

N° d'ordre : 964

50376  
1992  
240-1

50376  
1992  
240-1

## THESE DE DOCTORAT

*présentée à*

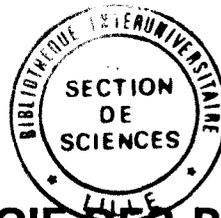
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

*pour l'obtention du grade de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE  
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
SPECIALITE : MICROBIOLOGIE

*par*

**Pierre MALLE**



## MICROBIOLOGIE DES POISSONS MARINS EVALUATION EXPERIMENTALE DE L'ALTERATION

soutenue le 7 Octobre 1992 devant la commission d'examen

### MEMBRES DU JURY

Mr	J.GUILLAUME	<i>Président</i>
Mr	J.L.JOUVE	<i>Rapporteur</i>
Mlle	C.LAHELLEC	<i>Rapporteur</i>
Mr	H.BELVEZE	<i>Rapporteur</i>
Mr	J.KREMBEL	<i>Examineur</i>
Mr	R.TAILLIEZ	<i>Examineur</i>

---

*annexes présentées dans le second volume*

à Christine,

*Ce travail a été réalisé au Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires (CNEVA Unité de Boulogne-sur-mer) en liaison avec l'Université de Lille I (Institut Agricole et Alimentaire de Lille).*

*Il a été effectué sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME, Professeur Emérite, Docteur Honoris Causa de l'Université de Gembloux, qui a dirigé l'Institut Agricole et Alimentaire de Lille durant de nombreuses années, et avec les conseils constants de Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ, Responsable du Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Je tiens à les assurer de toute ma gratitude.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur J.L. JOUVE, titulaire de la chaire d' H.I.D.A.O.A. de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, et à Mademoiselle le Docteur C. LAHELLEC, Directeur de Recherches au CNEVA et Directeur du Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire de Paris, de l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.*

*Je suis très sincèrement reconnaissant à Monsieur le Docteur H. BELVEZE, Administrateur Principal à la Commission des Communautés Européennes de Bruxelles, d'avoir manifesté beaucoup d'intérêt pour ce sujet et d'avoir aimablement accepté de juger la teneur des travaux.*

*Pour avoir accepté également de faire partie du jury, j'adresse des remerciements tout particuliers à Monsieur le Professeur KREMBEL, Professeur de Biochimie à l'Université de Lille I, dont j'ai apprécié les conseils.*

*Je tiens à remercier sincèrement Monsieur P. EB, Maître de Conférences au Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université des Sciences et Technologies de Lille et Directeur des Etudes de l'Institut Agricole et Alimentaire de Lille, pour sa collaboration amicale qui m'a été très précieuse.*

*Je suis reconnaissant à la Direction Générale du CNEVA des moyens dont j'ai disposé pour mener ces recherches, et j'exprime mes plus vifs remerciements à tous ceux qui y ont participé directement ou indirectement, plus particulièrement au personnel du CNEVA de Boulogne-sur-mer (Unité d'Etudes des Produits de la Pêche) et aux Scientifiques qui ont collaboré aux publications personnelles que je présente en annexes.*

*Enfin, que ceux dont le soutien ou l'affection ont été constants trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.*

## TABLE DES MATIERES

## **INTRODUCTION**

### **1ère partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>CH.1. Facteurs microbiologiques et biochimiques de l'altération du poisson</b>	<b>2</b>
1. Ecologie microbienne du poisson	2
1.1 Localisation des bactéries	2
1.2 Microflore et types respiratoires	3
1.3 Microflore et environnement	4
1.3.1 Eaux froides	
1.3.2 Eaux chaudes	
1.3.3 Autres paramètres	
1.4 Microflore dominante : <i>Pseudomonas</i> et genres proches	6
1.5 Notion de bactéries halophiles	7
1.6 Méthodologie analytique	8
2. Caractéristiques biochimiques du tissu musculaire	10
2.1 Variabilité de la composition	10
2.2 Caractéristiques de la fraction lipidique	11
2.3 Caractéristiques de la fraction azotée	12
<b>CH.2. Mécanismes de l'altération</b>	<b>15</b>
1. Evolution de la microflore	15
1.1 Microflore d'altération	15
1.2 Evolution dans les espèces des eaux froides et tempérées	16
1.3 Evolution dans les espèces des eaux chaudes	17
1.4 Incidences du délai précédant la mise en glace ou la congélation	18
2. Dégradation enzymatique et bactérienne	20
2.1 Autolyse	20
2.1.1 Enzymes musculaires	20
2.1.2 Enzymes digestives	22
2.2 Dégradation bactérienne	23
2.2.1 Pénétration des bactéries	23
2.2.2 Dégradation du tissu musculaire	23
<b>CH.3. Conséquences de l'altération</b>	<b>26</b>
1. Conséquences organoleptiques	26
2. Conséquences sur la qualité des produits transformés	31
2.1 Influence du nombre initial de microorganismes sur l'efficacité des traitements bactéricides	31
2.2 Influence des substances biologiques sur l'action bactéricide du fumage	32
2.3 Incidence technologique de la qualité de la matière première	34

## 2ème partie : MATERIELS ET METHODES

1. Méthodes chimiques	37
1.1 Dosage des amines volatiles	37
1.1.1 Méthode d'entraînement à la vapeur	37
1.1.2 Méthode de Conway	38
1.2 Dosage des amines biogènes	39
1.2.1 Principe	39
1.2.2. Matériels	39
a. Description du matériel HPLC	
b. Matériels divers	
c. Réactifs	
1.2.3 Méthodes	43
a. Extraction trichloracétique des amines biogènes du poisson	
b. Extraction et dansylation selon la méthode de MIETZ et KARMAS	
c. Extraction et dansylation selon une nouvelle méthode	
d. Purification de l'extrait dansylé commune à la méthode de MIETZ et KARMAS et à la nouvelle méthode.	
e. Protocole témoin	
2. Méthodes microbiologiques	46
2.1 Protocole d'étude de la réduction de l'oxyde de triméthylamine par diverses souches bactériennes	46
2.1.1 Souches bactériennes testées	46
2.1.2 Précultures	47
2.1.3. Incubation des milieux inoculés	47
2.1.4 Dosage de la TMA produite	47
2.2 Dénombrement des flores aérobies par la méthode d'inclusion	48
2.3 Mesures d'activités peptidasiques	49
2.3.1 Dégradation de substrats spécifiques	49
2.3.2 Dosage des chromogènes libérés	50
2.3.3 Etude de la compétition entre substrats	51
2.4 Test de réduction de l'oxyde de triméthylamine appliqué à l'appréciation de la qualité du poisson	52
2.4.1 Principe	52
2.4.2 Mesure de la réduction du TMAO	52
2.5 Mise au point d'une technique de filtration	54
2.5.1 Hydrolyse enzymatique de la suspension mère	54
2.5.2 Filtration de l'hydrolysate	55

2.6 Dénombrement de la microflore totale en épifluorescence	55
2.6.1 Principe	55
2.6.2 Réactifs	56
2.6.3 Matériel	56
2.6.4 Coloration	57
2.6.5 Dénombrement des bactéries	57
2.7 Appréciation de la qualité microbiologique par bioluminescence	59
2.7.1 Principe	59
2.7.2 Réactifs	60
2.7.3 Matériel	60
2.7.4 Mode opératoire	61

### **3ème partie : RESULTATS ET COMMENTAIRES**

1. Réduction de l'oxyde de triméthylamine par diverses souches bactériennes	62
1.1 Mise au point des techniques	62
1.2 Etude quantitative de la production de TMA par diverses souches bactériennes	65
2. Evolution des substances de dégradation	72
2.1 Amines volatiles	72
2.1.1 Azote basique volatil total	72
2.1.2 $P = \text{TMA/ABVT} (\%)$	73
2.2 Amines biogènes	80
2.2.1 Mise au point du gradient	80
2.2.2. Détermination des temps de rétention	81
2.2.3 Intérêt de l'étape de purification	82
2.2.4 Comparaison de la méthode de MIETZ et KARMAS et de la "nouvelle méthode"	83
2.2.5 Mise en oeuvre d'un étalon interne	84
2.2.6 Corrélation : concentration - surface de pics	88
2.2.7 Optimisation de la phase d'extraction trichloracétique	89
2.2.8 Exploitation de la "nouvelle méthode" sur le poisson	91
3. Evaluations d'activités microbiennes	97
3.1 Activités peptidasiques	97
3.1.1 Analyse des résultats obtenus avec les 6 substrats	97
3.1.2 Expérimentation complémentaire	100
3.2 Réduction de l'oxyde de triméthylamine et appréciation de la qualité du poisson	103
3.2.1 Mise au point d'une technique	103
3.2.2 Incidence de la température d'incubation	103
3.2.3 Evolution des flores impliquées dans la réaction	104

4. Application au poisson de méthodes rapides de dénombrement	105
4.1 Dénombrement de la microflore totale en épifluorescence	105
4.1.1 Mise au point d'une technique de filtration	105
4.1.1.1 Mise au point d'un traitement enzymatique	
4.1.1.2 Effet bactéricide du mélange enzymatique	
4.1.2 Comparaison des dénombrements en épifluorescence et en milieu gélosé	108
4.2 Appréciation de la qualité microbiologique par bioluminescence	111
4.2.1 Etude de l'évolution de l'ATP somatique dans le poisson	112
4.2.2 Corrélation entre les mesures de bioluminescence et les dénombrements en milieu gélosé	116
5. Etude comparative de tests d'évaluation qualitative du poisson	120
5.1 Poissons entiers	120
5.2 Filets	124
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>130</b>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

ANNEXES présentées dans le second volume :

annexe 1 : Caractéristiques du "fish soluble".

annexe 2 : Mise au point d'une "nouvelle méthode" de dosage des amines biogènes en HPLC : figures I à IX.

annexe 3 : Résultats du dosage des amines biogènes par la "nouvelle méthode" : tableaux I à IV.

*publications personnelles :*

annexe 4 : Etude expérimentale de l'action antiseptique de la fumée sur *Escherichia coli*.

annexe 5 : Le fumage du saumon : influence de la qualité de la matière première sur l'action antiseptique de la fumée.

annexe 6 : Determination of the quality of fish by measuring trimethylamine oxide reduction.

annexe 7 : Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation.

annexe 8 : Teneur en azote basique volatil total du tissu musculaire des poissons marins.

annexe 9 : A new chemical criterion for the quality control of fish : trimethylamine / Total Volatile Basic Nitrogen ( :

annexe 10 : Rapid determination of fish freshness by evaluation of ATP degradation reflected in K value.

## INTRODUCTION

Le poisson fait partie des denrées alimentaires les plus fragiles et les plus périssables. Dans la logique du développement universel de l'exploitation des ressources halieutiques, la multiplication des opérations commerciales relatives au poisson amplifie la nécessité de pouvoir apprécier de manière fiable la fraîcheur. Pour que le contrôle de la qualité aux différents niveaux de la distribution soit efficace, il convient de disposer de méthodes performantes d'analyses, et le même besoin se manifeste dans le domaine de la transformation où le choix de la matière première est essentiel.

La recherche de méthodes d'analyses microbiologiques et chimiques adaptées au poisson revêt un caractère d'autant plus actuel qu'elle s'insère aujourd'hui dans un cadre européen et que les décisions relatives au commerce des produits alimentaires devront pouvoir se fonder sur des critères reconnus au niveau communautaire.

Les premiers changements survenant *post mortem* dans le poisson sont dus aux enzymes tissulaires et digestives, mais c'est ensuite le développement bactérien qui est le responsable essentiel de la dégradation du poisson, il constitue par conséquent l'axe fondamental des travaux que nous avons conduits sur l'altération. Celle-ci mettant en jeu un ensemble de processus microbiologiques, chimiques et physiques, plusieurs approches peuvent donc être engagées pour évaluer le niveau d'altération : sensorielle, microbiologique et chimique.

Les méthodes sensorielles d'appréciation de l'état de fraîcheur sont des méthodes traditionnelles qui gardent aujourd'hui tout leur intérêt, toutefois les difficultés relatives à la méthodologie ou à l'interprétation ont conduit de nombreux chercheurs à mettre au point d'autres méthodes. On dispose donc de méthodes microbiologiques et chimiques, mais elles sont insuffisantes dans un certain nombre de cas, ce qui justifie la démarche que nous avons engagée.

Nous avons limité notre propos aux bactéries d'altération, les microorganismes pathogènes n'étant pas l'objet de ces travaux. Les données microbiologiques exposées et les expérimentations effectuées s'appliquent au poisson marin, dont la microflore a une composition différente de celle des poissons d'eau douce.

Après une étude des facteurs et des mécanismes de l'altération, nous avons utilisé des méthodes d'analyses existantes et optimisé l'exploitation de leurs résultats. Nous avons d'autre part mis au point de nouvelles méthodes dans le but de mesurer des activités microbiennes ou de doser des substances de dégradation, et nous avons aménagé des méthodes rapides de dénombrement pour les rendre applicables au poisson. Une estimation comparative de l'évaluation qualitative du poisson par un ensemble de méthodes a ensuite été effectuée.

PREMIERE PARTIE :  
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

# CHAPITRE I

## FACTEURS MICROBIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE L'ALTERATION DU POISSON

Les microorganismes étant les principaux responsables de l'altération, nous avons choisi d'étudier tout d'abord l'écologie microbienne du poisson, puis la biochimie du tissu musculaire qui constitue le substrat permettant la croissance bactérienne.

### 1. ECOLOGIE MICROBIENNE DU POISSON

Les bactéries du poisson vivant sont concentrées dans certaines régions de l'organisme. Elles ont des caractéristiques qui sont essentiellement liées à l'environnement dans lequel il évolue.

#### 1.1. Localisation des bactéries

Le muscle du poisson vivant est normalement stérile (PROCTOR et NICKERSON, 1935), cette observation s'applique aux poissons marins qui sont l'objet de nos travaux, il faut toutefois savoir que le muscle des poissons d'eau douce est fréquemment contaminé (SOUDAN et al., 1965). Lorsque le poisson évolue dans son milieu naturel, lorsqu'il respire et se nourrit, les microorganismes de l'eau sont adsorbés par le mucus de la peau, par les branchies et par l'intestin. Avant la mort d'un poisson marin, les bactéries se trouvent donc dans les parties du corps en contact avec l'eau, notamment le mucus et les branchies, et dans le tractus digestif, la cavité abdominale constituant la source de contamination la plus importante.

Chez le poisson vivant, la charge microbienne des différentes zones contaminées de l'organisme est très variable:

- Les dénombrements en surface vont généralement de  $10^2$  à  $10^5$  par  $\text{cm}^2$  selon SHEWAN (1962), parfois jusque  $10^6$  par  $\text{cm}^2$  selon SKOVGAARD (1979). La contamination de la peau est directement liée à l'environnement, ainsi des charges bactériennes très réduites de 10 à 100 par  $\text{cm}^2$  ont pu être décelées sur des poissons capturés dans des eaux froides et propres (HUSS et al., 1974; LISTON, 1980), des charges élevées sur des poissons provenant d'eaux polluées ou de régions chaudes tropicales (SHEWAN, 1977).

- La charge bactérienne des branchies est comprise entre  $10^3$  et  $10^7$  par g. (SHEWAN, 1962).

- Celle de l'intestin est plus variable encore puisque les dénombrements sont compris entre 10 et  $10^8$  par g. de contenu intestinal. La charge de l'intestin est liée à la fois à l'environnement et à l'alimentation, le tractus digestif peut d'ailleurs devenir quasiment stérile dans la période de jeûne qui précède la fraie (SOUDAN et al., 1965).

## 1.2. Microflore et types respiratoires

La localisation des bactéries telle qu'elle vient d'être décrite concerne le poisson vivant. Après sa mort elles envahissent le muscle à partir de ces foyers bactériens dont la nature de la flore conditionne celle du tissu musculaire.

La microflore de surface des poissons marins fraîchement pêchés dans des eaux froides ou tempérées est dominée par des bactéries à Gram négatif, aérobies strictes ou aérobies-anaérobies facultatives, appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Moraxella/Acinetobacter*, *Flavobacterium/Cytophaga* et *Vibrio* (GEORGALA, 1957; SHEWAN, 1971; HOBBS and HODGKISS, 1982).

La flore intestinale contient une proportion plus élevée d'anaérobies facultatifs ou stricts (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Clostridium*) compte-tenu du micro-environnement particulier que constitue le tractus digestif (SHEWAN, 1977). Dans l'altération du poisson les bactéries dominantes sont des aérobies strictes (SKOVGAARD, 1979), ce sera une donnée essentielle dans la compréhension du processus d'altération. Quelques unes de ces bactéries aérobies strictes comme les *Pseudomonas* sont reconnues capables de se multiplier également dans les conditions d'anaérobiose du muscle en voie d'altération en fournissant elles-mêmes l'oxygène (SKOVGAARD, 1979), par exemple par dénitrification ou par réduction de l'oxyde de triméthylamine.

### 1.3. Microflore et environnement

Il y a plus de 3000 espèces de poissons différentes commercialisées à travers le monde, et si l'on peut penser que la diversité des populations bactériennes est liée à la diversité des espèces de poissons, il n'y a en fait qu'une faible incidence de l'espèce sur la nature et le nombre de bactéries initialement présentes (SOUDAN et al., 1965; WARD et BAJ, 1988). Par contre la composition de la flore bactérienne du poisson est en relation directe avec les facteurs de l'environnement. La microflore initiale du poisson reflète la contamination de l'eau d'origine et on retrouve approximativement dans le poisson les espèces bactériennes identifiées dans les eaux (SAINCLIVIER, 1983). Elle est liée à la température, celle-ci étant fonction de la zone de pêche et de la saison, elle dépend également de la salinité et de la concentration en oxygène dissous (HORSLEY, 1977).

Concernant la microbiologie du poisson, les travaux de SHEWAN (1971) font référence (tableau 1), mais il est essentiel de préciser que cette composition de la flore ne peut s'appliquer universellement à tous les poissons, il faut au minimum prendre en compte la température des eaux d'origine.

	-----	
	( 1960	: 1970 )
-----	-----	-----
( <i>Pseudomonas</i>	( 16	: 22 )
( <i>Moraxella/Acinetobacter</i>	( 23	: 41 )
( <i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	( 27	: 10 )
( <i>Coryneformes</i>	( 18	: 18 )
( <i>Micrococcus</i>	( 4	: 1 )
( <i>Vibrio</i>	( 1	: < 1 )
( <i>Autres</i>	( 11	: 7 )
-----	-----	-----

Tableau 1 (SHEWAN, 1971)  
Flore bactérienne du poisson frais de la Mer du Nord (en % de la flore totale)  
Synthèse de travaux réalisés en 1960 et 1970.

SHEWAN (1977) a rassemblé des données d'origines diverses montrant que la microflore du poisson pêché dans des eaux froides ou tempérées (0°C à 15°C - Mer du Nord, Norvège et Canada) est dominée par des psychrotrophes et des germes Gram négatif (tableau 1), alors que dans les eaux tièdes (20°C à 30°C - Océans Indien et Pacifique et quelques eaux Australiennes) ce sont les Gram positif mésophiles qui prédominent (*Micrococcus*, *Bacillus*, *Coryneformes*). 5% seulement de la flore des poissons de la Mer du Nord peuvent se développer à 37°C contre 55% de celle des poissons capturés au large des côtes Mauritanienues.

### 1.3.1. Eaux froides:

Pour les poissons provenant des eaux froides ou tempérées, ce qui est le cas de la région Nord-Ouest de l'Europe, il importe de bien connaître la physiologie des bactéries psychrotrophes et leur rôle dans la dégradation du poisson: cela est approfondi ultérieurement.

Dans la bibliographie, des confusions apparaissent fréquemment dans l'emploi des termes "psychrophile" et "psychrotrophe". La capacité que possèdent certains microorganismes de croître aux basses températures est connue depuis les travaux de FORSTER (1887). Les bactéries pouvant se développer à 0°C ont reçu le qualificatif de "psychrophile": "qui aime le froid" (psukhros :froid, philein: aimer), mais de nombreux désaccords subsistent sur les limites de leur spectre thermique (MORITA, 1975).

La signification étymologique du terme "psychrotrophe" est la suivante: "qui se nourrit aux basses températures" (psukhros: froid, trophein: nourrir), intrinsèquement le terme psychrotrophe regroupe ainsi tous les microorganismes qui peuvent se développer au froid. Toutefois la définition est trop générale et il convient de préciser les conditions d'incubation: temps, température, milieu (LAHELLEC et COLIN, 1980).

Ces derniers auteurs font référence aux définitions de CATSARAS et GREBOT (1969) qui ont écrit: "nous avons considéré pour notre part comme psychrotrophes les microorganismes qui se multiplient activement aux températures de réfrigération couramment utilisées (0°C, +6°C), leur température optimale de croissance étant généralement plus élevée: entre 10°C et 20°C, ou davantage parfois, et comme psychrophiles ceux qui, non seulement cultivent aux basses températures, mais encore les exigent, et ont leur optimum aux environs de 0°C". Ces définitions soulignent les exigences nuancées des psychrotrophes qui se multiplient aux basses températures mais également aux températures moyennes. La notion de psychrophiles y est très restrictive puisqu'ils exigent impérativement une température voisine de 0°C pour croître et peuvent être détruits par une température supérieure. Face à cette acception des termes psychrophile et psychrotrophe, on en trouve de différentes dans la littérature, avec parfois une confusion totale des 2 termes, ou souvent une définition plus large des psychrophiles. Les définitions seront étudiées à la lumière de nos résultats. Il est à noter que les courbes de croissance des psychrophiles et des psychrotrophes présentent des similitudes, avec une phase de latence plus longue que celle des mésophiles.

### 1.3.2. Eaux chaudes:

Dans les poissons des eaux chaudes (Indes, Côtes Sud Afrique, Australie, Adriatique...) le pourcentage de mésophiles (*Bacillus*, *Micrococcus*, Coryneformes) est plus élevé. La flore dominante du poisson fraîchement pêché dans les eaux chaudes d'Australie correspond aux membres du genre *Micrococcus* (GILLESPIE et MACRAE, 1975).

### 1.3.3. Autres paramètres

Parallèlement à l'environnement naturel proprement dit, on peut évoquer le micro-environnement que constitue le mucus pour les bactéries des surfaces externes du poisson. La présence de mucus et sa nature sont déterminantes car il contient chez certaines espèces des substances possédant une activité antimicrobienne (lysozyme, anticorps), notamment chez les poissons plats (MURRAY et FLETCHER, 1976 ; SHEWAN, 1977).

Parmi les nombreux paramètres affectant la charge microbienne, on peut retenir ici ceux liés à l' "environnement" du poisson lors de la pêche ou immédiatement après la pêche. Ainsi la méthode selon laquelle les poissons sont récoltés est souvent mentionnée comme influençant le nombre et les espèces de bactéries présentes. Le poisson de chalut a une charge bactérienne 10 à 100 fois plus élevée que le poisson de ligne, différence qui peut être attribuée éventuellement au dragage du fond, mais surtout à la compaction du poisson qui cause une dispersion du contenu intestinal (SHEWAN, 1949). Les conditions de manipulation et de transport interviennent également dans la composition de la microflore initiale du poisson, en modifiant la charge bactérienne susceptible d'évoluer pendant le stockage (REAY, 1949; SHEWAN, 1961).

### 1.4. Microflore dominante : Pseudomonas et genres proches

Pseudomonas: Les *Pseudomonas* constituant la flore dominante des poissons des eaux froides et tempérées, nous nous référerons à différents groupes du genre, ce qui implique d'évoquer la définition de ces groupes. La classification des *Pseudomonas* s'est élaborée de manière hésitante compte-tenu du faible nombre de caractères biochimiques traditionnels comme ceux rencontrés chez les *Enterobacteriaceae*. Se référant à SHEWAN, BUTTIAUX et al. (1974) distinguent quatre groupes selon la pigmentation et le mode de dégradation du glucose:

- I. groupe fluorescent et oxydant le glucose,
- II. groupe non pigmenté et oxydant le glucose,
- III. groupe non pigmenté et alcalinisant,
- IV. groupe non pigmenté et inactif.

Des recherches ultérieures sur le pouvoir d'assimilation des espèces vis à vis de nombreux substrats ont fait progresser la classification, et ce sont des études génétiques d'hybridation qui ont permis d'établir la classification actuelle dans laquelle figurent 30 espèces bien répertoriées (STANIER et al, 1966). Il reste toutefois un grand nombre d'espèces sans caractères de reconnaissance bien précis, 62 sont mentionnées dans le Bergey's manual (1984).

LEVIN (1972) a différencié les *Ps. putrefaciens* sur la base de différents GC %. LEE et al. (1973) ont proposé de transférer les *Pseudomonas* ayant des GC % de l'ordre de 40 à 50, incluant les souches de *Pseudomonas putrefaciens* de bas GC %, dans le genre *Alteromonas*. Désormais le GC % admis pour les *Pseudomonas* est compris entre 58 et 70.

Le groupe I est le plus important, comprenant notamment une espèce pathogène pour l'homme, *Pseudomonas aeruginosa*, et des espèces saprophytes, dont: *Ps. fluorescens* et *Ps. putida*. C'est dans le groupe IV qu'est classé *Ps. putrefaciens*.

