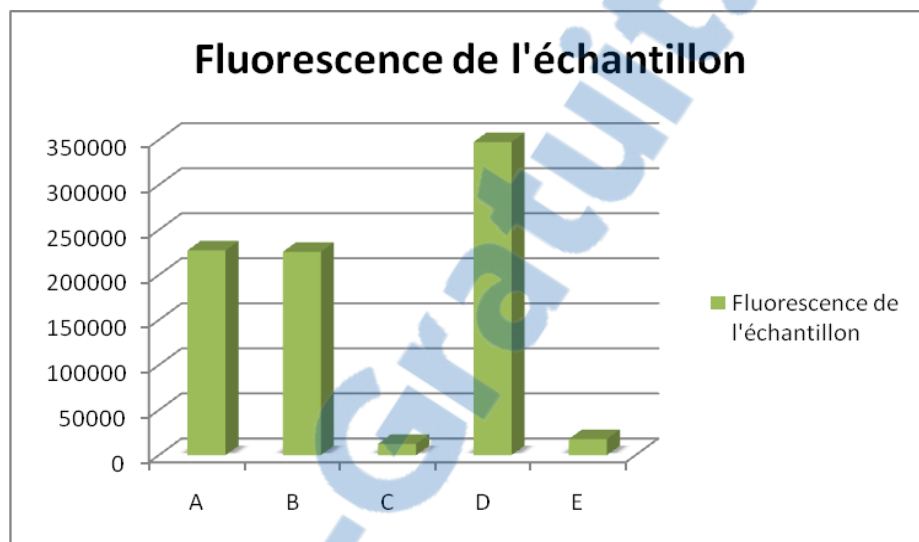


Figure 8 : Fluorescence histaminique dans les semi-conserves d'anchois des grandes surfaces.

✓ Echantillons destinés à l'export :

Les échantillons présents dans le tableau ci-dessous sont ceux des semi-conserves d'anchois destinées à l'export présents au sein du laboratoire.

Tableau 7: Teneur en histamine pour les semi-conserves destinées à l'export.

Marinade	Code de l'échantillon	Taux d'histamine en ppm
Mariné à la provençale	F	43.42
Mariné à l'orientale	G	7
Mariné à l'huile	H	16.33
Mariné à l'ail et au persil	I	109.44
Filé d'anchois salé	J	38.44

Histamine dans les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardine.

En se basant sur les 3 classes du règlement 1441, on remarque que les échantillons sont tous satisfaisants et conformes même si l'échantillon I a une valeur bien plus élevée que les autres. Ces résultats sont dus à un stockage à une température entre 2 et 4°C ainsi que le processus de maturation. En effet, le poisson est mariné dans des fûts en couches alternées - anchois-sel - rangés en couronne, tête-bêche, le ventre tourné vers le bas, en veillant à ce qu'aucune bulle d'air ne soit emprisonnée. Enfin le sel, puis la saumure les recouvre entièrement. Les anchois sont pressés et mis en maturation pendant plusieurs mois, et régulièrement on retire la graisse qui surnage. C'est une méthode de conservation qui nécessite de l'anaérobiose pour empêcher toute multiplication bactérienne puis toute augmentation histaminique dans le produit.

Elle est applicable aussi pour les semi-conserves d'anchois marinées à l'huile. Donc il y'a moins de risque de contamination ceci confirme les résultats obtenus.

Fluorescence d'histamine :

D'après la figure ci-dessous, on remarque que la fluorescence en histamine de l'échantillon I est bien plus élevée par rapport aux autres échantillons. Ces résultats restent semblables (en une valeur satisfaisante) au résultat de l'échantillon D provenant de la grande surface.