La classification des *Pseudomonas* reste évolutive, des travaux japonais (OKUZUMI et al., 1973) révèlent une grande similitude entre les propriétés biologiques générales des *Ps. I* et *II*, la différenciation reposant sur la seule pigmentation fluorescente, et conduisent à proposer le regroupement des *Ps. I* et *II*. Les *Ps. III* et *IV* seraient classés différemment, ce qui conduirait aux distinctions suivantes: *Ps. I/III*, *Ps. III/IV - NH*, *Ps. III/IV - H*, le dernier étant notamment caractérisé par la production d'H<sub>2</sub>S et la réduction des nitrates.

Ainsi, selon les dates de publication des travaux étudiés, les *Pseudomonas* sont classés différemment.

**Genres proches:** Le genre *Alteromonas* a donc été créé pour regrouper des *Pseudomonas* de GC % très différents. Il s'agit de bactéries proches des *Pseudomonas* mais qui exigent de l'eau de mer pour leur croissance, ce sont des habitants communs des eaux littorales et océaniques (LECLERC et MOSSEL, 1989).

La position du genre *Flavobacterium* est susceptible d'être revue car il existe de fortes similitudes biochimiques et chimiotaxonomiques entre les *Flavobacterium* et les *Cytophaga* (LECLERC et MOSSEL, 1989). Ceci a conduit de nombreux auteurs à dénombrer globalement les bactéries appartenant aux deux genres.

### 1.5. Notion de bactéries halophiles

Si un grand nombre de microorganismes est relativement indifférent à la pression osmotique, de nombreuses bactéries marines, adaptées à un milieu naturel contenant 35g de chlorure de sodium par litre, y sont très sensibles. Ces bactéries appelées halophiles doivent être cultivées dans des milieux contenant au moins 10% de sel (LECLERC et MOSSEL, 1989).

En général les Gram négatif sont plus sensibles à une réduction de l'aw (SAINCLIVIER, 1985). Les bactéries non halophiles ont un taux de croissance maximal pour des aw de l'ordre de 0,980 à 0,997, qui diminue ensuite linéairement. Les bactéries halophiles ont des exigences spécifiques en ions sodium et peuvent encore proliférer lorsque l'aw est voisin de 0,75. Les halophiles modérés ou tolérants ont une croissance optimale lorsque l'aw est voisin de 0,95 mais tolèrent à la fois des aw de 0,99 et des aw voisins de ceux qu'exigent les halophiles stricts. Pour ces derniers, appelés aussi halophiles obligatoires, une concentration élevée en NaCl est indispensable, leur optimum de croissance correspond à un aw de 0,83 (TROLLER et al., 1978). L'altération bactérienne la plus étudiée est celle du poisson fortement salé, il s'agit du "rouge de la morue" impliquant les genres *Halobacterium* et *Halococcus*.

Parmi les *Pseudomonas* isolés du poisson, les besoins en sel sont divers: les *Ps. I* et *II* ne sont pas halophiles, ainsi que les *Ps. III/IV - NH*, le groupe halophile correspond aux *Ps. III/IV - H*. La majorité des *Moraxella* et *Vibrio* montre également une tendance halophile (HORIE et al., 1972).

#### 1.6. Méthodologie analytique

La méthodologie analytique doit être soigneusement étudiée pour comparer les données bibliographiques. Se superposant aux facteurs de variabilité de la microflore énoncés, il faut considérer l'importance des répercussions qualitatives et quantitatives des choix du milieu de culture et de la température d'incubation. Ceci vient dans le prolongement de l'incidence du facteur température évoqué précédemment en liaison avec l'origine des poissons. Des travaux effectués sur la flore bactérienne de la peau du cabillaud permettent de comparer les pourcentages obtenus pour les principaux genres avec des températures d'incubation de 0°C et 20°C (tableau 2 : GEORGALA, 1957).

( températures d'incubation	: 20°C	: 0°C	)
( <i>Pseudomonas</i>	: 52,16	: 60,60	)
( <i>Acinetobacter</i>	: 24,16	: 34,30	)
( <i>Corynebacterium</i>	: 11,50	: 2	)
( <i>Flavobacterium</i>	: 8,50	: 1,20	)
( Autres (dont <i>Micrococcus</i> et <i>Vibrio</i> )	: 3,60	: 1,80	)

Tableau 2 (GEORGALA, 1957)

Composition de la flore bactérienne de la peau du cabillaud en % (non éviscéré, non lavé, non glacé)  
Souches isolées de boîtes de PCA incubées à 0°C ou 20°C.

Des travaux ultérieurs (VAN DEN BROEK et al., 1984) ont déterminé sur les mêmes filets de poisson les niveaux de flore aérobie respectifs pour des températures d'incubation de 20°C, 30°C et 37°C (tableau 3).

UFC/g	20°C (%)	30°C (%)	37°C (%)
<10 <sup>5</sup>	3	3	58
10 <sup>5</sup> . 10 <sup>6</sup>	20	41	35
10 <sup>6</sup> . 10 <sup>7</sup>	59	48	6
10 <sup>7</sup> . 10 <sup>8</sup>	17	8	1
>10 <sup>8</sup>	1	0	0

Tableau 3. (VAN DEN BROEK et al., 1984)  
Flore aérobie totale obtenue à 20°C, 30°C et 37°C. (UFC par g. de filet de poisson).

L'auteur explique les dénombrements plus élevés à une température de 20°C par la nature de la flore de contamination qui est liée à l'origine du poisson. Dans ces expérimentations, il provenait de la Mer du Nord où les températures de l'eau fluctuent entre 4°C et 20°C. Les dénombrements à 30°C sont globalement plus faibles qu'à 20°C, et, les dénombrements à 37°C sont nettement inférieurs à ceux obtenus à 20 ou 30°C, ces résultats confirment ceux de SHEWAN (1961) obtenus sur du poisson provenant des eaux nordiques. Les bactéries mésophiles présentes à la surface du poisson et dans l'organisme proviennent pour la plupart d'animaux à sang chaud ou de l'homme et sont transférés soit par contact direct, soit par les eaux côtières contaminées par les eaux d'égout non traitées (AYRES, 1975).

Ainsi les conditions de culture des microorganismes sont particulièrement déterminantes dans le cas des poissons car les flores sont hétérogènes et varient de manière très sensible en fonction des origines. Or les méthodologies sont diverses dans la bibliographie étudiée, cet aspect des choses doit être largement pris en compte dans la discussion des résultats.

## 2. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DU TISSU MUSCULAIRE

Les considérations d'ordre biochimique sont limitées aux objectifs de nos travaux: ne sont détaillées que les caractéristiques des constituants intervenant directement ou indirectement dans la dégradation. En effet, sont plus directement impliqués les composés azotés dont le catabolisme génère des molécules proposées comme critères chimiques d'altération. Sont différemment impliqués les éléments de la fraction lipidique dont la variabilité qualitative et quantitative affecte la composition du substrat livré aux bactéries, avec des conséquences à la fois chimiques, microbiologiques et organoleptiques. Les glucides seront traités ultérieurement dans le cadre de la dégradation autolytique. Il faut simplement noter que le taux moyen de glycogène musculaire du poisson est du même ordre de grandeur que celui des mammifères, à savoir environ 1g/100g, mais les conditions usuelles de pêche et la mort par asphyxie le réduisent considérablement. D'autre part seules les caractéristiques véritablement spécifiques des poissons sont développées.

### 2.1. Variabilité de la composition

L'étude de la dégradation suppose une bonne connaissance du substrat qui sera dégradé par les enzymes et les bactéries. Or chez les poissons, la grande variabilité de la composition du muscle est une notion essentielle à considérer avant d'aborder les processus d'altération.

Tout d'abord les poissons sont regroupés dans une classe zoologique hétérogène comprenant à la fois les Sélaciens et les Téléostéens qui sont phylogénétiquement et physiologiquement très éloignés. Le terme "poisson" recouvre donc des réalités zoologiques très diverses. La composition chimique du poisson varie beaucoup d'une espèce à l'autre, et chez un même individu elle varie selon les muscles, selon l'âge, le cycle sexuel, l'alimentation, l'environnement et la saison.

variations anatomiques: Les muscles "rouges" commandent les inflexions des muscles latéraux et assurent donc les déplacements du poisson. De ce fait, ils sont fortement irrigués et contiennent plus de lipides et moins de protéines que les muscles blancs. Dans certaines familles, notamment chez les Pleuronectidés, ils sont très réduits, alors qu'ils sont développés dans les espèces pélagiques, notamment chez les Clupéidés et les Cyprinidés. Ils peuvent occuper jusqu'au quart du volume total des muscles chez certains Scombridés. La proportion relative des muscles blancs et rouges évolue au cours de la croissance, et chez les poissons plats elle peut varier entre les 2 filets du même individu (SAINCLIVIER, 1983). La composition du tissu musculaire n'est donc pas uniforme.

variations liées au cycle sexuel: Les modes de reproduction sont très divers chez les poissons, mais à l'état adulte ils sont tous soumis à une évolution sexuelle cyclique qui a un retentissement important sur la composition des muscles. A titre d'exemple, le cycle sexuel des Téléostéens illustre la succession de phases très déterminantes sur la constitution biochimique du muscle: la prématuration qui est une période de nourriture abondante et d'accumulation de réserves, la maturation où s'effectue la croissance des gonades au détriment des réserves, la ponte qui nécessite une dépense d'énergie intense alors qu'elle est précédée d'une période de jeûne, et la reconstitution qui peut être définie comme une régénération avant le cycle suivant. Ainsi les réserves lipidiques atteignent leur seuil minimal à la fin de la ponte. L'ampleur de la mobilisation des lipides pour assurer l'exceptionnelle dépense d'énergie liée à la reproduction est une caractéristique des poissons. Corrélativement, on constate des variations importantes de la teneur en eau des muscles, et il a été démontré chez le saumon que tous les constituants sont touchés (IDLER et al., 1959).

variations liées à l'alimentation: En période d'alimentation copieuse, on observe d'abord une augmentation de la teneur en protéines du tissu musculaire puis une augmentation de la teneur en lipides. Le poisson peut connaître des périodes de jeûne plus ou moins complet lié à la ponte, aux migrations ou à la pénurie d'aliments. Ainsi les espèces qui se nourrissent de plancton, comme le hareng, vont présenter des variations saisonnières puisque la production de plancton est étroitement liée à la saison. L'impact de l'alimentation sur la composition n'est pas seulement quantitatif, il a été démontré que la nature des huiles est liée au type de nourriture consommée.

## 2.2. Caractéristiques de la fraction lipidique

La lecture du tableau 4 (MURRAY et BURT, 1969) permet de constater que la fraction lipidique subit les variations les plus importantes.

espèce		eau	lipides	protéines
		(%)	(%)	(%)
cabillaud	<i>Gadus morrhua</i>	78.83	0,1- 0,9	15,0-19,0
anguille	<i>Anguilla anguilla</i>	60.71	8,0-31,0	14,4
hareng	<i>Clupea harengus</i>	60.80	0,4-22,0	16,0-19,0
carrelet	<i>Pleuronectes</i>			
	<i>platessa</i>	81	1,1- 3,6	15,7-17,8
saumon	<i>Salmo salar</i>	67-77	0,3-14,0	21,5
thon	<i>Thunnus sp.</i>	71	4,1	25,2

Tableau 4. Composition chimique du tissu musculaire de diverses espèces de poissons

Les variations des teneurs en eau et en lipides sont liées, la somme de ces constituants représentant environ 80% du filet du poisson. Les teneurs des muscles en matières grasses permettent de distinguer les poissons dits "maigres" qui fixent électivement leurs réserves lipidiques dans le foie, les teneurs des muscles en lipides étant de l'ordre de quelques grammes pour 100g, et les poissons dits "gras" qui les fixent essentiellement dans les muscles où ils peuvent atteindre, voire dépasser 25%, avec des dépôts secondaires sous cutanés et dans la cavité abdominale (TREMOLIERES, 1980). Citons parmi les poissons maigres la majorité des Gadidés (cabillaud, lieu noir, églefin, merlu, merlan, ...), les raies, certains Pleuronectidés comme le carrelet, etc... Les poissons gras les plus représentatifs sont le hareng, l'anchois et la sardine (Clupéidés), le maquereau et le thon (Scombridés), le saumon, l'anguille, etc... Une série intermédiaire est proposée sous le qualificatif de "semi-gras", ceux-ci s'apparentent aux poissons "maigres" et accumulent leurs graisses dans le foie mais peuvent également les stocker dans les muscles en période de nourriture abondante avec des teneurs de 2 à 5g pour 100g de muscle. Cette notion ne correspond pas à une définition simple et n'est pas admise par tous, elle correspond toutefois à une réalité intermédiaire et permet d'y inclure des espèces difficiles à classer dans les poissons maigres ou gras, comme la dorade, le rouget barbet, le turbot, la sole, le flétan, le mullet, etc...

Outre la grande variabilité de sa composition, la fraction lipidique des poissons se caractérise par une proportion importante d'acides gras polyinsaturés, et de ce fait les lipides des poissons ont une fluidité telle qu'on emploie généralement le terme d'huiles. De nombreux acides gras ont 5 à 6 doubles liaisons alors que ceux des mammifères ont rarement plus de 2 doubles liaisons (STANSBY et HALL, 1967). La présence permanente d'un petit pourcentage d'acides gras libres dans les huiles de poisson s'explique par l'existence de lipases très actives dans les tissus, ces acides libres augmentent le risque déjà élevé d'oxydation de la fraction lipidique. Le rancissement des huiles de poisson constitue un risque organoleptique majeur pendant la conservation, particulièrement lorsque le développement microbien est inhibé par la congélation.

### 2.3. Caractéristiques de la fraction azotée

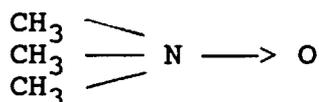
Les protéines constituent la part essentielle des matières azotées du poisson, mais le taux de composés azotés non protéiques est relativement important dans le muscle des poissons, jusque 18% de l'azote total chez les Téléostéens, plus de 30% chez les Sélaciens. La composition de la fraction azotée non protéique est spécifique, et certains de ses constituants sont impliqués de manière déterminante dans la dégradation.

- les protéines: Traditionnellement les protéines sont regroupées en 3 classes selon leur solubilité dans des solutions de force ionique croissante. La première correspond aux protéines extracellulaires qui sont insolubles dans les solutions salines. La seconde est la fraction myofibrillaire qui n'est soluble que dans des solutions de force ionique élevée, elle comprend les protéines dites de structure qui constituent la majeure partie des protéines intracellulaires. La troisième contient les protéines sarcoplasmiques qui sont solubles dans les solutions de faible force ionique et même hydrosolubles, ces dernières sont spécifiques: le caractère spécifique de la fraction myogène est exploité pour identifier les filets de poisson en isoélectrofocalisation.

Seule la première classe suscite un développement dans le cadre de nos travaux. Les teneurs en tissu conjonctif du poisson et de la viande diffèrent de manière significative: la proportion de protéines extracellulaires qui est de 17% chez les Mammifères est inférieure à 10% chez les Sélaciens et de l'ordre de 3% chez les Téléostéens. Cette faible teneur du muscle de poisson en protéines de soutien a des conséquences sur la fermeté de la chair et son évolution au cours de la conservation, caractère qui sera pris en compte dans l'appréciation organoleptique. Il est à noter d'autre part que la texture spécifique de la chair (fibreuse, farineuse...) est liée à la composition de la fraction azotée protéique.

- la fraction azotée non protéique: Les constituants de la fraction azotée non protéique participent de manière déterminante à la saveur propre de l'espèce. C'est le cas notamment de l'oxyde de triméthylamine qui, réagissant avec la fraction lipidique, donne des composés responsables du "goût de poisson".

\* l'oxyde de triméthylamine: L'oxyde de triméthylamine (TMAO) se définit chimiquement comme une aminoxyde, c'est à dire une amine tertiaire avec une liaison dative sur un atome d'oxygène:



C'est un composé caractéristique majeur de la fraction azotée non protéique dans les espèces marines où l'on peut observer les teneurs les plus faibles chez les poissons plats, inférieures à 600 mg pour 100 g de muscle, des teneurs intermédiaires chez les Gadidés, jusque 1000 mg pour 100 g, et les teneurs les plus élevées chez les Sélaciens, jusque 1500 mg pour 100 g (YAMADA, 1967; HARADA, 1975). Le TMAO peut être décelé dans les espèces dulcaquicoles, mais à des taux plus faibles, inférieurs à 100 mg pour 100 g. La teneur en TMAO est assez constante pour une espèce donnée, elle dépend toutefois de la saison, de la zone de pêche, de la nourriture, et augmente avec l'âge de l'individu (SOUDAN et al., 1965).

**\* l'urée:** Au lieu d'être éliminée par l'organisme comme chez les Téléostéens, l'urée s'accumule dans les tissus chez les Sélaciens (READ, 1968). La présence de ce composé à des concentrations très élevées est responsable des hautes teneurs en ammoniac de ces poissons.

**\* l'ammoniac:** L'ammoniac est un constituant normal du muscle des poissons vivants. Compte-tenu de leurs métabolismes différents, les Sélaciens et les Téléostéens n'ont pas les mêmes teneurs en ammoniac, celles ci évoluent de manière très différente au cours de l'altération, en raison notamment de la dégradation de l'urée chez les Sélaciens.

**\* les acides aminés:** Le taux individuel des acides aminés libres varie selon l'espèce mais aussi selon la nourriture et le cycle sexuel. Ils représentent une part non négligeable de la fraction azotée non protéique. Le poisson se caractérise par des teneurs plus élevées que la viande en lysine et en acides aminés soufrés: cystine, cystéine, méthionine. La production d'histamine issue de la décarboxylation de l'histidine par voie microbienne a été l'objet de nombreux travaux. L'histidine se rencontre à des taux élevés dans les espèces actives à chair rouge (maquereau, thon). L'histidine libre sera catabolisée selon deux voies dans le muscle de poisson, par autolyse (enzymes tissulaires) et par action d'une histidine décarboxylase bactérienne.

**\* la triméthylamine:** La teneur en TMA est très faible dans le poisson frais, de l'ordre de 0,2 mg pour 100 g de muscle blanc, et de 2 à 3 mg pour 100 g de muscle rouge dans lequel a été décelé un enzyme capable de réduire le TMAO en TMA (KAWABATA, 1953).

## CHAPITRE 2

### MECANISMES DE L'ALTERATION

L'évolution de la microflore spécifique du poisson est une composante essentielle du processus d'altération qui justifie un développement particulier. Les premières phases de ce processus intervenant après la mort résultent de l'autolyse, les mécanismes de dégradation purement enzymatiques sont donc décrits avant les mécanismes de dégradation bactérienne.

#### 1. EVOLUTION DE LA MICROFLORE

Les différences de composition de la microflore des poissons provenant d'une part des eaux froides et tempérées, d'autre part des eaux chaudes, conduisent à prévoir des évolutions différentes lors de la conservation, et il est démontré que de nombreuses espèces tropicales et subtropicales présentent lorsqu'elles sont gardées sous glace une durée de conservation six fois plus importante que celle des poissons de la Mer du Nord. Cependant certains poissons tropicaux s'altèrent aussi vite que les poissons des eaux froides, et parmi les poissons de la Mer du Nord certaines espèces s'altèrent trois fois plus vite que d'autres provenant de la même région. Pour éclairer ces constatations, il importe de définir tout d'abord la notion de "bactérie d'altération".

##### 1.1. Microflore d'altération

Lors de l'altération du poisson, les diverses espèces bactériennes présentes prolifèrent irrégulièrement. La connaissance de la nature des bactéries présentes dans le poisson est importante, mais celle de la participation des différents groupes bactériens au processus d'altération est plus déterminante. Il est communément admis que chez les poissons des eaux froides les membres des genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* sont responsables de l'altération du poisson frais (CASTELL et al., 1948, 1958; SHEWAN, 1961).

ADAMS, LERKE et FARBER (1964) confirment que les principales bactéries responsables de l'altération proviennent des genres dominants dans la microflore aérobie: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, mais qu'une partie seulement des membres de ces genres sont des bactéries d'altération, et que globalement ces dernières ne constituent qu'une proportion relativement petite de la population bactérienne totale. Des études expérimentales (LERKE et al., 1965) ont permis de déterminer l'aptitude de nombreuses souches bactériennes isolées du poisson à altérer ou non du jus stérile de muscle pressé. Ainsi, parmi les *Pseudomonas*, les groupes III et IV comportent exclusivement des bactéries d'altération. *Pseudomonas putrefaciens* est considéré comme un agent d'altération important (VAN SPREEKENS, 1977). On trouve dans le genre *Acinetobacter* des bactéries actives et inactives. Tous les *Aeromonas* et *Vibrio* rencontrés ont un puissant pouvoir d'altération. Aucun *Micrococcus*, *Flavobacterium* et *Coryneforme* n'a été classé dans les bactéries d'altération.

Le rôle de *Pseudomonas putrefaciens* a fait l'objet de nombreuses études. Certaines l'ont impliqué comme un des *Pseudomonas* prédominants dans l'altération du poisson blanc Nord-Américain (CASTELL et al., 1949; LEVIN, 1968; SILVERIO et LEVIN, 1967). D'autres l'ont confirmé comme une espèce bactérienne dominante dans l'altération des filets de haddock (CHAI et al., 1968). Dans la population initiale des produits de haute qualité bactériologique, il constitue toujours moins de 4% de la microflore, et le plus souvent ne dépasse pas 1%. Pendant la conservation réfrigérée, il augmente plus rapidement que l'ensemble de la population microbienne, constituant 50 à 90% de la flore quand elle est supérieure à  $10^6$  par g de tissu musculaire.

## 1.2. Evolution dans les espèces des eaux froides et tempérées

L'évolution de la microflore du cabillaud pendant le stockage sous glace se manifeste, après une période de latence de 2 à 3 jours, par une croissance logarithmique jusqu'au dixième jour où elle peut atteindre  $10^8$  par  $\text{cm}^2$  de peau ou par g de muscle. Qualitativement, il y a peu de changements les premiers jours, mais ensuite les groupes de *Pseudomonas*, particulièrement les groupes III/IV, l'emportent progressivement et au 12<sup>e</sup> jour constituent environ 90% de la flore totale (SPENCER, 1961). Les raisons pour lesquelles certains *Pseudomonas* prédominent ne sont pas déterminées avec certitude, ceci s'expliquerait par des temps de génération différents ou par des phénomènes de compétition ou de synergie (SHEWAN, 1971). Le tableau 5 illustre l'évolution des principaux genres présents dans la flore de la peau lors de la conservation sous glace.

( Durée de la conservation	: 0	: 5	: 10	: 15	)
( sous glace (en jours)	:	:	:	:	)
( <i>Pseudomonas/Alteromonas</i>	: 26	: 33	: 84	: 82	)
( <i>Moraxella/Acinetobacter</i>	: 33	: 26	: 7	: 13	)
( <i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	: 0	: 8	: 0	: 0	)
( Coryneformes	: 25	: 12	: 8	: 3	)
( <i>Micrococcus</i>	: 14	: 21	: 0	: 0	)
( Bactéries non identifiées	: 2	: 0	: 1	: 2	)

Tableau 5. SHEWAN et al., 1960.

Composition de la flore de la peau du cabillaud conservé sous glace (dénombrements exprimés en pourcentage de la flore totale).

Des travaux ultérieurs sur l'évolution de la flore bactérienne de la peau et du muscle du poisson stocké à 0,5°C (OKUZUMI et al., 1972) et sur la flore de steaks d'espadon stockés à 3,5°C (LANNELONGUE et al., 1982), confirment les mêmes évolutions lors de la conservation réfrigérée. Ainsi, on observe une dominance des *Pseudomonas/Alteromonas*, indépendamment de la composition initiale de la flore. Selon OKUZUMI, le pourcentage de *Pseudomonas* I et II augmente, mais ce sont les III/IV - H et III/IV - NH qui dominent. Les bactéries appartenant aux genres *Moraxella/Acinetobacter*, *Flavobacterium/Cytophaga* ainsi que les Coryneformes voient leur pourcentage décroître au cours du stockage.

### 1.3. Evolution dans les espèces des eaux chaudes

conservation sous glace: Dans des poissons des eaux chaudes, pêchés sur la côte Est des Philippines, la microflore initiale s'est révélée très diverse: *Acinetobacter* (45%), *Bacillus sp.* (27%), *Pseudomonas sp.* (9%), *Alteromonas putrefaciens* (9%). Pendant le stockage sous glace, *Pseudomonas sp.* et *Alteromonas putrefaciens* augmentent en pourcentage pour atteindre 83% de la flore totale lorsque le poisson devient inconsommable (BARILE et al., 1985b). Ainsi on observe lors de la conservation réfrigérée le développement des mêmes espèces actives d'altération que dans les poissons des eaux plus froides. Si la proportion des mésophiles est supérieure lors de la pêche, l'altération pendant le stockage sous glace sera toutefois causée par *Pseudomonas sp.* et *Alteromonas putrefaciens*, de manière analogue à celle des poissons des eaux froides et tempérées (LEVIN, 1968; HERBERT et al., 1971; SHEWAN, 1977; GILLESPIE et MACRAE, 1975).

La composition de la microflore des poissons fraîchement pêchés est fonction de leur origine géographique, par contre les modèles d'altération lors de la conservation sous glace sont tout à fait similaires, quelle que soit la température des eaux d'origine.

Divers auteurs indiquent que le poisson pêché dans les eaux tropicales se conserve plus longtemps dans la glace que les espèces semblables pêchées dans les eaux froides ou tempérées (DISNEY, 1976; CANN, 1977; SHEWAN, 1977, POULTER et al., 1981; SUMNER et al., 1984). L'explication proposée est que le poisson tropical ne contient pas de flore bactérienne dominante psychrotrophe lors de la pêche, contrairement aux poissons des eaux plus froides.

**dégradation mésophile:** Les mécanismes de dégradation du poisson à des températures supérieures aux températures de réfrigération sont très peu connus. Or les températures de l'air et des eaux tropicales se situent dans l'échelle de température des mésophiles: 20 à 40°C, et les pêches tropicales représentent environ 60% des prises de poisson mondiales (LIMA DOS SANTOS, 1981). De plus, le poisson n'y est souvent glacé à aucun moment du stockage, c'est-à-dire de la pêche jusqu'à la consommation, ce qui peut expliquer les pertes importantes résultant de la dégradation du poisson dans les pêches tropicales.

GORCZYCA et al. (1985) démontrent que, si les modèles d'altération sont effectivement comparables pour l'ensemble des poissons lorsqu'ils sont conservés sous glace, les conditions habituelles de conservation des espèces des eaux chaudes sont souvent favorables au développement des flores mésophiles.

#### 1.4. Incidences du délai précédant la mise en glace ou la congélation

La durée comprise entre la pêche et la mise en glace du poisson peut avoir une incidence sur la composition de la microflore. Il a été démontré sur des espèces des eaux chaudes, avec des températures ambiantes de 28 à 30°C, que les principaux organismes d'altération après 0 à 6 heures de délai pour glacer étaient: *Pseudomonas sp.* et *Alteromonas putrefaciens*, alors qu'un délai prolongé de 9 à 12 heures conduit à une microflore composée de: *Bacillus sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas sp.* (BARILE, 1985a).

Selon OKUZUMI et al. (1981) une congélation à -20°C n'a pas d'incidence sur l'évolution du poisson après décongélation, par contre une congélation à -3°C rend le poisson plus périssable. Les poissons congelés à -3°C pendant 15 et 37 jours s'altèrent, lorsqu'ils sont décongelés, respectivement après 6 et 3 jours de conservation à 0°C. Les poissons congelés à -20°C pendant 15 jours s'altèrent après 12 jours de conservation à 0°C. D'autre part la congélation à -3°C modifie l'évolution de la microflore.

Les conclusions des travaux japonais sont à rapprocher des conséquences désormais bien connues d'une congélation lente sur la qualité du poisson, notamment la formation de gros cristaux extracellulaires, une déshydratation partiellement irréversible des protéines et un exsudat important à la décongélation. La richesse de l'exsudat en composés nutritifs facilite le développement de microorganismes psychrotrophes au cours de la décongélation et avance ainsi le processus de l'altération.

#### REMARQUES :

La microflore des poissons d'eau douce, qui sort du cadre de notre sujet, a été beaucoup moins étudiée que celle des poissons marins. Sa composition est quantitativement différente, avec une forte proportion de bactéries Gram positif telles que *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, et de Corynéformes (LISTON, 1980), d'autre part on retrouve les mêmes genres que dans le poisson marin et la flore bactérienne est le reflet de l'environnement (HERBORG et VILLADSEN, 1975; CANTONI et al., 1976; WYATT, 1978).

Notons enfin, concernant les poissons marins, que beaucoup de travaux cités ont été réalisés sur des Gadidés ou des Pleuronectidés, et qu'il serait imprudent de généraliser la totalité des données microbiologiques. Nous avons précisé que l'espèce n'a qu'une incidence faible sur la composition initiale de la flore bactérienne, mais le substrat que constitue le poisson conditionne l'évolution de cette flore.

## 2. DEGRADATION ENZYMATIQUE ET BACTERIENNE

Les premières modifications du tissu musculaire survenant après la mort du poisson sont dues aux enzymes musculaires et digestives. Suite à la pénétration et au développement des bactéries dans le muscle, celles-ci deviennent alors les acteurs essentiels de la dégradation.

### 2.1. Autolyse

Après la mort du poisson l'oxygène n'est plus renouvelé et la production d'énergie s'arrête. Dans le muscle, qui est stérile chez le poisson vivant, avant toute intervention bactérienne s'amorcent de nouveaux processus impliquant la glycolyse et la dégradation de l'adénosine triphosphate (ATP).

#### 2.1.1. Enzymes musculaires

L'arrêt de la circulation sanguine est responsable de toute l'évolution *post mortem* du tissu musculaire du poisson, selon le mécanisme décrit par JOUVE et al. (1991) dans la viande. Les premiers corollaires sont d'une part l'arrêt de l'apport par le sang de l'oxygène et de différents métabolites, d'autre part l'impossibilité d'évacuer les métabolites résultant de l'activité biochimique des cellules musculaires. Une conséquence essentielle va être l'augmentation de la concentration intracellulaire des ions  $Ca^{++}$  qui va déterminer l'activation des mécanismes biochimiques conduisant d'une part à la glycolyse et à l'acidification du muscle, d'autre part à l'installation de la rigidité cadavérique.

#### *glycolyse et acidification du muscle :*

L'ATP constitue une forme universelle de transfert d'énergie pour de nombreuses réactions métaboliques. Dans l'organisme vivant l'ATP consommé est reconstitué par réaction entre l'adénosine diphosphate (ADP) et la phosphocréatine (réaction de Lohman). Après la mort, le  $Ca^{++}$  entraîne à la fois l'activation de la myosine ATP-ase, donc l'hydrolyse de l'ATP, et la réaction de Lohman, c'est à dire la resynthèse de l'ATP. Lorsque la réserve de phosphates énergétiques s'épuise, l'ATP n'est plus reconstitué (TARR, 1966). Toutefois la dégradation du glycogène déclenchée par le  $Ca^{++}$  conduit à la libération d'ATP, mais suite à l'arrêt de l'apport sanguin, la glycolyse s'effectue en anaérobiose avec un faible rendement, c'est à dire une faible production d'ATP. Le processus aboutit à la formation d'acide lactique. L'abaissement du pH entraîne un arrêt de la glycolyse.

*installation de la rigidité cadavérique :*

Le phénomène de "*rigor mortis*" résulte de la conjonction de plusieurs éléments. Compte tenu d'une part du mauvais rendement de la glycogénolyse pour régénérer l'ATP puis de son arrêt, d'autre part de l'épuisement de la phosphocréatine et de l'arrêt de la réaction de Lohman, l'hydrolyse de l'ATP par la myosine ATP-ase, et éventuellement l'ATP-ase sarcoplasmique, n'est plus compensée. La diminution de la concentration d'ATP favorise alors la formation de liaisons entre l'actine et la myosine. L'établissement de ces liaisons et l'installation de l'état de rigidité cadavérique sont progressifs. Le muscle commence à perdre son élasticité lorsque le taux d'ATP chute à 80 % environ de sa valeur initiale. La rigidité cadavérique est définitivement installée lorsque le taux d'ATP atteint 20 % de cette valeur (JOUVE et al., 1991). Quand le taux d'ATP approche de 0, l'acide lactique est à son taux le plus élevé et la "*rigor mortis*" est maximale (SIKORSKI, 1980). La formation d'acide lactique n'est pas la cause de l'apparition de la "*rigor-mortis*", elle jouera toutefois un rôle important pour l'allongement de sa durée.

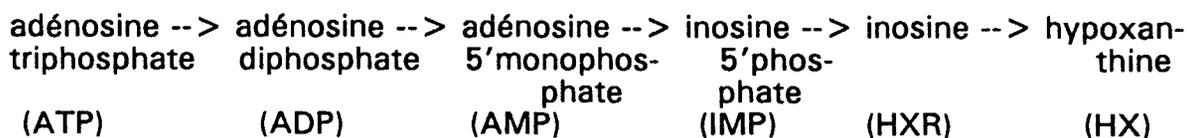
Une différence essentielle caractérisant le poisson par rapport à la viande réside dans le fait que la rigidité cadavérique et sa résolution interviennent très rapidement, après respectivement 5 heures et 30 heures environ à 0°C. Le processus est beaucoup plus long dans la viande puisque la résolution de la rigidité cadavérique demande 15 jours à 0°C (CHEFTEL, 1984). Ceci s'explique notamment par les conditions de capture du poisson, car l'activité musculaire et l'asphyxie réduisent le stock de glycogène, activent l'apparition de la "*rigor mortis*" et diminuent sa durée.

La baisse de pH est plus faible que dans la viande. L'acidification est liée à la teneur en glycogène à la mort de l'animal, or la réserve de glycogène se trouve très réduite chez le poisson compte-tenu des techniques de pêche.

D'autre part le tissu musculaire des poissons a un fort pouvoir tampon, notamment celui des poissons marins (CUTTING, 1953). Ainsi le pH passe de 7,0 à 6,2-6,5 en moyenne, alors que dans la viande il descend jusque 5-5,7. Ceci contribue à l'instabilité du poisson après la mort, les pH atteints n'inhibant pas la prolifération bactérienne.

*dégradation de l'ATP:*

La dégradation de l'ATP, après une série de réactions de déphosphorylation et de désamination, conduit à la production d'inosine monophosphate (IMP), qui se transforme ensuite en inosine, puis en hypoxanthine et ribose:



La teneur en hypoxanthine a été proposée comme critère de fraîcheur, mais donne de très mauvaises indications dans certaines espèces. Des travaux japonais (SAITO et al., 1959; EHIRA et UCHIYAMA, 1969) conduisent à préférer la somme des teneurs en inosine (HxR) et hypoxanthine (Hx) plutôt que l'Hx seule, car certaines espèces accumulent l'HxR alors que d'autres, notamment de nombreux poissons plats, accumulent l'Hx. Pour établir une expression plus précise de l'état de fraîcheur, le rapport des quantités d'(HxR + Hx) présentes sur la somme des composés apparentés à l'ATP a été étudié par ces chercheurs:

$$K (\%) = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx} \times 100$$

Ils ont ensuite proposé de le calculer d'une manière plus approximative et de l'exploiter sous cette forme simplifiée:

$$K (\%) = \frac{HxR + Hx}{IMP + HxR + Hx} \times 100$$

Nous avons entrepris de déterminer la fiabilité de K comme critère de fraîcheur du poisson, et nous avons constaté une évolution très significative de cette valeur pendant la conservation. Ce critère est particulièrement intéressant dans les premiers stades, il est une expression de l'autolyse et progresse dès la mort de l'animal, avant tout développement de la flore bactérienne (MALLE et LE PEZENNEC, 1992 : annexe 10).

#### *dégradation du TMAO:*

La réduction du TMAO est essentiellement due à l'action bactérienne. Toutefois le TMAO peut être réduit en TMA par un enzyme reconnu dans les muscles rouges des espèces pélagiques, ou dégradé en diméthylamine et formaldéhyde par un enzyme présent dans les muscles de certaines espèces (KAWABATA, 1953; CASTELL et al., 1973; MACKIE et THOMSON, 1974).

Ces considérations relatives aux enzymes musculaires sont volontairement limitées au sujet de nos travaux. Il faut néanmoins souligner le rôle déterminant dans l'autolyse des protéases intracellulaires, dont les principales sont les cathepsines.

#### 2.1.2. Enzymes digestives

Les enzymes du tractus intestinal jouent un rôle indirect dans la détérioration du tissu musculaire en dégradant les viscères puis la paroi abdominale, et en préparant ainsi la pénétration bactérienne. Les protéases digestives les plus importantes sont des endopeptidases, dont la pepsine et la cathepsine D situées dans la paroi de l'estomac, et la trypsine dans le caecum pylorique. Ces enzymes conduisent à de longs polypeptides qui sont ensuite réduits en peptides par des exopeptidases (GRANROTH et al., 1978).

## 2.2. Dégradation bactérienne

### 2.2.1. Pénétration des bactéries

Nous avons précisé précédemment que le muscle d'un poisson marin vivant est stérile et nous avons localisé les foyers naturels de contamination bactérienne qui correspondent d'une part aux régions du corps en contact avec l'eau, notamment le mucus et les branchies, d'autre part au tractus digestif. La pénétration des bactéries s'effectue en partie par la peau, mais pour l'essentiel par le système vasculaire à partir des branchies et de la cavité abdominale. Les bactéries de l'intestin peuvent par ailleurs investir directement les muscles de la paroi abdominale, cette pénétration étant préparée par l'action des enzymes digestives.

L'invasion bactérienne du muscle à travers la peau est un processus qui soulève des controverses. Comme nous l'avons déjà évoqué, la nature du mucus est déterminante, car le mucus de certains poissons a des propriétés antibiotiques, et dans les espèces marines courantes il y a présence de lysozyme et souvent d'anticorps (FLETCHER, 1968; SHEWAN, 1977). Certains auteurs estiment donc que le mucus s'oppose à l'altération bactérienne et joue un rôle protecteur, d'autres pensent que sa charge bactérienne en fait un foyer de contamination qu'il est nécessaire d'éliminer par un lavage du poisson. Quoiqu'il en soit, lorsqu'il y a diffusion des bactéries à travers la peau, elle est lente et ne représente pas le processus majeur de contamination.

### 2.2.2. Dégradation du tissu musculaire

La putréfaction résulte de l'action conjuguée des réactions de glycolyse, de lipolyse et de protéolyse. Dans l'optique de nos travaux, nous nous intéressons particulièrement au catabolisme des substances protéiques qui en constitue la phase primordiale. Selon un schéma classique, les protéines sont hydrolysées en polypeptides et en peptides, puis en amino-acides libres dont la quantité totale augmente dans le muscle. Ceux ci sont ensuite métabolisés selon 2 voies principales: des décarboxylations conduisant à la formation d'amines dont certaines sont volatiles, et des désaminations entraînant la production d'ammoniac.

L'évolution des teneurs en ammoniac lors de la dégradation du tissu musculaire est donc liée à la désamination des acides aminés et de leurs composés mais aussi à la désamination de la créatine. Chez les Sélaciens, elle résulte essentiellement de la décomposition de l'urée. Parallèlement à une faible production d'ammoniac pouvant résulter de l'autolyse, cette petite molécule peut être réemployée initialement pour certaines synthèses et augmente ensuite très rapidement avec l'activité bactérienne. Ainsi la production d'ammoniac n'évolue pas de manière significative en début de conservation, elle progresse lors du développement des populations microbiennes (SOUDAN et al., 1965; SAINCLIVIER, 1983).

La réduction de l'oxyde de TMA en TMA est une réaction d'altération bactérienne très anciennement connue. BEATTY et GIBBONS (1937) ont démontré la relation entre la développement de la population bactérienne et la production de TMA. C'est lorsque les bactéries ont consommé l'oxygène présent dans le tissu musculaire que s'amorce la réduction du TMAO dont l'équation a été formulée par WATSON (1939):



TARR (1939) a isolé des cultures bactériennes un enzyme spécifique qui active le TMAO pour qu'il puisse être réduit par l'intermédiaire des nombreuses déshydrogénases des cellules bactériennes. Cet enzyme spécifique permet ainsi de céder au TMAO l'hydrogène provenant de l'oxydation des acides lactique ou pyruvique, ou des glucides musculaires. Cette réaction permet aux microorganismes non fermentatifs de se développer en condition microaérophile, voire anaérobie, dans les tissus (HOBBS, 1982). Elle subit de manière déterminante l'influence du pH du substrat, elle fonctionne entre pH 6,0 et 8,0 avec un optimum entre 7,2 et 7,4.

De petites quantités de diméthylamine (DMA) et monométhylamine (MMA) proviennent également de l'altération bactérienne (DYER et MOUNSEY, 1945). En comparaison avec la TMA, il existe très peu de travaux relatifs à la DMA. CASTELL et al. (1973) ont toutefois démontré que la production de DMA peut s'effectuer à des températures négatives. Ils n'ont pas observé d'augmentation du taux de TMA dans le poisson congelé, alors qu'ils ont constaté une production de DMA plus importante dans les filets congelés que dans les filets conservés sous glace. Dans le poisson congelé l'accumulation de DMA est liée à l'apparition simultanée de formaldéhyde, la réduction du TMAO en DMA et formaldéhyde résulte alors de l'activité des enzymes musculaires et non des enzymes bactériennes.

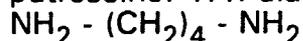
La formation de monométhylamine est fugace et reste à l'état de traces. La monométhylamine, la diméthylamine, la triméthylamine et l'ammoniac sont des composés azotés présentant en commun la basicité et la volatilité. Ce sont des éléments de l'azote basique volatil total (ABVT) dont la TMA et l' $\text{NH}_3$  forment la part essentielle.

Les amines biogènes sont définies d'une manière générale comme des molécules biologiquement actives sur le système nerveux central et sur le système vasculaire. Dans le domaine alimentaire l'acceptation du terme "amines biogènes" correspond surtout aux amines non volatiles telles que la putrescine, la cadavérine, l'histamine, la spermine, le spermidine, la tyramine, la tryptamine, qui proviennent de la décarboxylation des acides aminés par les enzymes microbiennes et tissulaires (RAGUENES, 1988). Les amines biogènes constituent en quelque sorte le concept complémentaire de l'ABVT dans le poisson, et leur dosage pourrait fournir également des informations sur la dégradation du muscle.

Parmi les amines aliphatiques, les plus étudiées sont les polyamines suivantes:

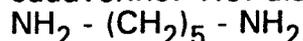
- la putrescine qui provient de la décarboxylation de l'ornithine:

putrescine: 1.4. diaminobutane



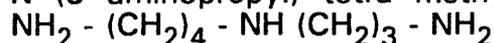
- la cadavérine qui provient de la décarboxylation de la lysine:

cadavérine: 1.5. diaminopentane



- la spermidine:

N (3 aminopropyl) tétra méthylène diamine



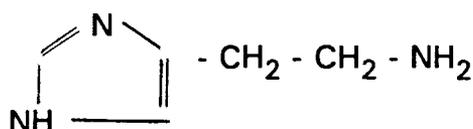
- la spermine:

N,N - bis (3 aminopropyl) tétra méthylène 1-4 diamine



L'amine aromatique la plus étudiée dans le poisson est l'histamine qui est issue de la décarboxylation de l'histidine:

histamine: 2-4 (imidazoléthylamine)



L'augmentation de la concentration en amines biogènes traduit le développement microbien qui est le facteur essentiel dans le processus d'altération du poisson, et peut donc permettre l'évaluation de la fraîcheur (GOUYGOU et al., 1989). La plupart des travaux ont été orientés sur les effets toxiques et portent notamment sur la teneur en histamine des Scombridés (FERNANDEZ et al., 1979; MURRAY et al., 1982). Ces poissons contiennent des taux d'histidine libre supérieurs à 2 %, variables avec la saison, qui impliquent un risque d'intoxication. Les décarboxylases microbiennes sont largement responsables de la production d'histamine, le rôle de l'autolyse est tout à fait mineur, et les microorganismes producteurs ne sont, en général, pas psychrotrophes. Ceux qui produisent les plus grandes quantités d'histamine sont notamment: *Proteus morgani*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* (BEHLING et TAYLOR, 1982; STEVE et TAYLOR, 1984). Les travaux de MIETZ (1977, 1978) et de KARMAS (1978, 1981) s'attachent par contre à la signification d'un ensemble d'amines biogènes (histamine, putrescine, cadavérine, spermine, spermidine) comme critère de fraîcheur. Actuellement la définition de la qualité par référence au profil en amines biogènes soulève le plus grand intérêt, mais se heurte au problème de la méthodologie.

## CHAPITRE 3

### CONSEQUENCES DE L'ALTERATION

Il est évident que l'altération du poisson se traduit par des changements d'aspect et par l'apparition d'odeurs et de goûts anormaux. Nous tenons à souligner plus particulièrement l'incidence du niveau d'altération de la matière première sur la qualité des produits transformés en prenant notamment l'exemple des produits fumés.

#### 1. CONSEQUENCES ORGANOLEPTIQUES

Les modifications organoleptiques sont celles perçues par les sens, elles affectent l'apparence, la texture, l'odeur et le goût.

Parmi les conséquences de l'altération bactérienne du poisson, l'apparition d'odeurs, généralement désagréables, est la plus significative. Des odeurs différentes sont décelées au cours de l'altération selon l'espèce de poisson et selon les bactéries présentes.

SHEWAN (1971) a ensemencé du muscle stérile de cabillaud avec des cultures pures pour déterminer la nature des bactéries responsables de l'altération. Il a constaté qu'un faible pourcentage seulement des bactéries testées produit un changement organoleptique perceptible, et que la majorité des espèces produisant des odeurs d'altération dans le muscle de cabillaud sont des *Pseudomonas*. Celles qui produisent une odeur fruitée se révèlent être des *Pseudomonas fragi*, bien que certaines de ces souches produisent aussi de fortes odeurs ammoniacales et sulfurées. Les sulfures proviennent essentiellement des *Pseudomonas sp.* des groupes III et IV, notamment *Pseudomonas putrefaciens*. Le rôle déterminant des *Pseudomonas* a été confirmé par GILLESPIE (1975) qui a ensemencé du muscle stérile de poissons des eaux Australiennes.

Des travaux de MILLER et al. (1973) ont permis d'identifier certains composés responsables des odeurs, notamment les: diméthylsulfure, diméthyldisulfure, acétaldéhyde, éthylacétate, éthylalcool, méthylmercaptan, butyrate d'éthyle, hexanoate d'éthyle et butanone. D'autres substances plus communément décelées dans le poisson sont impliquées: ammoniac, diméthylamine, triméthylamine, acide sulfhydrique, hydrogène sulfuré.

Parallèlement à l'odeur on peut observer l'évolution de divers caractères d'altération. Parmi les caractères extérieurs qui subissent des modifications, notons la peau, les branchies, le mucus, l'oeil. La rigidité du corps est également affectée, le corps s'amollit après un raidissement passager. D'autre part un examen interne permet d'apprécier l'état de la chair le long de la colonne vertébrale, au cours de l'altération elle se gélifie et se colore en rouge par fixation de l'hémoglobine qui diffuse de l'aorte.

L'évolution du goût lors de l'altération se traduit en premier lieu par une atténuation prononcée de la saveur spécifique qui est progressivement remplacée par des saveurs étrangères (lactique, acétique, butyrique, amère, sulfurée, ammoniacale), différentes suivant les espèces et la nature des contaminations. Chez les Gadidés la production de triméthylamine est directement impliquée dans l'évolution de la saveur (SOUDAN et al., 1965).

On ne peut parler de la dégradation organoleptique du poisson sans évoquer les problèmes de rancissement. Les modifications majeures de la fraction lipidique du poisson sont des réactions d'oxydation de nature purement chimique, toutefois une dégradation enzymatique par des lipases endogènes ou microbiennes peut également intervenir. Ces réactions entraînent l'apparition d'une odeur et d'un goût de "rancé" ainsi que des modifications de la couleur de la chair, notamment chez les poissons gras.

La détermination et l'exploitation de l'évolution des divers caractères d'altération ont été rationalisées et permettent ainsi une appréciation suffisamment exacte pour être considérée comme "objective" alors qu'elle repose sur une somme d'évaluations subjectives (SOUDAN et al., 1957). Ces travaux ont permis d'établir le barème français de cotation qui repose sur la détermination d'un indice d'altération entre 1 (frais) et 4 (altéré) : tableau 6.

Le barème de la CEE repose sur l'observation des mêmes caractères, mais à l'inverse du système français il détermine la fraîcheur, les notes allant de 3 (frais) à 0 (altéré) : tableau 7.

La correspondance entre les barèmes français et européen d'évaluation organoleptique est condensée dans le tableau 8.

Caractères observés sur le poisson		N° des caractères	Appréciation organoleptique des caractères et COTATION								
			0	1	2	3	4	5	6		
EXAMEN A L'ETAT CRU	Examen Externe	PEAU	Mucus	I	transparent coté 1		laiteux	opaque	grumeleux	jaunâtre épais coté 5	
			Pigmentation	II	Irisée	couleurs chatoyantes	couleurs vives	couleurs ternies	terne	décoloré	grisâtre
	OEIL	Teinte	III	pupille noire brillante coté 1		pupille plus terne	cornée opalescente	pupille grise	cornée laiteuse	blanchâtre coté 5	
		Affaissement	IV	bombé coté 1		un peu affaissé	plat	concave au centre	très concave coté 5		
	BRANCHIES	Teinte	V	colorée brillante coté 1		moins colorée mate	se décolore	jaunâtre	grisâtre coté 5		
		Odeur	VI	spécifique	neutre	douceâtre	faiblement rance	légèrement putride	putride (sulfurée ou ammoniacale)	fétide	
	RIGIDITE	Chair	VII	ferme coté 1		élastique	souple	molle	flasque coté 5		
		Paroi abdominale	VIII	intacte coté 1		détendue	molle	fragile	perforée coté 5		
	Examen Interne	PERITOINE	IX	adhérent coté 1		non adhérent	déchiré	détérioré	lysé coté 5		
		COLONNE VERTEBRALE	X	même teinte que le reste de la chair coté 1				rose	rouge	brune coté 5	
EXAMEN APRES CUISSON	ODEUR	XII	aigue marine ou spécifique	neutre	faible ou désagréable	aigre (acide lactique)	surie (plus ou moins sulfureuse)	ammoniacale	putride		
			spécifique	spécifique renforcée	spécifique atténuée	papier mâché	douceâtre un peu amère	amère, sulfurée ou ammoniacale	nauséuse		
	SAVEUR	XIII	spécifique	spécifique renforcée	spécifique atténuée	papier mâché	douceâtre un peu amère	amère, sulfurée ou ammoniacale	nauséuse		

Tableau 6 : Barème français de cotation.