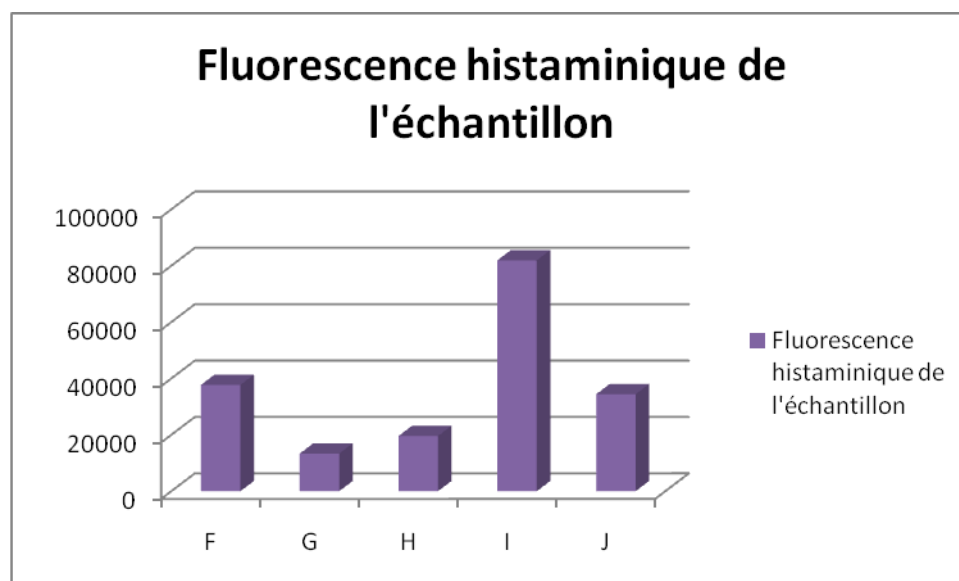


Figure 9: Fluorescence histaminique des semi-conserves destinées à l'export.

Donc on peut déduire que le persil est un ingrédient probablement contaminant des anchois car il ne subit pas un nettoyage efficace ou suffisant ce qui a engendré une prolifération bactérienne à l'origine de la transformation de l'histidine en histamine.

Conclusion générale :

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. Cependant, ce produit est fortement toxique.

L'objectif majeur de ce travail est de comparer la qualité marchande des produits destinés à l'export et ceux vendus dans le marché local dit dans les grandes surfaces. Cela en se basant sur un composant essentiel des poissons bleus : l'histidine.

C'est une amine biogène qui est majoritaire chez ce genre de produits halieutiques et qui à cause de la présence d'une contamination bactérienne et en particulier de l'enzyme histidine décarboxylase, se transforme en histamine un peu plus toxique.

Donc, on a pu déduire en travaillant sur deux produits différents à savoir les semi-conserves d'anchois et les conserves de sardines, que la qualité des produits destinés à l'export reste plus satisfaisante selon le règlement 1441 adopté.

En outre, on remarque une grande différence entre les valeurs des semi-conserves d'anchois qui restent bien supérieures à celles des conserves de sardines. Ceci est dû au traitement thermique (stérilisation) que les conserves subissent et qui empêche tout développement de contaminants.

On a pu également conclure que la présence de quelques ingrédients, dans les semi-conserves d'anchois, peut augmenter les risques la non-conformité du produit.

Cette contamination parfois n'est apercevable que lorsqu'un critère de conditionnement est altéré, en tenant compte de la température. Pour ce fait, elle ne doit pas dépasser 25°C pour les conserves de sardines de même elle ne doit pas être au dessous de 4°C pour les semi-conserves d'anchois, sinon le risque de la multiplication bactérienne augmente ainsi que l'intoxication due à l'ingestion d'un produit contaminé.

Références bibliographiques :

[1] : Manuel Qualité AgroAnalyses Maroc.

[2] : Rabani Adamou : Optimisation du Milieu Analytique pour le Dosage Spectrofluorimétrique de l'Histamine dans les Produits Halieutiques à l'aide de la Fluorescamine comme Sensibilisateur. (2008)

[3] : Nader Naciri : Fabrication des conserves de sardine. (2015)

[4] : Ministère de l'agriculture et la pêche maritime Rabat Maroc : La mer en chiffre. (2014, 2015, 2016)

[5] : Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail : Histamine.

[6] : Ifremer : Les principales méthodes de dosage de l'histamine.

[7] : RÈGLEMENT (CE) No 1441/2007 DE LA COMMISSION concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. (2007)