Objets d'examen	CRITERES			
	Cotes d'appréciation			
	3	2	1	0
	ASPECT			
<b>PEAU</b>	pigmentation vive et chatoyante ; pas de - décoloration ; mucus aqueux transparent	pigmentation vive mais sans lustre mucus légèrement trouble	pigmentation en voie de décoloration et ternie ; mucus opaque	pigmentation (1) terne ; mucus laiteux
<b>OEIL</b>	convexe (bombé) cornée transparente pupille noire brillante	convexe et légèrement affaissé ; cornée légèrement opalescente ; pupille noire, ternie	plat ; cornée opalescente ; pupille opaque	concave (1) au centre cornée laiteuse ; pupille grise
<b>BRANCHIES</b>	couleur brillante pas de mucus	moins colorées ; traces légères de mucus clair	se décolorant ; mucus opaque	jaunâtres ; (1) mucus laiteux
<b>CHAIR</b> (coupure dans l'abdomen)	bleuâtre, translucide lisse, brillante ; sans aucun changement de coloration originale	veloutée, cireuse feutrée ; couleur légèrement modifiée	légèrement opaque	opaque (1)
<b>COULEUR LE LONG DE LA COLONNE VERTEBRALE</b>	pas de coloration	légèrement rose	rose	rouge (1)
<b>ORGANES</b>	reins et résidus d'autres organes rouge brillant de même que le sang à l'intérieur de l'aorte	reins et résidus d'autres organes rouge mat ; sang se décolorant	reins, résidus d'autres organes et sang rouge pâle	reins, résidus d'autres organes, sang, brunâtres (1)
	ETAT			
<b>CHAIR</b>	ferme et élastique  surface lisse	élasticité diminuée	légèrement molle (flasque), élasticité diminuée ; surface cireuse (veloutée) et ternie	molle (flasque) (1)  écailles se détachant facilement de la peau surface granuleuse
<b>COLONNE VERTEBRALE</b>	se brise au lieu de se détacher	adhérente	peu adhérente	non adhérente (1)
<b>PERITONE</b>	adhérent totalement à la chair	adhérent	peu adhérent	non adhérent (1)
	ODEUR			
<b>BRANCHIES, PEAU CAVITE ABDOMINALE</b>	algue marine	ni d'algue ni mauvaise	légèrement aigre	aigre (1)

1) Ou dans un stade d'altération plus avancé

Tableau 7 : Barème de cotation CEE (Annexe A du règlement CEE).

	Catégories de fraîcheur C.E.E.	Correspondance approchée avec les indices d'altération
Appellations	Degrés de fraîcheur	
extra	égal ou supérieur à 2,7	égal ou inférieur à 1,3 ( $\pm 0,1$ )
A	égal ou supérieur à 2,0 et inférieur à 2,7	égal ou inférieur à 2,0 ( $\pm 0,1$ ) et supérieur à 1,3 ( $\pm 0,1$ )
B	égal ou supérieur à 1,0 et inférieur à 2,0	égal ou inférieur à 3,0 ( $\pm 0,2$ ) et supérieur à 2,0 ( $\pm 0,1$ )
(retirée de la consommation humaine)	inférieur à 1,0 ("poissons ne satisfaisant pas aux exigences requises pour le classement dans les catégories extra, A et B")	supérieur à 3,0 ( $\pm 0,2$ )

Tableau 8 : Correspondance entre les barèmes européen et français d'évaluation organoleptique du poisson.

## 2. CONSEQUENCES SUR LA QUALITE DES PRODUITS TRANSFORMES

Parallèlement à la nécessité de disposer d'autres moyens d'évaluation lorsque la méthode organoleptique n'est pas applicable dans son intégralité (filets, poisson congelé ...), la nécessité de développer des méthodes objectives d'analyse s'impose pour des raisons technologiques. Il est démontré que la qualité des produits transformés est directement liée à la qualité de la matière première, la destruction des microorganismes par la chaleur en constitue la meilleure illustration. Nos travaux concernant les effets du fumage sur la flore bactérienne du saumon (MALLE, 1980) permettent d'autre part de développer une argumentation technologique qui vient accentuer la nécessité de pouvoir sélectionner de manière fiable la matière première.

### 2.1. Influence du nombre initial de microorganismes sur l'efficacité des traitements bactéricides

#### *Traitement thermique*

A une température donnée, le traitement par la chaleur d'une population de microorganismes entraîne une variation du nombre de cellules bactériennes (spores, formes végétatives) en fonction du temps qui peut être représentée par l'équation suivante:

$$\frac{dN}{dt} = -K.N$$

où N est le nombre de microorganismes en vie au temps t, et K la vitesse relative de destruction thermique.

Ainsi la destruction est directement proportionnelle au nombre de microorganismes présents.

On peut écrire l'équation précédente sous la forme:

$$\frac{dN}{N} = -K dt$$

Il apparaît ainsi qu'à n'importe quel temps t, c'est une fraction constante du nombre de microorganismes présents au temps t qui est détruite par unité de temps. En intégrant l'équation, on obtient:

$$N = N_0 e^{-kt}$$

où  $N_0$  est le nombre d'individus de la population initiale.

Le résultat d'un traitement thermique va donc dépendre, toutes conditions égales par ailleurs, de la charge microbienne initiale.

## Fumage

En les soumettant à l'action de la fumée, nous avons déterminé l'évolution de différentes populations d'*Escherichia coli* en fonction du temps d'exposition (MALLE et al., 1981a : annexe 4).

Les cinétiques de survie de ces populations, exprimant le logarithme du nombre de bactéries survivantes en fonction de la durée d'exposition, sont matérialisées par des droites et elles peuvent être comparées à celles qui expriment l'évolution des populations microbiennes en fonction de la durée d'un traitement thermique. Une loi expérimentale a été dégagée des résultats: pour une densité de fumée donnée, le nombre de bactéries qui survit à l'exposition à la fumée décroît de façon exponentielle en fonction de la durée d'application de ce traitement. L'expression mathématique de cette loi peut s'écrire:

$$\log \frac{N_0}{N} = \frac{t}{D}$$

Le temps de réduction décimale D est constant (pour une densité de fumée constante dans le fumoir):

$\log N_0/N$  est donc une fonction linéaire de t.

Ainsi lors d'une exposition à la fumée d'une durée déterminée, le rapport  $N_0/N$  est constant, c'est à dire que le nombre de bactéries survivantes est directement lié à la contamination initiale.

### 2.2. Influence des substances biologiques sur l'action bactéricide du fumage

Après l'étude expérimentale de l'action de la fumée sur des bactéries (*Escherichia coli*) exposées en boîte de Pétri sur un milieu gélosé, nous avons déterminé le taux de réduction du nombre de bactéries lors du fumage dans leur environnement naturel, c'est à dire dans l'aliment, avec des conditions de traitement identiques, les boîtes de Pétri ayant été placées dans les mêmes cellules de fumage que les filets de poisson. Ce taux de réduction a été déterminé en effectuant sur un même filet de saumon des prélèvements immédiatement avant fumage et des prélèvements après fumage. Il est exprimé par le rapport: nombre de bactéries avant fumage/nombre de bactéries après fumage.

Exceptés les anaérobies, les différents groupes bactériens ont subi à des degrés divers une réduction de leur population, la moyenne arithmétique des taux de réduction déterminés étant de 5,34. Une action incontestable de la fumée a été mise en évidence sur la flore bactérienne aérobie, qu'il s'agisse de bactéries aérobies strictes (*Pseudomonas*, *Micrococcus*) ou d'aérobies anaérobies facultatives (*Enterobacteriaceae*; *Staphylococcus*; *Lactobacillaceae*: *Streptococcus*, *Lactobacillus*), mais cette action est modérée puisque le taux moyen de réduction du nombre de bactéries est de l'ordre de 5.

Ces résultats ne concordent pas avec ceux présentés précédemment où nous avons démontré une efficacité beaucoup plus grande de la fumée sur des bactéries exposées en boîtes de Petri. Pour expliquer cette disparité, nous avons proposé l'hypothèse que le tissu musculaire du saumon protège de l'action de la fumée les microorganismes qu'il contient (MALLE et al., 1981b : annexe 5).

#### *Influence du tissu musculaire*

Nous avons constaté que la présence de tissu musculaire de saumon dans la gélose exposée à la fumée diminue son action létale. On peut donc penser que la chair de saumon piège certaines substances actives de la fumée, ce qui conduit alors à déterminer dans la composition du muscle les éléments susceptibles de réagir avec certains composants de la fumée.

#### *Influence de diverses substances pouvant être présentes dans le muscle*

Nous avons testé un certain nombre de composés constitutifs du muscle de poisson ainsi que des substances issues de la dégradation, en exploitant la même technique. Certaines substances n'ont provoqué aucune modification de l'action létale de la fumée, à savoir le glucose, les lipides ou le chlorure de sodium. D'autres se sont comportées comme des inhibiteurs de cette action bactéricide, et nos travaux ont permis de classer dans un ordre croissant d'activité inhibitrice l'albumine, les peptones, les acides aminés, la cadavérine et la putrescine.

Ces substances possèdent toutes une ou plusieurs fonctions amines. Le rôle de la fonction amine dans cette inhibition a été clairement mis en évidence en comparant les influences respectives du glucose et de la glucosamine sur l'action de la fumée: le glucose n'a aucune influence alors que la glucosamine diminue son action.

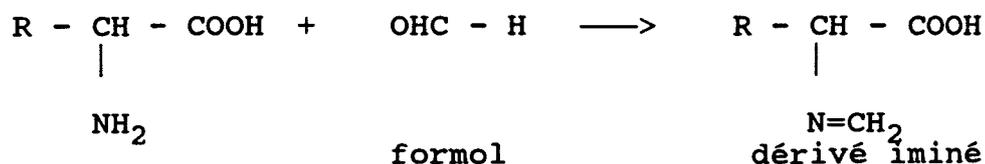
### 2.3. Incidence technologique de la qualité de la matière première

Nous avons déterminé parmi les constituants du tissu musculaire ceux qui sont susceptibles de réagir avec certaines substances actives de la fumée et d'inhiber ainsi partiellement son action antiseptique. Une corrélation a été mise en évidence entre la présence de fonctions amines libres et la réduction de cette action létale. Les fonctions amines libres des tissus du poisson se révèlent donc capables de réagir avec des composants de la fumée doués d'une activité bactéricide et de les rendre inactifs. L'implication dans cette réaction de divers composants antiseptiques de la fumée a été étudiée (MALLE, 1980.)

Les composants de la fumée jouant un rôle dans la conservation sont divers. Au début du siècle, on insistait particulièrement sur le rôle joué dans la conservation des produits alimentaires par le formol auquel on attribuait les propriétés antiseptiques des fumées de bois. En 1951, DIEUZEIDE faisant le point des connaissances dans ce domaine et rappelant que la distillation des ligno-celluloses en vase clos donnait de l'oxyde de carbone, des alcools méthylique et éthylique, de l'aldéhyde formique, de l'acide acétique, de l'acétone, du furfural, des xylènes, du créosol, du gaïacol, des dérivés du pyrogallol, etc ..., notait que la plupart de ces produits sont antiseptiques, le rôle principal était accordé à l'aldéhyde formique. Toutefois des travaux plus récents (TILGNER, 1967) soulignaient l'activité bactéricide essentielle des dérivés méthylés d'hydroxyphénols. Et ZAITSEV (1969) confirmait la contribution à l'action conservatrice de la fumée du formaldéhyde, des phénols et des acides organiques. Ainsi le rôle du formol restait indéniable, même s'il était démontré que les substances actives de la fumée sont nombreuses.

Il est permis de penser que dans nos expériences l'aldéhyde formique de la fumée réagit avec des fonctions amines libres appartenant à diverses substances: protéines, peptides, acides aminés et amines provenant de leur dégradation.

La réaction de condensation "aldéhyde-acide aminé" est bien connue:



une réaction équivalente pouvant s'effectuer entre l'aldéhyde formique et les fonctions amines libres des protéines, des peptides et de divers composés aminés:



Ainsi la réduction de l'action bactéricide de la fumée dans le tissu musculaire du saumon résulterait des réactions de condensation entre les fonctions amines libres de divers constituants du poisson et la fonction aldéhyde du formol, celui-ci perdant alors ses propriétés.

Nos travaux ont permis d'effectuer un classement de quelques substances inhibant l'action antiseptique de la fumée par ordre d'influence décroissante: la putrescine, la lysine, l'alanine, la peptone et la caséine. Comme le schéma de la protéolyse est le suivant: protéines --> peptides --> acides aminés --> amines de dégradation, nous avons constaté, en considérant les substances étudiées, que l'altération entraîne le remplacement des molécules existantes par des molécules douées d'une plus grande influence inhibitrice sur l'action de la fumée. La comparaison de ces substances possédant des fonctions amines nous a amenés à établir une corrélation entre l'augmentation du nombre de fonctions amines libres, résultant de la dégradation des chaînes protéiques, et la diminution de l'activité bactéricide de la fumée. Ceci signifie que la fumée sera d'autant moins efficace sur les bactéries que le poisson sera plus altéré. Il s'ensuit que dans un poisson ayant une charge bactérienne importante, la dégradation sera plus avancée et que l'action de la fumée en sera d'autant plus réduite. A l'inverse, la fumée se révélera plus efficace si la contamination bactérienne est faible. Il est donc vain d'espérer améliorer par le fumage un poisson en voie d'altération, mais l'action conservatrice de la fumée n'est pas négligeable sur un produit de qualité contenant une microflore réduite.

## **BUT DU TRAVAIL**

Le poisson est une denrée fragile et très altérable, d'une part pour diverses raisons biochimiques que nous avons exposées, notamment la richesse du tissu musculaire en eau et en substances azotées non protéiques ainsi que la faible teneur en protéines de soutien, d'autre part pour des raisons microbiologiques tenant essentiellement à la capacité de sa microflore à se développer aux températures habituelles de réfrigération.

La qualité du poisson "matière première" doit pouvoir être déterminée de manière fiable s'il est destiné directement à la consommation, mais plus encore s'il doit être transformé.

Les connaissances en thermobactériologie démontrent la relation entre la charge bactérienne du produit traité par la chaleur et la charge initiale, ainsi s'impose l'exigence d'une matière première peu contaminée, d'autant plus s'agissant du poisson qui ne supporte que des traitements thermiques modérés.

L'exemple du fumage ajoute des arguments d'ordre technologique pour exiger une matière première peu altérée, la dégradation du tissu musculaire compromettant le rôle conservateur de la fumée.

Dans tous les cas il convient d'apprécier la "fraîcheur" du poisson, en déterminant la charge bactérienne ou/et le niveau de dégradation du muscle. S'agissant d'un produit fragile et altérable, il est d'autant plus nécessaire de disposer de méthodes rapides d'évaluation. Face à la méthode organoleptique chiffrée qui permet une approche rapide et fiable si elle peut être appliquée dans son intégralité (cas restreint du poisson entier réfrigéré), s'est développé un large besoin de méthodes objectives qui respectent dans la mesure du possible l'impératif de la rapidité.

DEUXIEME PARTIE :

## MATERIELS ET METHODES

*Dans cette seconde partie une distinction est faite entre les méthodes classiques ou existantes d'une part, et les méthodes personnelles d'autre part, dont le descriptif est présenté dans un graphisme différent (méthodes personnelles : caractères de plus petite taille) .*

*Lorsque des méthodes personnelles ont nécessité d'importants travaux de mise au point, ceux-ci sont décrits dans les Résultats et Commentaires (troisième partie), également avec des caractères de petite taille.*

Parmi les méthodes utilisées sont décrites successivement les méthodes chimiques, qui permettent de doser des substances issues de la dégradation bactérienne, et les méthodes microbiologiques qui consistent à dénombrer des microorganismes ou à les utiliser dans différents tests.

## 1.METHODES CHIMIQUES

Le dosage des amines résultant du catabolisme des composés azotés du tissu musculaire constitue un axe majeur de recherche pour évaluer le niveau de dégradation. Les déterminations des teneurs en amines volatiles sont effectuées par des méthodes classiques d'entraînement à la vapeur ou de microdiffusion. La séparation et le dosage des amines biogènes peuvent être réalisés en H.P.L.C. : c'est le principe de la méthode de MIETZ et KARMAS, méthode existante à laquelle sera comparée la nouvelle méthode que nous avons mise au point.

### 1.1.DOSAGE DES AMINES VOLATILES

#### 1.1.1.Méthode d'entraînement à la vapeur

- *dosage de l'ABVT* (BILLON et al., 1979)

Pour obtenir un extrait de poisson exempt de protéines, on pèse 100 g de muscle de poisson auxquels on ajoute 200 ml de solution aqueuse d'acide trichloracétique à 7,5 %. Après homogénéisation et centrifugation à 2 000 tours/min. pendant 5 minutes, on filtre sur Buchner avec filtre Whatman n°3, ou sur filtre n°2 sans Buchner.

L'entraînement à la vapeur est réalisé avec un appareil de distillation de type Kjeldahl. On introduit 25 ml de filtrat dans le tube de distillation puis 6 ml d'hydroxyde de sodium à 10 %. On place sous l'extrémité du condenseur un bécher dans lequel ont été versés 10 ml de solution aqueuse d'acide borique à 4 % contenant 0,04 ml d'un indicateur mixte pour le titrage de l'ammoniaque (Merck 6130) constitué de rouge de méthyle et de vert de bromocrésol. On met en route la distillation et on prolonge l'entraînement à la vapeur jusqu'à ce que le bécher contienne exactement un volume final de 50 ml (40 ml de distillat). L'appareil est rincé avant chaque utilisation.

La solution d'acide borique étant devenue verte sous l'effet de l'alcalinisation produite par l'ABVT recueilli, on place le bécher sous une microburette graduée à 0,01 ml (ou une burette automatique) contenant une solution aqueuse d'acide sulfurique 0,1 N, et on titre jusqu'à complète décoloration (la chute de burette doit être lue précisément à ce stade, l'addition ultérieure d'une goutte d'acide sulfurique entraînera alors l'apparition d'une légère coloration rose).

Soit  $n$  le nombre de ml de solution d'acide sulfurique utilisés, le taux d'ABVT est égal à  $n \times 16,8$  mg d'azote pour 100 g de poisson.

*- dosage de la triméthylamine (MALLE et TAO, 1987)*

Un aménagement du mode opératoire de la détermination de la teneur en ABVT permet de doser uniquement la TMA : avant la distillation, on ajoute au filtrat 20 ml de formol (solution à 37 % minimum) pour bloquer les amines primaires et secondaires.

1.1.2. Méthode de Conway (CONWAY, 1962)

*- dosage de l'ABVT*

100 g de muscle de poisson sont homogénéisés dans 50 ml d'eau. Pour réaliser la défécation des protéines, on ajoute 50 ml de solution d'acide trichloracétique à 20 % et on homogénéise à nouveau. Après centrifugation à 2000 tours/min. pendant 5 minutes, on filtre.

La microdiffusion est réalisée dans une cellule de Conway. On met dans la couronne 1,5 ml d'eau distillée et 1 ml de filtrat. On met au centre de la cellule 1 ml d'acide borique à 1 % préparé comme suit : on dissout 10 g d'acide borique dans 200 ml d'alcool éthylique à 95 % et 700 ml d'eau ; on ajoute 10 ml d'un mélange de vert de bromocrésol à 0,033 % et de rouge de méthyle à 0,066 % (16,5 mg de vert de bromocrésol et 33 mg de rouge de méthyle dans 50 ml d'alcool éthylique à 95 %) ; on complète à 1 litre et on ajuste à pH 5.

On met rapidement dans la couronne 1 ml de solution saturée de carbonate de potassium à 112 % et on place immédiatement le couvercle enduit de vaseline. Par un mouvement de rotation, on mélange soigneusement le contenu de la couronne. L'incubation se fait à 35°C +/- 1°C pendant 2 heures, ou à la température du laboratoire pendant une nuit.

La solution d'acide borique devenue verte est neutralisée par de l'acide chlorhydrique 0,01 N en utilisant une microburette graduée à 0,01 ml. On titre jusqu'au retour à la couleur rose.

Soit  $n$  le nombre de ml d'acide chlorhydrique utilisés, le taux d'ABVT est égal à  $n \times 27,67$  mg d'azote pour 100 g de poisson.

*- dosage de la triméthylamine*

Le mode opératoire est analogue à celui du dosage de l'ABVT, la seule différence est la suivante : on met dans la couronne 1 ml de filtrat, 1 ml d'eau distillée et 0,5 ml de formol neutralisé.

## 1.2. DOSAGE DES AMINES BIOGENES

### 1.2.1. Principe

Les amines biogènes (cadavérine, histamine, putrescine, spermidine, spermine), extraites du poisson par une solution d'acide trichloracétique, sont dansylées (pour être détectées en U.V.) puis séparées et dosées par HPLC. En comparant à une méthode existante (MIETZ et KARMAS, 1978), nous proposons une " nouvelle méthode " fondée sur le même principe.

### 1.2.2. Matériels

#### a. Description du matériel HPLC

La chaîne est composée de :

- une colonne C18 KROMASIL 5 microns avec précolonne, thermostatée à 35 °c,
- deux pompes LC-6A Shimadzu,
- un mélangeur à billes,
- un spectrophotomètre SPD-6A Shimadzu,
- un programmeur System Controller SCL-6B Shimadzu,
- un intégrateur Chromatopac C-R3A Shimadzu,
- un injecteur automatique SIL-6B Shimadzu

(voir schéma Planche 1)

Les deux phases mobiles (eau et acétonitrile) sont reliées chacune à une pompe. Les débits de ces pompes sont sous contrôle du programmeur. Le mélange des deux phases se fait dans le mélangeur à billes à la sortie des pompes. Ce mélange transite par l'injecteur d'où il entraîne l'échantillon vers la précolonne. Le mélange passe dans la colonne où s'effectue la séparation et traverse le spectrophotomètre.

L'intégrateur est relié au programmeur duquel il reçoit le signal de départ et au spectrophotomètre duquel il reçoit les informations dont il tire les chromatogrammes.

**Réglage des paramètres:**

- Longueur d'onde du spectrophotomètre: 254 nm (UV)
- Injecteur automatique: volume injecté = 20  $\mu$ l
- Programmation du System Controller:
  - \* Paramètres constants (PARAM):
    - débit total T.FLOW = 1 ml/min
    - pression maximale P.MAX = 200 kgf/cm
    - taux de phase B (acétonitrile) dans le mélange  
B.CONC = 60 %
  - \* Programmation du gradient (TIME PROG):
    - entrer les variations de B.CONC au cours du temps
- Programmation de l'intégrateur:
  - \* Analysis parameter:
    - METHODS 0402
    - aire minimale prise en compte MIN.AREA 1000
    - vitesse de déroulement du papier SPEED 10
    - atténuation ATTEN réglée en fonction des concentrations
  - \* Time program:
    - définir les plages de temps correspondant aux pics intéressants pour les calculs d'intégration
  - \* Identification:
    - mode d'intégration MODE 121
    - marge d'erreur WINDOW 5
    - entrer les noms des composés et les temps de rétention correspondants

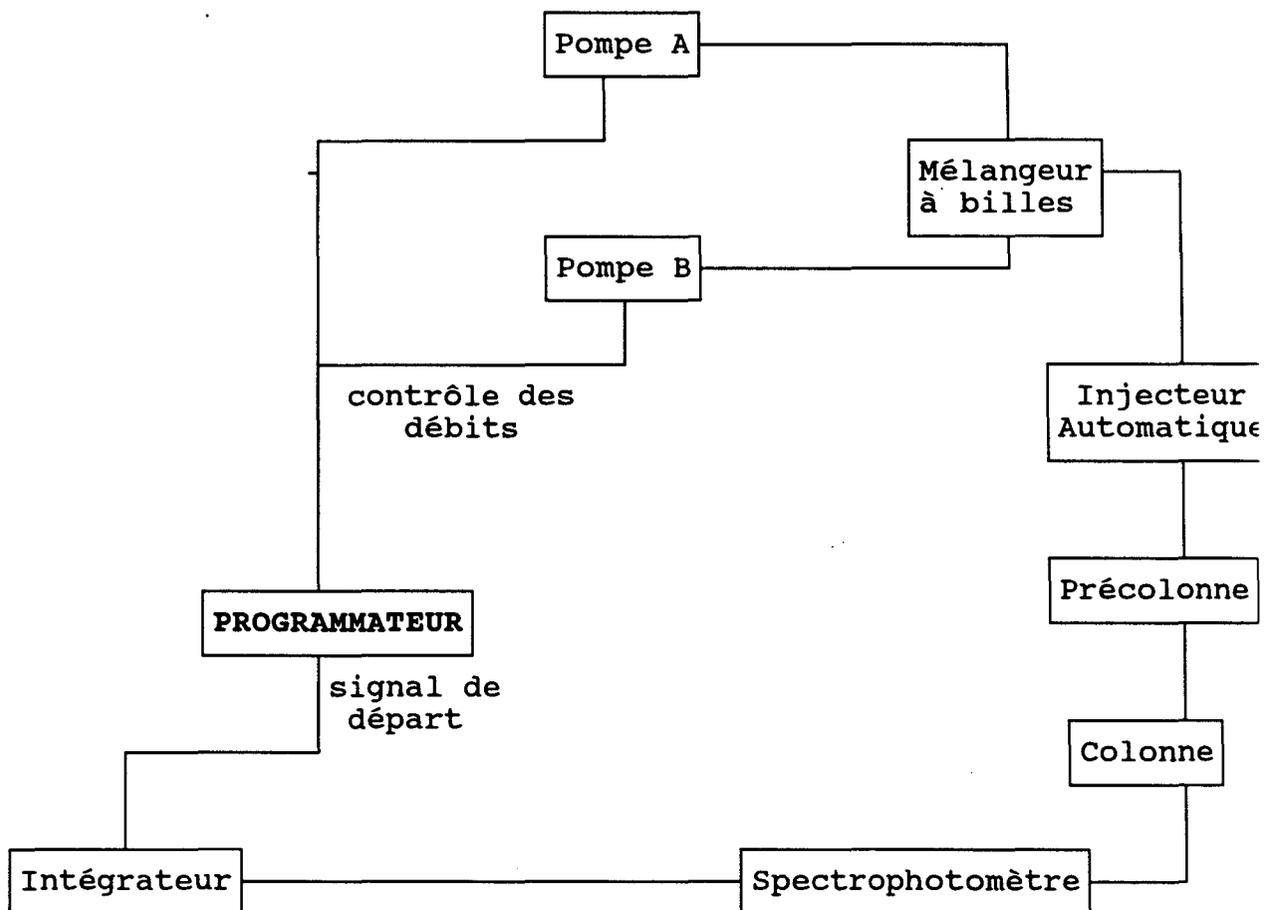


Planche 1: Schéma de fonctionnement du matériel HPLC

**b. Matériels divers**

*Méthode de Mietz et Karmas:*

- mixeur ultra turrax,
- balance,
- centrifugeuse,
- évaporateur rotatif,
- pipettes graduées de 10 ml, 5 ml,
- micropipette GILSON P1000,
- ampoules à décanter de 60 ml,
- ballons de 50 ml,
- fioles de 100 ml, 10 ml,
- entonnoirs, filtres plissés,
- erlenmeyers de 100ml,
- seringues 10 ml, filtres HPLC pour seringues 0,2 microns.

*"Nouvelle méthode"*

- mixeur ultra turrax,
- balance,
- centrifugeuse,
- évaporateur rotatif,
- pipettes graduées de 10ml, 5 ml,
- micropipette GILSON P1000,
- ballons de 100 ml,
- fioles de 10 ml, 100 ml,
- entonnoirs, filtres plissés,
- seringues 10 ml, filtres HPLC pour seringues 0,2 microns.

**c. Réactifs**

*Méthode de Mietz et Karmas :*

Extraction et dansylation:

- acide trichloracétique (TCA) à 7,5%,
- chlorure de sodium pour analyse,
- soude à 30%,
- mélange chloroforme-n butanol 50-50,
- n heptane,
- acide chlorhydrique 0,2 N,
- solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (9,6g/100ml d'eau et filtrer),
- solution saturée de chlorure de dansyl (500mg/100ml d'acétone) à conserver à 3°C,
- acétonitrile pour HPLC.

**Purification:**

- éther éthylique,
- acétonitrile pour HPLC,
- sulfate de sodium anhydre.

**Phase mobile:**

- eau pour HPLC,
  - acétonitrile pour HPLC,
- Ces solutions sont dégazées 1h aux ultra-sons avant utilisation.

**"Nouvelle méthode"**

**Extraction et dansylation:**

- solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium (9,6g/100ml d'eau et filtrer),
- solution saturée de chlorure de dansyl (500mg/100ml d'acétone) à conserver à 3°C,
- acétonitrile pour HPLC.

**Purification :**

- éther éthylique,
- acétonitrile pour HPLC,
- sulfate de sodium anhydre.

**Phase mobile:**

- eau pour HPLC,
  - acétonitrile pour HPLC.
- Ces solutions sont dégazées 1h aux ultra-sons avant utilisation.

**Standards (SIGMA Chemical Company):**

- putrescine dichlorhydrate  
(diamino 1,4 butane dichlorhydrate)  
putrescine = 88,15 g/mol
- cadavérine dichlorhydrate  
(diamino 1,5 pentane dichlorhydrate)  
cadavérine = 102,18 g/mol
- histamine dichlorhydrate  
histamine = 111,07 g/mol
- spermidine trichlorhydrate  
(N (3 aminopropyl) 1,4 butanediamine trichlorhydrate)  
spermidine = 145,27 g/mol
- spermine tetrachlorhydrate  
(N,N' Bis (amino 3 propyl) 1,4 butanediamine tetrachlorhydrate)  
spermine = 202,35 g/mol
- 1,3 diaminopropane dichlorhydrate  
diaminopropane = 74,13 g/mol

### 1.2.3. Méthodes

#### a. extraction trichloracétique des amines biogènes du poisson

- placer 50g de poisson dans 1 tube à centrifuger,
- ajouter 50 ml de TCA à 7,5%,
- broyer à l'ultra turrax,
- centrifuger 10 minutes à 2500 t/min,
- récupérer le surnageant dans 1 fiole de 100ml après filtration,
- répéter l'opération en ajoutant 50 ml de TCA au culot de centrifugation,
- après broyage et centrifugation, transvaser le surnageant dans la fiole,
- ajuster le volume à 100ml avec du TCA.

#### b. extraction et dansylation selon la méthode de MIETZ et KARMAS (Planche 2 : page 45) :

On part de 10 ml d'un extrait de poisson au TCA à 7,5% (ou de 0,5 ml de la solution standard - contenant 4 mg de chacune des amines pures dans 40ml de NaHCO<sub>3</sub> - dans 9,5 ml de TCA à 7,5%) dans un tube à centrifuger. On ajoute 4g de chlorure de sodium pour rendre la phase aqueuse plus dense, 1 ml de soude à 30% et 5 ml d'un mélange chloroforme-butanol ou de butanol seul. On agite et on centrifuge 5 minutes à 2500 t/min. On vérifie que le pH est bien supérieur à 9. La phase organique (supérieure) est récupérée dans une ampoule à décanter de 60 ml. On répète l'extraction deux fois sur le culot de centrifugation.

Aux phases organiques réunies dans l'ampoule, on ajoute 15 ml d'heptane (rendant le mélange avec le chloroforme moins dense que la phase aqueuse). On extrait trois fois avec 1 ml d'acide chlorhydrique. Le pH doit être inférieur à 3.

L'extrait obtenu est évaporé à 35°C sous vide et récupéré par 0,5 ml d'hydrogénocarbonate de sodium. Il faut ajuster le pH à 9. On ajoute 2 ml de chlorure de dansyl et on dansyle 1 heure au bain marie à 60°C. On ajuste le volume à 10 ml avec de l'acétonitrile.

#### c. extraction et dansylation selon une nouvelle méthode (Planche 2)

On part de 10 ml d'extrait de poisson dans le TCA à 7,5% (ou de la solution standard d'amines dans 9,5 ml de TCA à 7,5%) dans un ballon d'évaporation. L'extrait est évaporé à 35°C sous vide.

On récupère l'extrait évaporé avec 5 ml d'hydrogénocarbonate de sodium et on ajoute 10 ml de chlorure de dansyl (le pH doit être supérieur à 9). On dansyle 1 heure au bain-marie à 60°C.

On évapore sous vide partiel à 30°C, on récupère l'extrait évaporé avec trois fois 2,5 ml d'acétonitrile et on ajuste le volume à 10 ml avec de l'acétonitrile.

d. purification de l'extrait dansylé commune à la méthode de Mietz et Karmas et à la nouvelle méthode

Après dansylation l'extrait est repris et filtré avec 15 ml d'eau distillée dans une ampoule à décanter de 60 ml. On extrait trois fois avec 5 ml d'éther éthylique. On récupère dans un erlenmeyer la phase étherée (supérieure) et on ajoute du sulfate de sodium anhydre. On laisse reposer au froid. On récupère dans un ballon d'évaporation avec 5 ml d'éther anhydre et on évapore sous vide partiel à 35°C. L'extrait évaporé est repris avec 2,5 ml d'acétonitrile. On ajuste le volume à 10 ml avec de l'acétonitrile.

e. protocole témoin (Planche 2) (étalon interne - correction des pertes)

0,5 ml d'extrait sont mélangés à 2 ml de chlorure de dansyl. Le pH doit être supérieur à 9. On dansyle 1 h à 60°C. Le volume est ensuite ajusté à 10 ml avec de l'acétonitrile puis passé sur un filtre de 0,2 microns avant l'injection dans la colonne.

Dans tous les cas (méthode de MIETZ et KARMAS, "nouvelle méthode", protocole témoin), les solutions ajustées à 10 ml sont filtrées (0,2 microns) avant d'être injectées dans la colonne.

---

**METHODE DE MIETZ ET KARMAS**

10 ml d'extrait TCA  
(0,5 ml Sol. Amines ds  $\text{NaHCO}_3$   
9,5 ml TCA 7,5%)

3 extractions Chloroforme-Butanol  
ou butanol seul  
pH > 9  
3 extractions HCl  
pH < 3

Evaporation (35°C)

Neutralisation (0,5 ml  $\text{NaHCO}_3$ )  
pH > 9

Dansylation 1 h à 60°C (2ml CD)

(Purification  
3 ext. éther)

Compléter à 10 ml (acétonitrile)

Injection

**"NOUVELLE METHODE"**

10 ml d'extrait TCA  
(0,5 ml Sol. Amines ds  $\text{NaHCO}_3$   
9,5 ml TCA 7,5%)

Evaporation (35°C)

Neutralisation (5 ml  $\text{NaHCO}_3$ )  
pH > 9

Dansylation 1 h à 60°C (10ml CD)

(Purification  
3 ext. éther)

Evaporation (35°C sous vide partiel)

Résidu + 3 x 2,5 ml acétonitrile

Compléter à 10 ml (acétonitrile)

Injection

---

**PROTOCOLE TEMOIN**

0,5 ml Sol. Amines ds  $\text{NaHCO}_3$   
2 ml CD  
pH > 9

Dansylation 1 h à 60°C

Compléter à 10 ml (acétonitrile)

Injection

## 2. METHODES MICROBIOLOGIQUES

Il convient de distinguer parmi les méthodes microbiologiques celles qui consistent à utiliser des microorganismes dans différents tests, notamment ici pour étudier la réduction du TMAO ou les activités peptidasiques, et celles qui consistent à dénombrer des microorganismes, que ce soit par les méthodes pasteuriennes classiques ou par des méthodes nouvelles dites rapides. Parmi ces dernières, l'épifluorescence permet un dénombrement direct des bactéries, la bioluminescence permet une évaluation indirecte par mesure de l'ATP bactérien.

### 2.1. Protocole d'étude de la réduction de l'oxyde de triméthylamine par diverses souches bactériennes

Cette étude a nécessité la mise au point d'un milieu spécifique et d'une technique de dénombrement des bactéries inoculées. Cette partie du protocole expérimental est présentée dans *les résultats et commentaires (page 62)*. Les autres éléments sont les suivants :

#### 2.1.1. Souches bactériennes testées

Les souches bactériennes proviennent de trois sources : la Collection de l'Institut Pasteur (C.I.P.), l'Institut Agricole et Alimentaire de LILLE et l'Unité d'études des produits de la pêche du CNEVA de BOULOGNE SUR MER.

Les espèces bactériennes testées sont les suivantes :

*Acinetobacter calcoaceticus*  
*Aeromonas hydrophila*  
*Aeromonas sub. sp. anaerogenes*  
*Alcaligenes faecalis*  
*Alteromonas communis*  
*Alteromonas putrefaciens*  
*Bacillus cereus*  
*Bacillus subtilis*  
*Bacteroides fragilis*  
*Citrobacter bethesda*  
*Citrobacter freundii*  
*Citrobacter intermedius*  
*Clostridium bifermentans*  
*Enterobacter aerogenes*  
*Enterobacter cloacae*  
*Escherichia coli K10*  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Proteus mirabilis*  
*Proteus morganii*  
*Pseudomonas atlantica*  
*Pseudomonas fluorescens*  
*Pseudomonas nautica*  
*Pseudomonas putrefaciens*

*Salmonella brandenburg*  
*Salmonella montevideo*  
*Salmonella newport*  
*Salmonella panama*  
*Salmonella paratyphi A*  
*Salmonella typhimurium*  
*Serratia marcescens*  
*Shigella sonnei*  
*Vibrio parahaemolyticus*  
*Yersinia enterocolitica*

### 2.1.2 Précultures

- Les souches bactériennes aérobies sont mises en préculture sur gélose inclinée. Après vérification de leur pureté, elles sont mises à incuber à 30°C pendant 18 heures.

- La préculture des bactéries anaérobies est réalisée sur milieu liquide Rosenow cystéiné recouvert d'1 ml d'huile de paraffine stérile. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 18 heures.

### 2.1.3. Incubation des milieux inoculés

Chaque souche bactérienne est inoculée dans 9 tubes répartis en 3 lots.

Le premier lot est placé dans un incubateur réfrigéré à 8°C. Les 3 tubes sont prélevés respectivement après 9, 11 et 15 jours d'incubation.

Le second lot est mis à incuber à une température de 20°C dans un bain-marie thermostaté. Les tubes sont prélevés après 2, 3 et 4 jours.

L'incubation du troisième lot est effectuée à 25°C dans un bain-marie thermostaté et les tubes sont prélevés après 12 h, 24 h et 48 h.

### 2.1.4. Dosage de la TMA produite

A l'issue de l'incubation, la production de TMA résultant de la réduction du TMAO est déterminée par la méthode de Conway. Les aménagements sont les suivants :

- *Préparation de l'échantillon :*

- . prélever 4 ml de culture (sous l'huile de paraffine),
- . ajouter 4 ml d'acide trichloracétique à 10 %,
- . homogénéiser (Vortex),
- . centrifuger 5 minutes à 3000 t/min. ,
- . prendre le surnageant pour effectuer le dosage.

- *Expression du résultat :*

- . n : volume d'acide chlorhydrique 0,01 N utilisé (en ml),
- . M1: masse des 4 ml de culture estimée à 4 g,
- . M2: masse d'acide trichloracétique :  
4 x 1,048 = 4,192 g
- . (n x 14 x 0,01) : quantité d'azote dans le surnageant (en mg)
- . d : densité du surnageant estimée à 1,036.

Pour les 4 ml de culture, la quantité de TMA est égale à

$$\frac{n \times 14 \times 0,01 \times (M 1 + M 2)}{1 \times d} = n \times 1,107027$$

Pour 100 ml de culture :

$$\underline{TMA = n \times 27,67 \text{ mg N}/100 \text{ ml de culture}}$$

## 2.2. Dénombrement des flores aérobies par la méthode d'inclusion

milieux de culture :

.Le diluant utilisé pour préparer la solution mère et effectuer les dilutions est le Tryptone sel, dont la composition est la suivante :

- tryptone..... 1 g
- chlorure de sodium..... 8,5 g
- eau distillée..... q.s.p 1 l

.Les milieux solides employés pour le dénombrement des flores aérobies totales sont :

- pour les germes aérobies mésophiles et psychrotrophes : la gélose standard pour dénombrement : Plate Count Agar = P.C.A. (BIOKAR),

- pour les halophiles modérés : le P.C.A. préparé avec une eau de salinité 3,5 %, teneur correspondant à celle de l'eau de mer.

techniques de dénombrement :

- préparation de l'échantillon :

10 g de muscle prélevés aseptiquement sont placés dans un sac Stomacher. Pour obtenir une suspension-mère au 1/10, 90 ml de diluant y sont ajoutés et l'ensemble est broyé au Stomacher.

- ensemencement :

Après homogénéisation le flacon contenant la suspension-mère est laissé à la température du laboratoire (20°C +/- 2°C) pendant 30 minutes pour restituer aux bactéries leur potentiel de croissance. Après cette revivification, l'ensemencement des milieux est pratiqué en portant 1 ml de la suspension-mère ou de la dilution appropriée dans une boîte de Petri. On ajoute 3 gouttes de chlorure de triphényltétrazolium (T.T.C. à 0,2 %) avant de couler la gélose.

- incubation :

L'incubation est effectuée 72 heures à 30 °c pour la flore mésophile et cinq jours à 20°C pour la flore psychrotrophe.

## 2.3 Mesures d'activités peptidasiques

### 2.3.1 Dégradation de substrats spécifiques

- *Principe* :

On fournit à la population bactérienne présente dans un broyat de poisson un substrat synthétique comprenant un acide aminé et un chromogène. Après incubation, on mesure la quantité de chromogène libéré par l'action des endopeptidases bactériennes.

- *Réactifs* :

. tampon phosphate 0,1 M, pH = 7,00, stérile,

. substrats en solution à 0,1 % dans le tampon précédent (solutions stérilisées par filtration) :

\* A : leucyl glycine  $\beta$  naphthylamide,  
SIGMA L 6377

\* B : glutaryl-glycyl-glycyl phényl - alanine  $\beta$  naphthylamide,  
SIGMA G 4636

- \* C : N benzoyl DL arginine p-nitroanilide,  
SIGMA B 4875
- \* D : L valine  $\beta$  naphthylamide,  
SIGMA V 6001
- \* E : L cystine di  $\beta$  naphthylamide,  
SIGMA C 9005
- \* F : glutaryl L phénylalanine p nitroanilide,  
SIGMA G 2505

Remarque : la  $\beta$  naphthylamine étant réputée cancérigène, il est impératif d'employer les précautions d'usage (ne pas pipetter à la bouche, porter des gants).

*- Mode opératoire :*

- . prélever stérilement 10 g de muscle dans la partie dorsale sous la peau préalablement nettoyée à l'alcool,
- . broyer et homogénéiser dans 90 ml de tampon,
- . laisser décanter 15 minutes,
- . prélever 0,5 ml de broyat clarifié (au fond du bol) et les ajouter à 0,5 ml de solution de substrat dans tube à hémolyse,
- . faire un témoin blanc avec 1 ml d'eau distillée,
- . incuber les tubes 2 heures à 37 °C (bain-marie).

### 2.3.2 Dosage des chromogènes libérés

*- Principe :*

Les dosages de la  $\beta$  naphthylamine et de la p-nitroaniline sont effectués par des méthodes très voisines mises au point, respectivement, par MARTINEK et al. (1964), et par NAFTALIN et al. (1969).

Elles reposent sur les réactions suivantes :

$\beta$  naphthylamine + NaNO<sub>2</sub> + N (1 Naphthyl) éthylènediamine --> composé bleu.

p.nitroaniline + NaNO<sub>2</sub> + N (1 Naphthyl) éthylènediamine --> composé rose.

- *Réactifs* :

- . HCl 2,0 N,
- . solution aqueuse de nitrite de sodium à 0,2 % (P/V) à préparer extemporanément,
- . solution aqueuse de sulfamate d'ammonium à 1% (P/V),
- . solution alcoolique de N (1 Naphthyl) Ethylènediamine à 0,05 %.

- *Mode opératoire* :

- . sortir les tubes du bain-marie et ajouter immédiatement 0,5 ml d'HCl 2,0 N, passer au Vortex,
- . ajouter 0,5 ml de solution de nitrite de sodium, passer au Vortex et attendre 3 minutes,
- . ajouter 2 ml de solution de N (1 Naphthyl) Ethylènediamine, passer au Vortex,
- . attendre 40 minutes,
- . centrifuger 5 minutes à 4 000 tours/min.,
- . lire la densité optique à 550 nm, le zéro étant fait avec le témoin.

### 2.3.3 Etude de la compétition entre substrats

- réactifs :

- . casamino acid = solutions contenant 0 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 mg par ml (E.D.)  
(casamino acid : hydrolysate chlorhydrique de caséine neutralisé à la soude).

- mode opératoire :

- sur du maquereau d'indice 2,1, le test avec le substrat F (glutaryl phénylalanine p. nitroanilide) a été répété 5 fois sur le même échantillon selon le mode opératoire précédent mais en ajoutant respectivement à chaque prélèvement de broyat initial 0,5 ml des 5 solutions de casamino acid.

## 2.4 Test de réduction de l'oxyde de triméthylamine appliqué à l'appréciation de la qualité du poisson

### 2.4.1 Principe

Dans le muscle de poisson, lorsque l'oxygène est consommé, le TMAO est utilisé par les bactéries comme accepteur final d'électrons. Dans le but de reproduire le phénomène naturel de la réduction du TMAO, on fournit in vitro aux bactéries présentes dans un broyat de poisson du TMAO en conditions microaérophiles ou anaérobies. La triméthylamine (TMA) produite est l'expression de l'activité des populations bactériennes présentes.

### 2.4.2 Mesure de la réduction du TMAO

Sur ces bases, nous avons mis au point une technique permettant de déterminer l'aptitude de la microflore présente dans un broyat de poisson à réduire le TMAO. Dans cette procédure décrite en annexe (MALLE et al., 1986 : annexe 6) est défini un milieu de culture approprié contenant du TMAO et permettant la croissance d'une microflore directement impliquée dans le processus d'altération. Le test comporte une mesure de l'évolution du pH après 8 heures d'incubation pour évaluer la réduction du TMAO en TMA.

Pour des raisons exposées plus loin (page 103), nous avons réaménagé ce test en remplaçant la mesure du pH par le dosage de la TMA et en portant la durée d'incubation à 17 heures.

- *composition du milieu*

( Pour obtenir une réponse rapide, il faut inoculer un grand nombre de bactéries et donc mélanger un volume important de broyat avec un volume minimum de milieu. Différents essais ont conduit à retenir le rapport de 1/9 et à concentrer le milieu en conséquence. Dans la nouvelle forme du test, nous avons gardé la composition du milieu que nous avons mis au point dans les travaux cités ci-dessus).

milieu concentré :

TMAO..... 50 g  
Glucose..... 1,8 g  
Nacl..... 50 g  
Formiate de sodium..... 17 g  
Eau distillée.....qsp 1l

Le milieu concentré est réparti en tubes puis stérilisé à 121 °c pendant 20 minutes.

- *mode opératoire*

inoculation du milieu et incubation :

Dans un tube à hémolyse, on ajoute à 4,5 ml de suspension-mère en eau peptonée 0,5 ml de milieu concentré. L'ensemble est recouvert par 1 cm d'huile de paraffine stérile et incubé 17 heures au bain-marie à 20 °c ou 25 °c.

dosage de la TMA :

. préparation de l'extrait déprotéinisé :

Après incubation, on prélève 3 ml sous l'huile de paraffine, auxquels on ajoute 3 ml d'acide trichloracétique à 10 % (M/V). On mélange au Vortex puis on centrifuge 5 minutes à 3000 tours/min.

. dosage :

Sur le surnageant obtenu, le dosage de la TMA est effectué par la méthode de Conway.

. expression du résultat :

Les teneurs de TMA produite sont exprimées en mg d'azote pour 100 g de poisson.

1 ml de défécât correspond à 0,045 g de poisson. Le dosage est effectué avec de l'Hcl 0,01 N : 1 mole d'HCl correspond à 1 mole d'amine.

Soit X ml d'HCl versés :

$$Y = X \times 14 \times 0,01 \text{ mg d'azote} / 0,045 \text{ g de poisson}$$

$$Y = X \times 311,11 \text{ mg} / 100 \text{ g de poisson}$$

Y correspond à la TMA présente après incubation. La quantité de TMA réellement produite dans le test est obtenue en enlevant à cette valeur globale Y la TMA endogène.

## 2.5. Mise au point d'une technique de filtration

Les applications des techniques d'épifluorescence et de bioluminescence ATP à l'évaluation de la qualité microbiologique du poisson nécessitent un traitement enzymatique de l'échantillon avant la filtration. En effet la séparation des bactéries du substrat est particulièrement difficile dans de nombreuses espèces de poissons, et dans le cas de faibles contaminations il faut pouvoir filtrer des volumes importants pour concentrer les bactéries sur la membrane filtrante et abaisser la seuil de détection.

### 2.5.1. Hydrolyse enzymatique de la suspension mère

**- Réactifs :**

- . bouillon tryptone sel,
- . papaïne (SIGMA. P 3125) 25 mg de protéine par ml (19 unités par mg de protéine ; 1 unité hydrolyse 1 micromole de N benzoyl L arginine éthyl ester par minute à pH 6,2 et 25°C),
- . trypsine MARTINET à 2000 unités CODEX pour 15 ml de solvant.

**- Matériel :**

- . éprouvette et bécher de 100 ml,
- . broyeur STOMACHER,
- . sachets à filtre incorporé type BAGFILTER (permettant de réaliser une préfiltration).

**- Mode opératoire :**

- . introduire 10 mg de muscle de poisson dans un sachet BAGFILTER,
- . broyer 1 minute au STOMACHER dans 90 ml de bouillon de tryptone sel (le choix du tryptone sel permet d'éviter les problèmes de fluorescence rencontrés avec l'eau peptonée),
- . récupérer le broyat clarifié et le soumettre à l'hydrolyse enzymatique 30 minutes à 37°C à raison de 0,5 ml de trypsine et 40 microlitres de papaïne pour 10 ml.

### 2.5.2. Filtration de l'hydrolysate

- Matériel :

- . seringues de 20 ml stériles,
- . porte-filtres SARTORIUS autoclavables.
- . préfiltres en verre SARTORIUS de porosité 20  $\mu$  (réf 13400),
- . membranes filtrantes en nitrate de cellulose, de diamètre 25 mm, de porosité 0,45  $\mu$  : noires pour la méthode DEFT (réf. 13006), blanches pour l'ATP métrie (réf. 11306).

- Mode opératoire :

- . placer 2 porte-filtres en série, le premier contenant un préfiltre 20  $\mu$ , le second un filtre 0,45  $\mu$  (placé sur un préfiltre qui sert de support à la membrane filtrante),
- . injecter l'hydrolysate à l'aide d'une seringue stérile.

### 2.6. Dénombrement de la microflore totale en épifluorescence (Direct Epifluorescence Filter Technique)

#### 2.6.1. Principe

Face aux techniques classiques basées sur le principe du dénombrement des " unités formant colonies " après culture sur des milieux gélosés, une technique rapide consiste à compter directement les bactéries. Pour faciliter l'observation, on a recours aux techniques de fluorescence, celle-ci étant due à une coloration spécifique qui rend les bactéries plus " visibles ". Soumise à un rayon incident (U.V.), la bactérie " fluorescente " réémet, après absorption, une radiation de plus grande longueur d'onde : c'est l'épifluorescence.

Le colorant fluorescent utilisé est l'acridine orange (3,6 bis - diméthyl amino - acridine) qui a la propriété de se fixer de façon spécifique sur les acides nucléiques de toutes les cellules. On considère classiquement que la couleur obtenue est différente selon que le colorant est fixé sur l'acide ribonucléique (RNA) ou sur l'acide désoxyribonucléique (DNA). En présence d'U.V., les chaînes de RNA fluorescent en orange, et les chaînes de DNA en vert. Or, les quantités de DNA et de RNA dans un microorganisme sont différentes selon son état. En effet, un microorganisme est "actif" lorsqu'il est capable de se multiplier, c'est-à-dire lorsque sa synthèse est intense. Comme celle-ci est pilotée par les messages transportés par le RNA alors présent en quantité importante, les bactéries dans cet état émettent une fluorescence orange (rapport RNA/DNA élevé). Par contre, lorsqu'une bactérie ne se reproduit plus, le taux de RNA diminue et, comme le DNA reste constant plus longtemps, le rapport s'inverse en faveur de ce dernier et les bactéries présentent une fluorescence verte : ces bactéries " inactives " ne sont pas dénombrées.

Le comptage visuel des microorganismes est effectué après concentration et coloration sur membrane filtrante, sous microscope à épifluorescence (lampe à vapeur de mercure haute pression).

#### 2.6.2. Réactifs :

- solution aqueuse de Tween 80 à 0,5 %,
- solution d'acridine orange à 0,025 % préparée à partir d'une solution à 2,5 % dans un tampon à pH = 6 et conservée au réfrigérateur,
- isopropanol,
- huile à immersion non fluorescente.

#### 2.6.3. Matériel :

- seringues de 2,5 et 10 ml stériles,
- dispositifs de filtration à usage unique de porosité 0,2  $\mu$  MINISART NML N.D.,
- lames de verre,
- microscope à épifluorescence OLYMPUS BH-2 avec filtre EY.455.

#### 2.6.4. Coloration :

- après filtration de l'hydrolysate, remplacer le préfiltre 20  $\mu$  par un filtre de 0,2  $\mu$ ,
- filtrer 5 ml de Tween 80 à 0,5 % préchauffé à 50°C,
- filtrer 2,5 ml de solution d'acridine orange à 0,025 % et laisser agir 3 minutes,
- filtrer 5 ml de Tween 80 à 0,5 %,
- filtrer 5 ml d'isopropanol pur pour éliminer l'excès de colorant sur la membrane,
- enlever le filtre 0,2  $\mu$  puis injecter de l'air à l'aide d'une seringue pour chasser le volume de liquide restant,
- démonter le porte-filtre et récupérer la membrane filtrante en la séparant de la membrane support,
- coller sur lame de verre et laisser sécher à température ambiante,
- observer au microscope à épifluorescence sans lamelle et à l'aide d'une huile à immersion non fluorescente.

#### 2.6.5. Dénombrement des bactéries

Les lames sont examinées le jour de leur préparation. Les agglutinats de cellules qui fluorescent en orange, rouge-orangé, jaune-orangé et brun-orangé sont comptés dans des champs choisis au hasard et dont le nombre varie en fonction de la densité cellulaire.

Pour ramener le comptage au nombre de bactéries par gramme de poisson, on doit calculer le facteur microscopique : FM.

$$FM = \frac{\text{surface exploitable de la membrane}}{\text{surface du champ microscopique}}$$

Le joint utilisé sur le porte-filtre a un diamètre de 21 mm, soit une surface exploitable :  $Se = 346,36059 \text{ mm}^2$ .

L'observation s'effectue à l'objectif 100, ainsi le diamètre du champ observé sera :

$$\frac{\text{diamètre du champ oculaire}}{\text{grossissement de l'objectif} \times \text{grossissement du corps}}$$

$$\text{soit : } \frac{18}{100 \times 1,25} = 0,144 \text{ mm}^2$$

D'où une surface du champ microscopique :  $S_c = 0,016286 \text{ mm}^2$

$$\text{donc : } FM = \frac{346,36059}{0,016286} = 21267,382$$

Une bactérie observée dans un champ correspond à la présence de 21.267 bactéries sur la membrane soit, pour 10 ml de broyat au 1/10 filtré, 21.267 bactéries par gramme de poisson analysé. Ceci représente le seuil théorique de détection qui varie en fonction du volume filtré.

Lorsque le champ est trop chargé, on a recours à un quadrillage de 100 carrés, adapté sur le microscope au niveau de l'oculaire.

Le quadrillage fait 0,1 mm de côté, soit une surface de 0,01 mm<sup>2</sup>.  
La surface du champ est de 0,016286 mm<sup>2</sup>.

Le rapport : Surface du champ / Surface du quadrillage est donc de 1,6286.

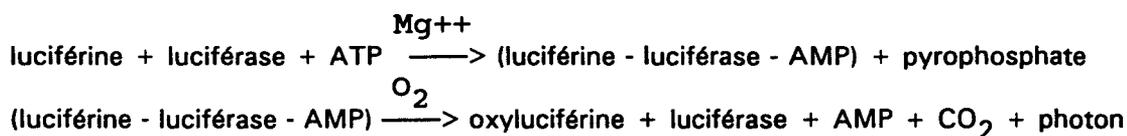
Une bactérie dénombrée dans un carré correspondra donc à :

$1 \times 100 \times 1,6286 \times 21267,382 = 3,4636 \cdot 10^6$  bactéries sur la membrane, ce qui correspond au nouveau Facteur Microscopique.

## 2.7. Appréciation de la qualité microbiologique par bioluminescence

### 2.7.1. Principe

Une autre technique rapide abandonnant le principe du dénombrement des "unités formant colonies" consiste en une détermination quantitative de l'ATP bactérien. L'adénosine triphosphate (ATP) est la molécule énergétique essentielle de toutes les cellules vivantes, y compris les bactéries, elle est la forme universelle de transfert d'énergie des systèmes producteurs aux systèmes consommateurs. La bioluminescence est la technique permettant d'estimer la quantité d'ATP contenue dans un échantillon en utilisant un système enzymatique, la luciférase, et son substrat, la luciférine, permettant une émission de lumière mesurable. L'ATP présent est mis en évidence par la réaction suivante :



La quantité de lumière émise est proportionnelle à la quantité d'ATP : 1 photon est émis pour 1 molécule d'ATP consommée. Les photons libérés sont captés par un tube photomultiplicateur. La valeur donnée par l'appareil en Unités Relatives de Lumière (URL) est directement liée à la quantité d'ATP présente dans un milieu, ce qui permet d'établir une relation entre la quantité d'ATP mesurée et le nombre de bactéries présentes dans le milieu (JOUVE et al., 1981 ; CARLIER et al., 1983 ; GRAND, 1983 ; BIGRET, 1984).

Dans les applications alimentaires la difficulté est de différencier l'ATP bactérien de l'ATP provenant des cellules somatiques. L'abondance de ces dernières dans la viande a conduit des chercheurs à effectuer une double filtration (LITTEL et al., 1986) : la préfiltration a pour but d'éliminer les cellules contenant l'ATP somatique, le second filtre est traité par un enzyme pour hydrolyser l'ATP libre, puis la paroi des bactéries est perméabilisée pour libérer l'ATP bactérien dont on peut alors estimer la quantité. WARD et al. (1986) ont proposé d'effectuer des mesures sur le poisson frais en reprenant la même démarche et en recourant à un étalon interne constitué de 100 µl ATP. La technique proposée par ROSSERO et al. (1987) pour l'appréciation de la qualité microbiologique des viandes hachées s'inspire également de celle de LITTEL et al. : à la suite d'une préfiltration un traitement trypsique précède la filtration, ensuite sont réalisées la destruction de l'ATP somatique puis la libération et la mesure de l'ATP bactérien.

### 2.7.2 Réactifs

- bouillon LT 100 conservé à 3°C (Diagnostics PASTEUR),
- N.R.S. : Nucleotide Releasing Reagent for Somatic cells (LUMAC/3M) conservé à 3°C,
- N.R.B. : Nucleotide Releasing Reagent for Microbial cells (LUMAC 3/M) conservé à 3°C,
- lumit buffer : tampon HEPES 0,025 M, pH 7,75 (LUMAC 3M),
- lumit PM : complexe luciférine - luciférase hautement purifié, lyophilisé, reconstitué avec 7 ml de tampon (LUMAC 3/M).
- somase TM : ATPase lyophilisée reconstituée avec 1 ml de tampon (LUMAC 3/M).

Remarque : Des aliquotes des enzymes (somase et lumit PM) peuvent être congelés juste après reconstitution et conservés au congélateur 2 à 3 semaines. Les autres produits sont conservés à 3°C.

### 2.7.3. Matériel

- Biocounter M 2010 A distribué par la société LUMAC/3 M,
- lumacuvettes conservées à l'abri de la lumière,
- boîtes de Petri : 35 x 10 mm.

#### 2.7.4. Mode opératoire

Sur la base des modes opératoires cités précédemment, nous avons aménagé le protocole suivant :

- après la filtration de l'hydrolysate (traitement trypsine + papaïne), récupérer stérilement la membrane qui a retenu les bactéries,
- la placer dans une boîte de Petri (35 x 10mm),
- ajouter 250  $\mu$ l de bouillon LT 100,
- au bout de 15 minutes, ajouter 250  $\mu$ l de NRS et 10  $\mu$ l de somase : l'extraction et l'hydrolyse de l'ATP somatique se font à température ambiante durant 30 minutes,
- ajouter 500  $\mu$ l de NRB et faire la lecture au bout de 10 secondes en procédant ainsi:
  - . placer 200  $\mu$ l du mélange précédent, dans la lumacuvette auxquels on ajoute 100  $\mu$ l de LUMIT PM,
  - . faire la mesure immédiatement,
  - . retirer la valeur du blanc.

Le résultat est exprimé en URL (unités relatives de lumière) et correspond à 1 g pour une filtration de 10 ml. Lors d'une filtration de 20 ml, il convient de diviser par 2 pour obtenir le résultat en URL/g.

TROISIEME PARTIE :

## RESULTATS ET COMMENTAIRES

*Pour faciliter la lecture de cette troisième partie, un condensé schématique est proposé sur la planche 3. "Les mises au point de méthodes personnelles" sont présentées sur la partie gauche de la planche avec des caractères de petite taille. Les résultats des travaux sont présentés sur la partie droite. Cette planche peut permettre au lecteur de faire éventuellement abstraction des aspects méthodologiques pour s'intéresser directement aux différentes études.*

*Dans le texte, les paragraphes relatifs à "la méthodologie" se différencient également des paragraphes consacrés aux résultats des expérimentations par des caractères de petite taille.*

---

## 1. REDUCTION DE L'OXYDE DE TRIMETHYLAMINE PAR DIVERSES SOUCHES BACTERIENNES

- mise au point d'une technique permettant de tester des souches pures p.63
- étude quantitative de la production de TMA par diverses souches bactériennes p.65

## 2. EVOLUTION DES SUBSTANCES DE DEGRADATION DU TISSU MUSCULAIRE

### AMINES VOLATILES

- étude de la signification des teneurs en ABVT p.72
- étude de l'évolution du critère P

### AMINES BIOGENES

- étude de l'évolution des amines biogènes chez le merlan et le maquereau (exploitation de la "nouvelle méthode") p.91
- mise au point d'une méthode de dosage en HPLC : p.80
- mise au point du gradient
  - détermination du temps de rétention
  - intérêt de l'étape de purification
  - comparaison de la méthode de MIETZ et KARMAS et de la "nouvelle méthode"
  - mise en oeuvre d'un étalon interne
  - corrélation : concentration - surface des pics
  - optimisation de la phase d'extraction trichloracétique

## 3. EVALUATION D'ACTIVITES MICROBIENNES POUR APPRECIER LE NIVEAU D'ALTERATION

### ACTIVITES PEPTIDASQUES

- analyse des résultats de 6 tests d'évaluation d'activités peptidasiques p. 97
- étude de la compétition entre substrats (expérimentation complémentaire) p.100

### REDUCTION DE L'OXYDE DE TRIMETHYLAMINE

- étude de l'incidence de la température d'incubation sur la réduction du TMAO, p.103
- mise au point d'une technique permettant de tester une population bactérienne présente dans un prélèvement de muscle p.103
- étude de l'évolution des flores impliquées dans la réaction p.104

## 4. APPLICATION AU POISSON DE METHODES RAPIDES DE DENOMBREMENT DES BACTERIES

- étude des corrélations entre les dénombrements classiques et les résultats de la méthode DEFT (Direct Epifluorescence Filter Technique) p.108
  - étude de l'évolution de l'ATP somatique dans le poisson. p.112
  - étude des corrélations entre les dénombrements classiques et les mesures de bioluminescence consistant à évaluer l'ATP bactérien p.116
- mise au point d'une technique de filtration permettant de séparer les bactéries de leur substrat et de les concentrer p.105

## 5. ETUDE COMPARATIVE DE TESTS D'EVALUATION QUALITATIVE DU POISSON

---

Dans le tissu musculaire du poisson, la réduction du TMAO en TMA par les bactéries constitue une réaction essentielle du processus d'altération, ce qui a justifié l'étude de la production de TMA par diverses souches bactériennes. Dans le prolongement de ces travaux, nous avons étudié d'une part les amines volatiles, dont la TMA constitue le composant majeur dans le poisson altéré, d'autre part les amines biogènes. Les bactéries étant très largement responsables de la production de ces substances de dégradation, le niveau d'altération a été estimé en évaluant des activités microbiennes ou en dénombrant les populations présentes dans le muscle. Nos travaux se terminent par de comparaisons entre ces divers tests d'appréciation de la qualité.

## 1. REDUCTION DE L'OXYDE DE TRIMETHYLAMINE PAR DIVERSES SOUCHES BACTERIENNES

La mise au point de techniques spécifiques adaptées au contexte particulier du poisson a constitué le préalable nécessaire à l'étude quantitative de la production de TMA.

### 1.1. Mise au point des techniques

L'évaluation de l'aptitude d'une espèce bactérienne à réduire le TMAO repose sur l'inoculation d'une suspension bactérienne dans un milieu de culture que nous avons mis au point : sa composition est aussi proche que possible de celle du tissu musculaire du poisson, avec une concentration élevée en TMAO.

#### - mise au point d'un milieu de culture :

Le principe consiste à replacer les bactéries dans un contexte analogue à celui du muscle, mais l'expérimentation exclut l'utilisation d'un substrat solide. Nous avons donc choisi un sous produit du poisson obtenu par une hydrolyse de la chair, suffisante pour qu'il soit soluble, mais assez ménagée pour éviter de trop s'éloigner de la composition initiale. Le substrat obtenu est ensuite stérilisé par filtration puis concentré par évaporation. Les caractéristiques de ce " fish soluble", fabriqué par la Coopérative de Traitement des Produits de la Pêche de BOULOGNE SUR MER, sont présentées sur l'annexe 1. Celui-ci constitue la base de notre milieu.

milieu de culture utilisé pour évaluer l'aptitude des bactéries à réduire le TMAO :

<i>fish soluble</i>	125 g
<i>triméthylamine N-oxyde dihydrate</i> <i>(SIGMA.T.0514)</i>	6,25 g
<i>eau distillée</i>	q.s.p. 1 l
<i>ajusté à pH 7</i>	

Après centrifugation (5 minutes à 2000 t/min.), le milieu est stérilisé par filtration sur membrane 0,45 microns.

#### - mise au point d'une technique d'ajustement de la concentration de suspensions bactériennes :

Le milieu ainsi défini devant être ensemencé avec des suspensions bactériennes d'une concentration déterminée, nous avons élaboré une technique de dénombrement qui repose sur un comptage sous microscope en épifluorescence. Chaque préculture est reprise par 5 ml de solution de tryptone-sel, et une première dilution au 1/100 est effectuée.

*étalement :*

La technique consiste à employer des lames pour microscopes possédant un fritté qui délimite une surface d'étalement de 1 cm<sup>2</sup>. Après avoir agité soigneusement la dilution précédente, 10 microlitres sont prélevés à l'aide d'une pipette automatique. Pour obtenir un bon étalement, la pointe de la pipette est placée verticalement sur la lame au centre du cercle. En maintenant un contact entre la pointe et la surface de la lame, on libère les 10 microlitres en déplaçant la pipette à l'intérieur du champ de 1 cm<sup>2</sup>. On y ajoute 20 microlitres de tween 80 à 0,5 % préchauffé à 50°C, et on étale avec la pointe de la pipette de manière à couvrir l'ensemble du champ. La lame est alors placée sur une platine chauffante (chauffage modéré).

*coloration et fixation de la préparation :*

Les réactifs employés ont été décrits dans la méthode DEFT (Mat. et Mét. page 56).

On ajoute 1 ml d'acridine orange à 0,025 % sur la préparation et on laisse agir 2 minutes environ. L'excès de colorant est éliminé par rinçage à l'isopropanol jusqu'à écoulement d'un liquide clair. La préparation est fixée par la chaleur à la flamme d'un bec Bunsen.

*calcul du nombre de bactéries :*

Le dénombrement est effectué au microscope (Mat. et Mét. page 57). Dans la méthode DEFT, nous avons notifié que la surface du champ microscopique est de 0,00016 cm<sup>2</sup>. Dans la technique proposée ici, le facteur microscopique est le suivant :

$$\frac{S}{s} = \frac{1 \text{ cm}^2}{0,00016 \text{ cm}^2} = 6250$$

1 bactérie observée sur 1 champ microscopique correspond donc à 6250 bactéries présentes dans le cercle de 1 cm<sup>2</sup> de la lame. Ce nombre de bactéries correspondant à 10 microlitres de suspension, 1 bactérie observée sur 1 champ microscopique correspond à 625 000 bactéries/ml de suspension.

En fonction du dénombrement effectué, la suspension bactérienne est ajustée à environ 10<sup>7</sup> bactéries /ml, c'est à dire entre 15 et 20 bactéries observées par champ microscopique.

Le milieu défini ci-dessus peut alors êtreensemencé dans les conditions suivantes : 1 ml d'inoculum est ajouté à 4 ml de milieu, recouvert après agitation par 1 ml d'huile de paraffine stérile. La composition finale du milieuensemencé est donc :

<i>fish soluble</i>	100 g/l
<i>triméthylamine N-oxyde dihydrate</i>	5 g/l

Après incubation, on effectue le dosage de la TMA (Mat. et Mét. page 47).

**1.2 Etude quantitative de la production de TMA par diverses souches bactériennes**

La production de TMA résultant de la réduction du TMAO est exprimée dans le tableau 9 pour les diverses souches bactériennes testées.

SOUCHES ETUDIEES	8°c			20°c			25°c		
	9j	11j	11j	48h	72h	96 h	12h	24h	48h
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	20,75	22,69	29,05	23,24	37,63	47,04	3,04	5,81	9,96
<i>Aeromonas hydrophila</i>	16,33	22,97	35,97	30,71	48,42	54,51	5,81	14,94	20,48
<i>Aeromonas sub.sp.anaerogenes</i>	50,64	55,34	58,38	19,37	47,04	57,83	0,00	0,00	0,00
<i>Alcaligenes faecalis</i>	20,20	21,31	26,56	19,92	32,37	45,66	4,43	5,81	14,11
<i>Alteromonas communis</i>	13,28	25,46	39,29	1,94	9,68	17,16	0,00	0,00	0,00
<i>Alteromonas putrefaciens</i>	15,50	21,31	33,20	37,08	48,98	54,23	0,00	9,96	16,05
<i>Bacillus cereus</i>	13,00	17,43	23,52	23,24	40,67	55,34	5,26	16,05	27,67
<i>Bacillus subtilis</i>	14,94	16,33	19,65	24,07	41,51	54,23	14,11	10,79	18,54
<i>Bacteroides fragilis</i>	14,39	15,77	18,82	29,61	54,23	55,34	3,04	10,79	18 54
<i>Citrobacter bethesda</i>	12,73	15,50	18,82	26,01	47,32	53,13	6,36	8,02	16,05
<i>Citrobacter freundii</i>	13,84	17,43	20,20	27,95	55,06	56,72	0,00	9,41	19,92
<i>Citrobacter intermedius</i>	29,33	44,00	50,91	52,85	54,51	55,34	14,11	27,39	42,61
<i>Clostridium bifermentans</i>	14,67	17,99	26,01	29,05	46,49	48,42	2,21	9,68	17,99
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13,84	20,20	27,39	29,88	52,57	51,19	2,21	9,96	14,94
<i>Enterobacter cloacae</i>	12,17	17,16	23,80	27,67	49,81	54,51	0,00	12,73	18,82
<i>Escherichia coli K10</i>	16,60	19,65	22,41	51,47	58,11	66,68	20,20	39,29	55,34
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,45	17,43	19,65	19,37	46,21	53,96	0,00	6,64	11,34
<i>Proteus mirabilis</i>	12,73	17,16	25,46	24,90	44,83	55,34	10,79	12,73	18,26
<i>Proteus morgani</i>	24,07	34,31	45,10	28,78	47,59	61,15	6,36	15,22	20,48
<i>Pseudomonas atlantica</i>	16,60	26,01	40,12	2,21	8,58	15,77	0,00	0,00	0,00
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	19,37	20,48	22,41	26,29	36,52	44,00	3,60	5,53	11,07
<i>Pseudomonas nautica</i>	6,36	20,20	30,71	0,00	6,92	14,94	0,00	0,00	0,00
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	15,22	16,60	25,73	26,56	47,59	51,74	3,87	9,68	18,26
<i>Salmonella brandenburg</i>	17,43	25,18	35,69	48,70	55,34	55,89	12,73	25,46	39,84
<i>Salmonella montevideo</i>	19,37	26,84	34,86	29,61	47,59	51,19	10,51	16,88	25,46
<i>Salmonella newport</i>	16,60	21,03	27,39	18,82	33,20	52,57	3,04	7,19	10,79
<i>Salmonella panama</i>	13,28	18,26	23,80	44,27	55,62	55,62	17,16	29,33	45,93
<i>Salmonella paratyphi A</i>	13,00	16,60	23,80	23,80	47,87	58,11	6,09	14,67	26,01
<i>Salmonella typhimurium</i>	12,73	16,33	23,52	23,80	44,55	66,41	1,94	17,43	30,16
<i>Serratia marcescens</i>	14,39	16,05	21,58	25,18	42,06	53,96	2,21	15,77	37,08
<i>Shigella sonnei</i>	13,00	17,43	26,56	27,95	42,89	54,51	4,15	13,56	27,39
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19,92	20,20	21,03	23,52	43,72	57,28	0,00	0,00	0,00
<i>Yersinia enterocolitica</i>	21,31	24,07	30,71	29,33	35,42	47,59	3,60	6,92	9,68

Tableau 9: Production de TMA des différentes souches bactériennes étudiées à 8°c, 20°c et 25°c (en mg d'azote/100ml de culture).

Le choix des températures d'incubation a été déterminé sur la base des éléments bibliographiques exposés précédemment dans l'étude de l'écologie microbienne des poissons. Ont donc été retenues les températures de 8°C, 20°C et 25°C, et pour chacune d'elles diverses durées d'incubation ont été choisies:

pour 8°C: 9 jours, 11 j., 15 j.  
pour 20°C: 72 h., 96 h.  
pour 25°C: 12 h., 24 h., 48 h.

Les souches testées correspondent à des espèces bactériennes diverses, le but étant de comparer leur aptitude respective à réduire le TMAO. Notre souci a été d'inclure dans cette collection des membres des genres représentatifs de la microflore du poisson: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*. Certaines espèces caractéristiques du milieu marin ont été également retenues: *Pseudomonas atlantica*, *Pseudomonas nautica*.

La lecture du tableau 9 permet d'observer que toutes les souches bactériennes testées peuvent réduire le TMAO en TMA. Pour une souche donnée, la production de TMA est très dépendante des températures d'incubation et les températures optimales ne sont pas les mêmes pour les différentes souches. A titre d'exemples, considérons la production de TMA par *Escherichia coli* K10 qui est beaucoup plus élevée à 20°C et 25°C qu'à 8°C, et la production par *Yersinia enterocolitica* ou *Vibrio parahaemolyticus* qui est importante à 8°C lorsqu'elle est faible ou nulle à 25°C dans les conditions de notre expérimentation. Nous allons tenter de classer les bactéries en fonction de leur comportement aux différentes températures, et pour simplifier l'exploitation des résultats, seulement une partie du tableau 9 a été reprise dans les tableaux 10 et 11. Une seule durée d'incubation est retenue pour chaque température. Compte-tenu des productions de TMA observées, il est apparu souhaitable de retenir la même durée d'incubation pour les températures de 20°C et 25°C, à savoir 48 heures. Pour la température de 8°C, nous avons retenu un temps d'incubation de 11 jours.

Dans le tableau 10 sont classées les souches qui produisent plus de TMA aux températures supérieures à 8°C.

SOUCHES	Conditions d'incubation	8°C 11j	20°C 48h	25°C 48h
<i>Bacillus cereus</i>		17,43	23,24	27,67
<i>Bacillus subtilis</i>		16,33	24,07	18,54
<i>Bacteroides fragilis</i>		15,77	29,61	18,54
<i>Citrobacter bethesda</i>		15,50	26,01	16,05
<i>Citrobacter freundii</i>		17,43	27,95	19,92
<i>Enterobacter cloacae</i>		17,16	27,67	18,82
<i>Escherichia coli K10</i>		19,65	51,47	55,34
<i>Proteus mirabilis</i>		17,16	24,90	18,26
<i>Salmonella brandenburg</i>		25,18	48,70	39,84
<i>Salmonella panama</i>		18,26	44,27	45,93
<i>Salmonella paratyphi A</i>		16,60	23,80	26,01
<i>Salmonella typhimurium</i>		16,33	23,80	30,16
<i>Serratia marcescens</i>		16,05	25,18	37,08
<i>Shigella sonnei</i>		17,43	27,95	27,37

Tableau 10: Souches produisant plus de TMA (exprimée en mg d'azote/ 100ml de culture) après 48h d'incubation à 20°C et 25°C qu'après 11 jours à 8°C.

On observe que sont regroupées dans ce tableau la majorité des Enterobactéries testées ainsi que des représentants des genres *Bacillus* et *Bacteroides*.

Dans le tableau 11 sont reportées les souches produisant plus de TMA aux températures inférieures à 25°C. Une distinction y est effectuée entre celles où l'on observe une production à 25°C et celles où la production est nulle.

SOUCHES	Conditions d'incubation	8°C 11j	20°C 48 h	25°C 48 h
<b>a. souches produisant de la TMA à 25°C</b>				
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		23,24	22,69	9,96
<i>Aeromonas hydrophila</i>		22,97	30,71	20,48
<i>Alcaligenes faecalis</i>		21,31	19,92	14,11
<i>Alteromonas putrefaciens</i>		21,31	37,08	16,05
<i>Citrobacter intermedius</i>		44,00	52,85	42,61
<i>Clostridium bifermentans</i>		17,99	29,05	17,99
<i>Enterobacter aerogenes</i>		20,20	29,88	14,94
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		17,43	19,37	11,34
<i>Proteus morgani</i>		34,31	28,78	20,48
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		20,48	26,29	11,07
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>		19,60	26,56	18,12
<i>Salmonella montevideo</i>		26,84	29,61	25,46
<i>Salmonella newport</i>		18,82	21,03	10,79
<i>Yersinia enterocolitica</i>		24,07	29,33	9,68
<b>b. souches ne produisant pas de TMA à 25°C</b>				
<i>Aeromonas sub. sp. anaerogenes</i>		55,34	19,37	0,00
<i>Alteromonas communis</i>		25,46	1,94	0,00
<i>Pseudomonas atlantica</i>		26,01	2,21	0,00
<i>Pseudomonas nautica</i>		20,20	0,00	0,00
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		23,52	20,20	0,00

Tableau 11: Souches produisant plus de TMA (exprimée en mg d'azote/ 100ml de culture) après 11 jours à 8°C ou 48h à 20°C qu'après 48h à 25°C.

Les bactéries reprises dans le tableau 11 pour lesquelles on observe une production de TMA à 25°C après 48h produisent plus de TMA à 20°C qu'à 8°C à l'exception de quelques unes qui ont une production semblable à 8°C et 20°C. Celles pour lesquelles on n'observe aucune production de TMA à 25°C se caractérisent par une production supérieure à 8°C qu'à 20°C.

La lecture du tableau 9 a permis de constater que toutes les souches bactériennes testées possèdent l'équipement enzymatique nécessaire pour réduire le TMAO en TMA, ce qui ne correspond pas aux résultats des travaux de DEBEVERE et VOETS (1974). Les bactéries testées par ces auteurs appartenaient aux genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* ainsi qu'à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles se révélaient capables de réduire le TMAO en TMA à l'exception des *Klebsiella*. Ceci est en désaccord avec les résultats de nos travaux où il est démontré que *Klebsiella pneumoniae* est apte à produire de la TMA dans nos conditions expérimentales.

DEBEVERE et VOETS avaient défini une température expérimentale de 37°C pour les Enterobactéries et un temps d'incubation de 12 à 18 heures. Lors de nos essais effectués à différentes températures: 8°C, 20°C et 25°C, nous avons constaté qu'en 12 heures à 25°C *Klebsiella pneumoniae* ne produisait pas de TMA. Il apparaît donc que la température de 37°C ne convenait pas pour permettre à ces chercheurs d'observer une production de TMA.

Ainsi, lorsque les bactéries possèdent l'équipement enzymatique permettant la réduction du TMAO, les conditions expérimentales doivent toutefois être favorables. Nous le démontrons pour les conditions d'incubation: durée et température. C'est ainsi que certaines bactéries ne produisent pas de TMA à 25°C, alors qu'elles en produisent à 8°C ou à 20°C. DEBEVERE et VOETS l'avaient démontré pour la composition du milieu dont la concentration en glucose était déterminante pour obtenir un test positif avec les Enterobactéries.

On peut être réservé sur le test proposé par ces auteurs pour déterminer l'aptitude d'une bactérie à réduire le TMAO, car la durée d'incubation est très probablement insuffisante dans certains cas et le choix d'une seule température d'incubation est arbitraire. Pour notre part, nous avons couvert de plus larges conditions d'incubation et nous avons reconstitué le contexte du tissu musculaire du poisson, ce qui nous a permis de constater que toutes les souches testées pouvaient réduire le TMAO.

Le classement effectué dans les tableaux 10 et 11 explicite la relation entre la température d'incubation et la production de TMA. Cette étude construite sur une réaction essentielle dans la dégradation du poisson, à savoir la réduction du TMAO, a permis de déterminer expérimentalement les tendances mésophile, psychrotrophe et psychrophile des bactéries inoculées. Celles-ci peuvent être séparées en 3 classes.

\* Une des classes obtenues, qui regroupe les bactéries produisant plus de TMA à 20°C et 25°C qu'à 8°C (tableau 10), peut être assimilée aux mésophiles. On y trouve essentiellement des Enterobactéries.

\* Une seconde classe située à l'opposé comprend des bactéries qui ne réduisent pas le TMAO en TMA à 25°C (tableau 11 b), et dont la plus forte production de TMA se situe à 8°C : *Aeromonas sub.sp.anaerogenes*, *Alteromonas communis*, *Pseudomonas atlantica*, *Pseudomonas nautica*, *Vibrio parahaemolyticus*.

\* La troisième peut être considérée comme une classe intermédiaire, car la production de TMA qui est plus forte à 8°C et 20°C qu'à 25°C n'est pas nulle à 25°C (tableau 11 a). On y trouve : *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Alteromonas putrefaciens*, *Citrobacter intermedius*, *Clostridium bifermentans*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus morgani*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella newport*, *Yersinia enterocolitica*.

La première classe fait partie des mésophiles généralement définis par leur capacité de se multiplier aux températures moyennes, leur température optimale de croissance étant comprise entre 25°C et 40°C. Les températures minimales de croissance se situent entre 5 et 10°C, les températures maximales entre 40 et 45°C.

Si la notion de mésophile est claire, il existe une certaine confusion entre les termes "psychrophile" et "psychrotrophe", comme nous l'avons exprimé précédemment. La seconde classe déterminée s'inscrit dans la définition des "psychrophiles" proposée par MORITA (1975) : "microorganismes ayant une température optimale de croissance d'environ 15°C ou moins, une température maximale de croissance d'environ 20°C, et une température minimale de croissance de 0°C ou moins". Nous avons effectivement regroupé dans cette classe des bactéries qui ne cultivent pas à 25°C, mais qui se développent très bien à 8°C.

Cet auteur qualifie de "psychrotrophes" ou "psychrotolérants" les microorganismes ne correspondant ni à la définition des mésophiles, ni à celle qu'il propose pour les psychrophiles. C'est le cas des bactéries que nous avons placées dans la troisième classe : elles ne sont pas psychrophiles puisqu'elles produisent encore de la TMA à 25°C, ni mésophiles puisqu'elles préfèrent les températures de 8°C et 20°C à 25°C.

LAHELLEC ET COLIN (1980) retiennent la définition des psychrotrophes proposée par CATSARAS et GREBOT (1969) : "microorganismes qui se multiplient activement aux températures de réfrigération couramment utilisées (0°C à 6°C), leur température optimale de croissance étant généralement plus élevée, 10°C à 20°C, davantage parfois". Dans nos travaux, c'est cette définition qui est adoptée. Elle est en totale concordance avec celle de MORITA (1975) qui retient le terme de psychrotrophe pour des organismes tolérants au froid dont la température maximale de croissance est supérieure à 20°C et qui étaient parfois appelés psychrophiles facultatifs.

Par contre la définition des psychrophiles donnée par CATSARAS et GREBOT est très restrictive: "microorganismes qui, non seulement cultivent aux basses températures, mais encore les exigent, et ont leur optimum aux environs de 0°C". Compte tenu de nos résultats expérimentaux, nous préférons retenir la définition des psychrophiles proposée par MORITA.

Sur la base de ces définitions qui seraient désormais les mieux reconnues (GOUNOT, 1991), les bactéries placées dans la seconde classe à l'issue de notre étude sont des psychrophiles, et les bactéries de la troisième classe dont les exigences sont intermédiaires correspondent aux psychrotrophes. Il est intéressant de remarquer qu'on retrouve parmi ces dernières les espèces constituant selon SHEWAN et al. (1960) la microflore d'altération dominante des poissons marins, nous reviendrons sur ce point ultérieurement.

*remarque :*

*Les résultats confirment la tendance généralement mésophile des Salmonella, ils soulignent toutefois le caractère psychrotrophe de 2 souches étudiées : Salmonella montevideo et Salmonella newport. Il importe de préciser que la tendance psychrotrophe ou mésophile ne peut être liée au sérotype et que les 2 tendances peuvent exister au sein d'un même sérotype.*

## 2. EVOLUTION DES SUBSTANCES DE DEGRADATION

Parmi les substances de dégradation, l'intérêt des amines volatiles est reconnu depuis très longtemps pour apprécier le poisson : sur la base des méthodes existantes, nous avons proposé un mode d'exploitation des teneurs en ABVT et en TMA. Nous avons d'autre part mis au point une méthode de dosage des amines biogènes en HPLC et étudié leur intérêt comme critère de fraîcheur.

### 2.1 AMINES VOLATILES

En exposant antérieurement le mécanisme de la dégradation du tissu musculaire, nous avons indiqué les contributions respectives de la protéolyse et de la réduction du TMAO dans la production d'amines volatiles. L'augmentation du taux de ces composés volatils dans le muscle lors de l'altération a conduit des chercheurs à les doser globalement et à dénommer ABVT, azote basique volatil total, ce concept d'ordre quantitatif regroupant des composés qualitativement différents, les plus importants étant l'ammoniac et la triméthylamine.

#### 2.1.1. Azote basique volatil total

Dans un article présenté en annexe (MALLE et al., 1989a :annexe 8), nous avons tenté d'optimiser l'utilisation de ce critère et de définir les limites de son application. Nous n'en repreneons ici que l'essentiel, pour les détails il convient de se reporter à l'annexe.

L'ABVT étant par définition un ensemble de composés chimiques, il pouvait être exprimé diversement, ou en ammoniac ou en azote, ce qui entraînait une première dérive lors de l'interprétation des résultats. Nous avons proposé de généraliser son expression en azote, ce choix était le plus rationnel puisque l'azote entre dans la composition de l'ammoniac et des diverses molécules d'amines. Cette proposition a été retenue et a fait l'objet d'une recommandation du groupe "Produits de la Pêche" du C.N.E.R.N.A. (Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation) du 6 Décembre 1989.

De nombreuses méthodes ont été employées pour déterminer les teneurs en A.B.V.T. Désormais on constate que 2 d'entre elles continuent à être largement pratiquées : une méthode par entraînement à la vapeur (BILLON et al., 1979) et une méthode par microdiffusion (CONWAY, 1962). Nous avons effectué une comparaison entre ces 2 méthodes, et avons observé une corrélation hautement significative entre les résultats fournis par chacune d'elles. La droite de régression obtenue met en évidence de faibles différences, les valeurs étant légèrement supérieures pour la méthode d'entraînement à la vapeur (y) par rapport à la méthode de Conway (x) :

$$y = 1,02 x + 0,85$$

Nous avons conclu à la possibilité d'employer l'une ou l'autre de ces 2 méthodes, en rappelant toutefois la nécessité de respecter scrupuleusement divers éléments du mode opératoire.

Cette mise au point concernant les aspects méthodologiques constituait le préalable nécessaire à la proposition de valeurs de référence pour l'interprétation des résultats. Compte tenu de l'existence de multiples facteurs de variabilité de l'ABVT (MALLE et al. , 1983), il ne pouvait être question de fixer des normes ayant valeur réglementaire, toutefois des spécifications pouvaient être définies sous réserve qu'elles soient accompagnées de l'ensemble des paramètres à prendre en compte. Parmi ceux ci interviennent notamment : les sous classes : Sélaciens et Téléostéens; les familles : l'interprétation est difficile chez les Salmonidés et l'ABVT a peu de signification chez les Thonidés ; le taux de graisse ; la transformation ; l'immersion volontaire et prolongée des filets ; le mode de conditionnement ; etc... Ces paramètres sont détaillés dans l'article présenté dans l'annexe 8. L'ABVT peut fournir dans de nombreux cas une information précieuse sur la fraîcheur du poisson, mais il n'est pas systématiquement exploitable. Lorsqu'il l'est, il ne constitue qu'un élément d'appréciation. De ce fait nous avons orienté nos recherches sur l'élaboration de critères complémentaires.

### 2.1.2 P = TMA/ABVT (%)

Notre intérêt s'est porté sur une amine essentielle dans l'ABVT : la triméthylamine. Il a été rappelé précédemment que des chercheurs avaient constaté il y a plus de 50 ans que la production de TMA dans le muscle était liée au développement des populations microbiennes (BEATTY et GIBBONS, 1937). Ainsi la teneur en TMA peut exprimer correctement dans certains cas le niveau de contamination bactérienne (LUNDSTROM et RACICOT, 1983), mais globalement la fiabilité de ce critère s'est révélée très contestable à l'usage compte tenu des facteurs d'irrégularité de la production de TMA, et ce critère a été progressivement abandonné. En observant l'évolution des taux d'ABVT et de TMA au cours de l'altération du poisson, l'intérêt de la TMA nous est apparu de manière évidente sous réserve d'une approche différente. Face aux insuffisances des ces 2 critères pris isolément, leur interprétation se révélant difficile, nous avons envisagé leur exploitation simultanée pour apprécier la fraîcheur. Nous avons étudié la corrélation entre le rapport  $P = TMA/ABVT$  (%) et le niveau d'altération (MALLE et POUMEYROL, 1989b : annexe 9).

#### - ETUDE DE 3 ESPECES CONSERVEES A 6-8°C :

L'indice d'altération a été déterminé par 2 techniciens sur des échantillons de cabillauds, de merlans et de maquereaux conservés à 7°C + 1°C, et la moyenne arithmétique des 2 déterminations a été retenue. Dans chaque espèce un nombre d'échantillons compris entre 30 et 40 a été étudié (au total 102 échantillons), et leur temps de conservation a été déterminé de manière à disposer au minimum d'1 échantillon pour chaque valeur décimale des indices compris entre 1,3 et 3,6. Pour chacun des poissons ont été effectués des dosages d'ABVT et de TMA.

Les taux d'ABVT et de TMA du cabillaud et du maquereau sont représentés sur les figures 1 et 2 (annexe 9), ceux du merlan sur la figure 3 (annexe 9), où les indices sont portés en abscisse et les taux d'amines en ordonnée. Le critère P a été défini ci-dessus comme le pourcentage de TMA dans l'ABVT :  $TMA / ABVT (\%)$ . Les valeurs de P pour le cabillaud et le maquereau sont présentées sur la figure 4 (annexe 9).

#### *comparaison de l'évolution des 3 critères (ABVT, TMA, P)*

La configuration des nuages de points exprimant l'ABVT (annexe 9: figure 1) et la TMA (figure 2) chez le cabillaud et le maquereau démontre que les taux d'amines correspondant à un niveau d'altération déterminé sont différents dans les 2 espèces étudiées. Ceci ne fait que confirmer des faits désormais bien connus : la grande variabilité des taux d'ABVT et de TMA est fonction de nombreux paramètres en relation avec l'espèce de poisson, sa flore microbienne, ses conditions de capture et de conservation (CASTELL et al., 1971 ; HUGHES, 1959 ; MALLE et al., 1983 ; SOUDAN et al., 1965 ; WATANABE, 1965 ; ZAMBONI, 1962). Par contre les valeurs de P déterminées chez les mêmes poissons et portées sur la figure 4 (annexe 9) semblent superposables et donc peu dépendantes de l'espèce. Ceci est un des arguments qui feront préférer P aux 2 autres critères.

Les courbes présentées sur les figures 1, 2, 3, et 4 (annexe 9) ont des formes différentes selon le critère étudié. L'évolution de l'ABVT est peu significative dans les premiers stades de l'altération où on observe un plateau (MALLE et al. 1983), celui-ci n'existant ni pour la TMA dont l'évolution est plus significative en début d'altération, ni pour P. En effet l'ammoniac et la TMA constituent 2 composants essentiels de l'ABVT, mais c'est l'ammoniac qui prédomine très largement dans le poisson frais où il peut en partie être réemployé à certaines synthèses et faire fluctuer le taux d'ABVT (SHEWAN, 1937). De ce fait l'ABVT est peu représentatif de l'altération en début de conservation. Ce n'est pas le cas de P, ce critère prenant essentiellement en compte le taux de TMA. Nous sommes amenés cette fois à retenir la TMA et P de préférence à l'ABVT comme critères d'appréciation de la qualité.

*comparaison des coefficients de variation des 3 critères*

Dans le tableau 12 sont présentés pour les 3 espèces étudiées les coefficients de variation des valeurs de chaque critère.

(Espèce	:	ABVT	:	TMA	:	P	)
(Cabillaud	:	0,5439	:	1,0637	:	0,5909	)
(Merlan	:	0,5704	:	1,2038	:	0,5806	)
(Maquereau	:	0,5734	:	1,0523	:	0,6476	)
(Moyenne	:	0,5625	:	1,1066	:	0,6063	)

Tableau 12. Coefficients de variation de chaque critère (ABVT, TMA et P) dans les 3 espèces conservées à 6.8°C.

Le coefficient de variation (écart.type / moyenne) a des valeurs voisines pour ABVT (0,5625) et P (0,6063), et des valeurs nettement plus élevées pour TMA (1,1066). La dispersion importante des taux de TMA explique l'intérêt limité manifesté à ce critère, certains auteurs ayant toutefois estimé que la teneur en TMA peut exprimer chez certaines espèces le niveau de contamination bactérienne (BABITT, 1972). Il existe de nombreuses causes d'irrégularité de la production de TMA. Elle dépend de la nature de la flore bactérienne et des conditions de développement (KRUEGER, 1972 ; LAYCOCK et REGIER, 1971). D'autre part la teneur des muscles en oxyde de TMA (TMAO) varie selon les espèces de poissons, et la réduction de TMAO en TMA n'est pas uniforme dans un même poisson (SAINCLIVIER, 1983). L'utilisation de la teneur en TMA comme critère de qualité n'est donc pas simple. Des critères retenus ci-dessus, TMA et P, le calcul des coefficients de variation nous conduit à choisir celui dont la dispersion est la plus faible, c'est à dire P.

- ETUDE DE log P

*choix de l'expression de P*

Pour les 3 espèces étudiées, nous disposons de 102 valeurs de P. L'analyse des données effectuée sur micro-ordinateur a permis d'établir par la méthode des moindres carrés une droite de régression empirique exprimant P en fonction de l'indice d'altération (i) :

$$P = 25,1706 i - 31,9081$$

avec un coefficient de corrélation de 0,9229.

La configuration du nuage de points P (annexe 9: figure 4) nous conduit à rechercher une exponentielle. Par la même méthode que précédemment, nous avons obtenu une droite exprimant log P en fonction de l'indice d'altération :

$$\log P = 0,4132 i + 0,3719$$

avec un coefficient de corrélation de 0,9469.

Sur la figure 5 (annexe 9), cette droite traverse le nuage de points

log P.

La comparaison des coefficients de corrélation nous fait préférer log P à P pour la suite de cette étude.

*influence de l'espèce*

Sur la figure 6 (annexe 9) sont portées les droites exprimant log P en fonction de l'indice pour les 3 espèces conservées à 6-8°C. On observe que les droites obtenues sont très voisines. Ce critère semble donc peu dépendant de l'espèce dans le cas des 3 Téléostéens marins étudiés.

cabillaud	$\log P = 0,3942 i + 0,4309$
merlan	$\log P = 0,4002 i + 0,4032$
maquereau	$\log P = 0,4433 i + 0,2746$

### *influence de la température*

De la même manière que pour les poissons conservés à 6-8°C, des déterminations de l'indice d'altération et de la teneur en ABVT et en TMA ont été pratiquées sur des échantillons de harengs et de maquereaux conservés sous glace (au total 67 échantillons). La proximité des droites de régression exprimant log P en fonction de l'indice chez ces 2 espèces conservées à 0°C (annexe 9: figure 7) confirme le commentaire effectué ci-dessus, concernant les poissons conservés à 6-8°C, sur la faible incidence de l'espèce sur ce critère.

$$\begin{aligned} \text{hareng } 0^{\circ}\text{C} \quad \log P &= 0,3764 i + 0,2975 \\ \text{maquereau } 0^{\circ}\text{C} \quad \log P &= 0,3526 i + 0,3673 \end{aligned}$$

Les pentes des droites de régression exprimant log P en fonction de i soulignent par contre l'incidence de la température de conservation du poisson sur le critère proposé (annexe 9: figure 8). La corrélation entre la teneur en bases aminées volatiles, ABVT ou TMA, et l'indice d'altération est soumise à de nombreux facteurs liés au poisson lui-même : espèce, nourriture, cycle sexuel (MENDES et LAJOLO, 1975 ; SHEWAN et al., 1971) et liés à la flore microbienne susceptible de le dégrader (MALLE et al., 1983) Si la corrélation entre le rapport TMA / ABVT (%) et l'indice subit plus faiblement l'incidence des divers facteurs affectant à la fois les productions de TMA et d'ABVT, elle reste toutefois en partie dépendante de ces facteurs, très légèrement du facteur "espèce", davantage du facteur "température".

### *détermination statistique d'une droite limite*

Pour déterminer les valeurs maximales de log P admissibles, nous exploitons les résultats obtenus lorsque les poissons ont été conservés à 6-8°C. En effet, s'il est recommandé de conserver le poisson sous glace fondante, c'est à dire à 0°C, il peut se trouver exposé à des températures supérieures dans les circuits commerciaux et dans les industries de transformation. Nous nous sommes placés dans les conditions limites, la conservation du poisson n'étant pas concevable à une température supérieure à 8°C.

En supposant la distribution normale, nous savons qu'à un intervalle de confiance de 95 % correspond l'écart de  $1,96\Sigma$  par rapport à la droite qui traverse le nuage de points log P (annexe 9: figure 5). La variance liée étant la moyenne des écarts au carré entre les points du nuage et cette droite, l'écart type lié  $\Sigma$  qui exprime la dispersion moyenne autour de la droite est obtenu en prenant la racine carrée de cette variance liée :

$$\Sigma = \sqrt{\sigma^2 (1 - r^2)} \quad \begin{aligned} \text{où } \sigma^2 &= \text{variance} \\ r &= \text{coefficient de corrélation} \end{aligned}$$

Les limites de l'intervalle défini ci-dessus sont représentées sur la figure 5 (annexe 9). La limite supérieure est constituée par la droite :

$$\log P + 1,96 \Sigma = 0,4132 i + 0,5571$$

Pour un indice donné , il existe un risque de 2,5 % de trouver des valeurs de log P au dessus de cette droite. Cette étude est le support des propositions formulées ci-après.

- PROPOSITION DE P COMME CRITERE COMPLEMENTAIRE DE L'ABVT :

L'évolution de la proportion de TMA dans l'ABVT exprimée par P, ou mieux par log P, constitue un critère intéressant à prendre en compte pour affiner l'appréciation fournie par l'ABVT. En effet, le critère TMA / ABVT (%) subit de façon plus atténuée l'incidence des divers facteurs qui affectent à la fois les teneurs en TMA et en ABVT , qu'il s'agisse de l'espèce, du taux de graisse, ou de divers traitements comme la déshydratation ou la congélation. De même la valeur de P est peu dépendante des méthodes de dosage des amines lorsque ABVT et TMA sont dosés par une même méthode.

Notre étude a été réalisée sur quelques poissons marins où les valeurs de P déterminées sont peu dépendantes des espèces. Lors d'essais ponctuels, des résultats comparables ont été obtenus chez d'autres Téléostéens marins, mais les valeurs ne sont pas transposables chez les Sélaciens où la teneur en TMAO est plus élevée et où l'ABVT contient de grandes quantités d'ammoniac provenant de la décomposition de l'urée.

Dans le cadre d'une démarche contractuelle, nous avons situé les valeurs d'ABVT correspondant à une qualité B entre 20 et 28 mg / 100 g pour la majorité des Téléostéens marins, entre 24 et 32 mg / 100 g pour quelques exceptions dont le lieu noir (MALLE et al., 1989 a). Le critère P permet d'affiner l'appréciation en fixant une limite à 17 % pour une qualité " satisfaisante " et à 40 % pour une qualité " acceptable ".

Ce nouveau critère n'est donc pas proposé en remplacement de l'ABVT, mais en complément. Dans l'interprétation proposée dans le tableau 13, le cas des Sélaciens est traité séparément. D'autre part, une distinction est faite entre des spécifications ayant valeur de "recommandations", et des "standards" permettant d'envisager le retrait de la consommation.

## TELEOSTEENS

- RECOMMANDATIONS : marché de gros

ABVT (mg N/100g)		P = TMA/ABVT (%)	niveau de fraîcheur
cas général	exceptions		
< 20		< 17 %	satisfaisant
20 à 25	20 à 30	17 à 40 %	acceptable
> 25	> 30	> 40 %	non satisfaisant

Si les niveaux de fraîcheur déterminés par l'ABVT et par le pourcentage TMA/ABVT sont discordants, l'appréciation la plus sévère l'emporte.

Une certaine tolérance peut être admise pour quelques espèces où les valeurs d'ABVT évoluent plus rapidement. Peuvent être classées dans la colonne "exceptions" : le lieu noir, les espèces du genre *Sebastes*, certains poissons gras comme le maquereau.

- STANDARDS POUR LE RETRAIT DE LA CONSOMMATION :

### marché de gros

ABVT (mg N/100g)		P = TMA/ABVT (%)	niveau de fraîcheur
cas général	exceptions		
> 28	> 33	> 50 %	non satisfaisant

### vente au détail

ABVT (mg N/100g)		P = TMA/ABVT (%)	niveau de fraîcheur
cas général	exceptions		
> 35	> 40	> 60 %	non satisfaisant

### Remarques :

- L'ABVT a peu de signification chez les thonidés.
- Chez les Salmonidés, des valeurs basses d'ABVT (<25) ne sont pas interprétables. Des teneurs élevées peuvent par contre confirmer une altération.
- Il est toujours hautement souhaitable, compte tenu des nombreuses causes de variabilité de l'ABVT, d'effectuer parallèlement un test organoleptique.

## SELACIENS

L'évolution des teneurs en ABVT des Sélaciens est beaucoup plus rapide que chez les Téléostéens en raison de la teneur élevée en urée du tissu musculaire.

Le standard pour le retrait de la consommation est fixé à 65 mg N/100g.

---

Tableau 13 : Proposition de valeurs de référence chez les poissons frais ou congelés (produits transformés exclus) pour l'ABVT et le critère P.

## 2.2. AMINES BIOGENES

La technique de dosage en HPLC que nous proposons pour les amines biogènes a nécessité diverses mises au point que nous présentons en comparant les résultats obtenus à ceux de MIETZ et KARMAS.

### 2.2.1. Mise au point du gradient

Le but poursuivi est d'obtenir une bonne séparation des pics correspondant aux amines biogènes auxquelles nous nous intéressons pour apprécier l'altération, notamment la cadavérine, l'histamine, la putrescine, la spermidine et la spermine. Il est par ailleurs souhaitable d'atteindre cet objectif tout en ayant des temps de rétention suffisamment courts pour envisager une application courante de la méthode.

Pour déterminer le gradient d'évolution optimal, nous nous sommes référés à des travaux dans lesquels les phases mobiles utilisées ont des similitudes avec les nôtres. MIETZ et KARMAS (1977) utilisaient les phases suivantes : phase A = 10 % d'acétonitrile dans de l'acide acétique 0,02 N ; phase B = 10 % d'acide acétique 0,02 N dans un mélange d'acétonitrile et de méthanol (1 + 1). Leur gradient était linéaire de 60 % de B à 100 % en 30 minutes. Les résultats qu'ils ont ainsi obtenus présentent deux inconvénients majeurs : les pics correspondant à la cadavérine, l'histamine et la putrescine sont très rapprochés, d'autre part celui qui correspond à la spermine ne sort pas avant 30 minutes.

Avec des phases mobiles plus simples (phase A = eau ; phase B = acétonitrile), nous avons observé les temps de rétention obtenus sans gradient avec 60 % ou 95 % de B. Les solutions standards sont préparées dans une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à partir des formes chlorhydratées des amines citées précédemment. Un mélange des 5 amines est réalisé à la concentration de 1 mg de chaque amine / ml de solution de  $\text{NaHCO}_3$ . L'injection des diverses solutions d'amines, en mélange puis séparément, a permis de déterminer les temps de rétention des dérivés dansylés de chaque amine.

Les résultats obtenus sont les suivants:

- sans gradient avec 60 % de B :

- . la première amine sort après 19 minutes,
- . la spermidine et la spermine ne sortent pas avant 45 minutes,

- sans gradient avec 95 % de B :

- . les 5 amines sortent avant 10 minutes,
- . mais les pics sont très rapprochés, et ceux correspondant à la putrescine et à la cadavérine sont confondus.

En choisissant des paramètres intermédiaires, c'est à dire sans gradient avec 75 % de B (annexe 2 : figure I), les temps de rétention sont modifiés de la manière suivante :

- . ils sont compris entre ceux obtenus respectivement avec 60 % et 90 % de B,
- . il n'y a pas de pics correspondant aux amines qui soient réellement confondus,
- . toutefois, le temps de rétention de la spermine est supérieur à 30 minutes.

A la suite de ces résultats et de quelques essais, un gradient combinant les paramètres précédents a été ainsi défini :

- de 60 à 75 % de B en 6 minutes pour obtenir une sortie suffisamment rapide des pics précédant les amines,
- un plateau à 75 % de B jusque 8 minutes pour séparer correctement les trois premières amines : putrescine, cadavérine, histamine,
- un gradient linéaire entre 8 et 13 minutes de 75 % à 95 % de B permettant de laisser un écart suffisant entre les 3 premiers pics et la spermidine pour la sortie de pics "parasites" mis en évidence sur les blancs,
- un plateau à 95 % jusque 20 minutes pour accélérer la sortie de la spermine de manière à ce que le temps de rétention correspondant soit réduit.

### 2.2.2. Détermination des temps de rétention.

Les temps de rétention obtenus avec le gradient choisi sont les suivants (annexe 2 : figure II) :

- Putrescine..... 11,9 min.
- Cadavérine..... 12,8 min.
- Histamine..... 13,5 min.
- Spermidine..... 17,4 min.
- Spermine..... 19,7 min.

On peut observer que ces temps de rétention sont relativement courts par rapport à ceux obtenus avec diverses méthodes décrites dans la bibliographie (TABOR H. et TABOR C.W., 1973; MIETZ et KARMAS, 1977, 1978, ; HUI et TAYLOR, 1983).

Ces résultats permettent d'enregistrer un programme d'identification sur l'intégrateur de telle sorte que seuls les pics se trouvant dans les plages de temps intéressantes soient pris en compte dans les calculs d'intégration et identifiés en fonction de leur temps de rétention. Ce programme permet d'éliminer la totalité des pics "parasites" présents en dehors de ces plages. Une marge d'erreur (WINDOW) doit être définie dans le programme d'identification, elle a été établie à 5 % du temps de rétention.

### 2.2.3. Intérêt de l'étape de purification

La mise en oeuvre d'une étape de purification à la suite de la dansylation a pour objet d'éliminer du chromatogramme des pics sans intérêt susceptibles d'interférer avec les amines recherchées.

#### *méthode de MIETZ et KARMAS*

La purification des dérivés dansylés à l'éther éthylique et l'évaporation consécutive allongent considérablement la durée globale de cette méthode.

Les pics supplémentaires observés en l'absence de purification (annexe 2 : fig.III) par rapport à ceux observés avec purification (fig.IV) n'interfèrent pas avec les pics correspondant aux 5 amines. Il est à noter que les principaux pics supplémentaires apparaissent très tôt avec le gradient choisi, dans les 10 premières minutes.

On a pu observer dans tous les cas que les surfaces des pics sont inférieures lorsqu'il y a purification.

L'injection d'un extrait blanc (ne contenant pas d'amines) n'ayant pas subi de purification met en évidence les pics parasites (annexe 2 : fig.V). L'injection d'une dilution de la solution de chlorure de dansyl dans l'acétonitrile permet de définir parmi ces pics ceux qui correspondent à des composants de la solution (fig.VI).

#### *nouvelle méthode*

L'analyse des chromatogrammes obtenus avec ou sans purification à partir des mêmes extraits confirme ce qui a été observé pour la méthode précédente : les pics "parasites" n'interfèrent pas avec ceux des amines.

Il apparaît d'autre part, en observant les coefficients de variation des surfaces des pics correspondant à chaque amine (tableau 14), que la " nouvelle méthode " est plus reproductible sans purification.

		-----	
		( "nouvelle méthode"	: "nouvelle méthode"
		( avec purification	: sans purification )
		-----	
( Putrescine	: 0,0999	:	0,0219 )
(	:	:	)
( Cadavérine	: 0,1310	:	0,0703 )
(	:	:	)
( Histamine	: 0,0932	:	0,0070 )
(	:	:	)
( Spermidine	: 0,4788	:	0,0568 )
(	:	:	)
( Spermine	: 0,2623	:	0,1576 )
		-----	

Tableau 14: Coefficients de variation (écart-type /moyenne) des surfaces de pics de chaque amine obtenues sur un même échantillon par la "nouvelle méthode" avec et sans purification.

Avec cette méthode les surfaces des pics sont toujours inférieures lorsqu'on pratique une purification. Ceci est donc vrai pour les 2 méthodes, et on peut supposer que la mise en oeuvre d'une phase de purification à l'éther éthylique augmente les pertes et affecte par conséquent la reproductibilité des résultats.

En conclusion, l'étape de purification des dérivés dansylés ne présente pas de réel intérêt puisque le gradient mis au point permet d'éviter les interférences entre les pics des amines et les pics "parasites". Par contre elle est laborieuse et augmente de manière sensible la durée de l'analyse. Enfin elle diminue le rendement et la reproductibilité des 2 méthodes. Cette étape n'a pas été retenue pour la suite de nos travaux.

#### 2.2.4. Comparaison de la méthode de MIETZ et KARMAS et de la "nouvelle méthode"

Les 2 protocoles expérimentaux (planche 2) ont été appliqués sur la solution standard contenant les 5 amines ( 1 mg de chaque amine / 10 ml NaHCO<sub>3</sub>), l'étape de purification n'a pas été retenue dans ces protocoles.

	méthode de	"nouvelle	gain de surface
	MIETZ et KARMAS	méthode"	obtenu avec la
			"nouvelle méthode)
( Putrescine :	63966	100505	57,12%
( :	:	:	:
( Cadavérine :	62919	94048	49,47%
( :	:	:	:
( Histamine :	81159	81090	- 0,08%
( :	:	:	:
( Spermidine :	28229	59090	109,32%
( :	:	:	:
( Spermine :	15714	37876	141,03%

Tableau 15: Comparaison des résultats des 2 protocoles expérimentaux :  
Valeurs moyennes des surfaces des pics correspondant aux 5 amines de la solution standard.

Avec la nouvelle méthode, les surfaces des pics correspondant aux amines biogènes sont supérieures, ce qui permet de penser que les pertes sont plus faibles. En dehors de l'histamine qui donne des résultats similaires avec les 2 méthodes, on constate avec la nouvelle méthode des gains de l'ordre de 50 % pour le putrescine et la cadavérine, et des gains supérieurs à 100 % pour la spermidine et la spermine.

Compte tenu du fait que la " nouvelle méthode " est par ailleurs plus simple et plus rapide, elle est globalement plus intéressante que la méthode de MIETZ et KARMAS, c'est donc celle qui a été retenue pour la suite de ces travaux.

## 2.2.5. Mise en oeuvre d'un étalon interne

*- choix d'un étalon interne :*

L'étalon interne permet d'évaluer les pertes résultant de l'extraction et de corriger les valeurs obtenues pour les différentes amines. Nous avons choisi le 1,3 diamino propane dont on sait d'après les travaux de TABOR (1973) qu'il est dosable en HPLC après dansylation. Avec le gradient que nous employons, le 1,3 diamino propane a un temps de rétention différent de celui des amines que nous dosons : 11,4 min. (annexe 2 : figure VII). De plus il n'apparaît pas dans la bibliographie que ce composé soit présent dans le muscle des poissons.

*- expérimentation préalable à sa mise en oeuvre :*

Avant d'utiliser l'étalon interne pour corriger les pertes, il convient de vérifier s'il est exploitable dans le cadre de notre méthode. Pour cela on réalise des essais avec une solution contenant 1 mg de 1,3 diamino propane et 1 mg de chacune des amines étudiées dans 10 ml de  $\text{NaHCO}_3$ . D'une part 0,5 ml de cette solution sont dansylés directement avec 2 ml de chlorure de dansyl (protocole témoin). D'autre part la même quantité de cette solution est complétée à 10 ml avec du TCA à 7,5 % et subit avant la dansylation l'extraction selon la " nouvelle méthode " sans purification. L'analyse des chromatogrammes obtenus permet de déterminer les rapports avant et après extraction entre les surfaces des pics correspondant au 1,3 diamino propane et celles correspondant à chacune des amines. L'ensemble des rapports est présenté dans le tableau 16 :

(1) Sans extraction (témoin)						: moyenne
E/P	: 1.02	1.08	1.06	:	1.05	
:	:	:	:	:	:	
E/P	: 1.18	1.08	1.17	:	1.17	
:	:	:	:	:	:	
E/H	: 1.05	1.05	1.04	:	1.04	
:	:	:	:	:	:	
E/Sd	: 0.99	0.99	0.95	:	0.97	
:	:	:	:	:	:	
E/Sn	: 1.29	1.29	1.29	:	1.29	
-----						
(2) Extraction par la "nouvelle méthode"						
E/P	: 1.04	1.02	1.00	1.02	:	1.02
:	:	:	:	:	:	:
E/C	: 1.01	1.25	1.02	1.18	:	1.11
:	:	:	:	:	:	:
E/H	: 0.67	0.70	0.62	0.67	:	0.66
:	:	:	:	:	:	:
E/Sd	: 1.30	1.46	1.20	1.12	:	1.27
:	:	:	:	:	:	:
E/Sn	: 1.23	1.32	1.74	1.69	:	1.49
-----						
(3) Extraction par la méthode MIETZ et KARMAS						
E/P	: 1.50	0.48	1.23	0.75	0.85	: 0.96
:	:	:	:	:	:	:
E/C	: 3.69	1.33	1.74	1.46	1.90	: 2.02
:	:	:	:	:	:	:
E/H	: 0.93	0.55	0.76	0.72	0.72	: 0.73
:	:	:	:	:	:	:
E/Sd	: 2.18	0.81	3.60	1.18	1.75	: 1.90
:	:	:	:	:	:	:
E/Sn	: 11.9	12.7	9.07	5.90	7.84	: 9.40

Tableau 16: Rapports de l'étalon interne (E = 1,3 diamino-propane) sur chacune des amines (P = putrescine, C = cadavérine, H = histamine, Sd = spermidine, Sn = spermine) : sans extraction (1), avec extraction par la "nouvelle méthode" (2), avec extraction par la méthode de MIETZ et KARMAS (3).

L'analyse de ce tableau permet de formuler les observations suivantes. Premièrement l'expérimentation témoin, c'est à dire sans extraction, donne des valeurs très constantes pour chacun des rapports étudiés : ceci met en évidence la fiabilité et la reproductibilité de la réaction de dansylation. Deuxièmement lorsqu'on pratique le protocole de la "nouvelle méthode", la dispersion des valeurs d'un même rapport est plus élevée mais reste faible, notamment pour la putrescine, la cadavérine et l'histamine. Troisièmement la comparaison de chaque rapport sans extraction (témoin) et avec extraction par la nouvelle méthode conduit à constater qu'il varie peu pour la putrescine et la cadavérine, qu'il est plus faible après extraction pour l'histamine, qu'il est plus élevé pour la spermidine et la spermine.

Ainsi, même si les rapports sont quelque peu modifiés lors de l'extraction par la " nouvelle méthode ", la stabilité des valeurs des différents essais pour chacune des amines permet d'envisager l'emploi du 1,3 diaminopropane comme étalon interne. Si le rendement de la " nouvelle méthode " n'est donc pas rigoureusement identique pour le 1,3 diamino propane et pour chacune des 5 amines, celui-ci sera de toute manière pris en compte dans la corrélation établie pour la " nouvelle méthode " entre la concentration en amines et la surface des pics obtenus.

La dernière remarque n'a ici qu'un intérêt secondaire puisque nous n'avons pas choisi de poursuivre avec la méthode de MIETZ & KARMAS, mais il apparait dans le tableau 16 que pour cette dernière les valeurs des rapports sont d'une part très dispersées et d'autre part très éloignées parfois des valeurs des témoins. Ceci confirme l'intérêt d'exploiter la " nouvelle méthode ".

*- calcul d'un taux de pertes :*

Pour évaluer les pertes résultant de la mise en oeuvre de la " nouvelle méthode ", pertes qui ne sont pas constantes d'une expérimentation à l'autre, on ajoutera aux 10 ml d'extrait trichloracétique de poisson prélevés pour l'analyse 0,5 ml de la solution d'étalon interne (2 mg de 1,3 diaminopropane dichlorhydrate / 10 ml NaHCO<sub>3</sub>) avant de poursuivre le protocole expérimental.

Le pic de 1,3 diamino propane obtenu sera comparé au pic obtenu par dansylation directe (cf. protocole témoin) : 0,5 ml de la même solution de 1,3 diaminopropane ont été additionnés directement de 2 ml de la solution de chlorure de dansyl, puis incubés 1 heure à 60° c. Après ajustement à 10 ml et filtration, 20 microlitres ont été injectés, ce qui a donné les résultats présentés dans le tableau 17 :

-----			
(		: surface du pic témoin de 1,3 diamino propane )	
(	ESSAI n°	:-----	
(		: 1ère série d'essais	: 2ème série d'essais )
(		:	:
(	1	: 674659	: 582255 )
(	2	: 650982	: 575352 )
(	3	: 631090	: 574574 * )
(	4	: 643172	: 589972 )
(	5	: 654207	: 533409 )
(	6	: 641520 *	: 578128 )
(	7	: 654322	: 585169 )
(	8	: 621208	: 568222 )
(	9	: 622349	: 566688 )
(	10	: 626297	: 592680 )
(	-----		
(	moyenne	: 641980	: 574442 )
(	-----		

Tableau 17: Surfaces des pics de 1,3 diamino propane obtenues avec le protocole témoin.  
(Les 2 séries de 10 essais ont été pratiquées sur la même solution à 6 jours d'intervalle)

Les astérisques correspondent aux surfaces déterminées sur les figures VIII et IX (annexe 2).

On a pu observer que la solution d'étalon interne n'est pas réellement stable, puisque ces résultats montrent une évolution de la surface moyenne entre des essais pratiqués sur une même solution après 6 jours de conservation à 3°C. Il convient donc de redéfinir cette surface avant chaque série d'analyses en effectuant une moyenne sur un minimum de 5 déterminations.

Cette surface moyenne du pic témoin rapportée à la surface du pic de 1,3 diamino propane obtenue en ajoutant l'étalon interne à l'échantillon analysé permet de définir le taux de pertes :

$$\text{taux de pertes} = \frac{\text{surface 1,3 diamino propane avec protocole témoin}}{\text{surface 1,3 diamino propane avec nouvelle méthode}}$$

Ce rapport exprime les pertes résultant des différentes étapes de la méthode, et permet de corriger les valeurs obtenues pour chaque amine.

2.2.6. Corrélation : concentration - surface des pics

Des gammes de dilutions des 5 amines ont été réalisées dans le TCA à 7,5 % : 0,25 g/l ; 0,50 g/l ; 0,75 g/l ; 1 g/l. (S'agissant des formes chlorhydratées, les quantités sont modifiées de manière à obtenir ces concentrations en amines). Le protocole expérimental retenu ("nouvelle méthode " sans purification) a été appliqué sur 10 ml de chaque dilution additionnés de 0,5 ml de la solution d'étalon interne.

Les quantités d'amines injectées et les surfaces correspondantes sont portées dans le tableau 18, où chaque surface correspond à la moyenne des résultats de 2 expérimentations, chaque résultat ayant été corrigé à l'aide du taux de pertes défini ci-dessus.

( Y )	SURFACE DES PICS ( X )				
(concentr. :	-----)				
(des solut.:	putrescine :	cadavérine :	histamine :	spermidine :	spermine )
(mg/10ml) :	:	:	:	:	:
(-----:	-----)				
(	:	:	:	:	)
( 2,5 :	1 574 418 :	1 544 483 :	1 254 869 :	895 048 :	441 427)
(	:	:	:	:	)
( 5 :	2 933 112 :	3 238 883 :	2 643 623 :	1 749 384 :	905 534)
(	:	:	:	:	)
( 7,5 :	4 622 845 :	4 657 861 :	3 960 629 :	2 573 969 :	1 429 257)
(	:	:	:	:	)
( 10 :	5 741 961 :	6 541 523 :	5 300 165 :	3 442 611 :	1 833 743)
(-----:	-----)				

Tableau 18. Surface corrigée (X) des pics des 5 amines obtenue par la "nouvelle méthode".

Les surfaces des pics obtenues pour chacune des concentrations des solutions d'amines ont permis d'établir les équations des droites de régression

$$Y = A.X$$

où Y = concentration de la solution d'amine injectée (mg/10 ml)

X = surface du pic

(ordonnée à l'origine = 0)

putrescine  $Y = 17,14895 \cdot 10^{-7} \cdot X$   $r = 0,9995$

cadavérine  $Y = 15,41147 \cdot 10^{-7} \cdot X$   $r = 0,9981$

histamine  $Y = 18,78499 \cdot 10^{-7} \cdot X$   $r = 0,9995$

spermidine  $Y = 29,18646 \cdot 10^{-7} \cdot X$   $r = 0,9999$

spermine  $Y = 53,63693 \cdot 10^{-7} \cdot X$   $r = 0,9993$

Les coefficients de corrélation linéaire (r) sont tous hautement significatifs. La quantité d'amine Y correspond à 10 ml de prise d'essai, cette valeur doit être multipliée par 20 pour donner la concentration en mg / 100 g de poisson, ou par 200 pour avoir une expression en ppm :

$$\text{putrescine (ppm)} = 34,30. 10^{-5}.X$$

$$\text{cadavérine (ppm)} = 30,82. 10^{-5}.X$$

$$\text{histamine (ppm)} = 37,57. 10^{-5}.X$$

$$\text{spermidine (ppm)} = 58,37. 10^{-5}.X$$

$$\text{spermine (ppm)} = 107,27. 10^{-5}.X$$

Le seuil minimal de surface des pics a été fixé sur l'intégrateur à la valeur de 1000, ceci pour limiter le nombre de pics parasites intégrés dans les résultats. On peut donc déterminer la sensibilité de la méthode pour chaque amine, les seuils de détection sont les suivants :

putrescine : 0,34 ppm

cadavérine : 0,30 ppm

histamine : 0,37 ppm

spermidine : 0,58 ppm

spermine : 1,07 ppm

Ce seuil de détection correspond à une valeur de l'ordre de  $10^{-8}$  mole d'amine pour 10 ml de prise d'essai.

### 2.2.7. Optimisation de la phase d'extraction trichloracétique

Des essais ont été pratiqués sur le protocole d'extraction trichloracétique de façon à déterminer si la méthode comprenant 2 extractions successives avec 50 ml de TCA est satisfaisante. Les expérimentations ont été faites avec du grondin rouge (*Trigla cuculus*).

Les surfaces corrigées des pics d'amines portées sur le tableau 19 correspondent à des modes d'extraction différents : 2 x 50 ml TCA 7,5 % ; successivement 50 ml, 25 ml et 25 ml ; 3x33,33 ml ; 4 x 25 ml. Les volumes récupérés après extraction ont été ajustés à 100 ml avant les prises d'essai.

(protocole	: 2 extractions	: 3 extractions	: 3 extractions	: 4 extractions)
(	:	:	:	)
(amines	: avec 50 ml	: 50 + 25 + 25 ml:	avec 33,33 ml:	avec 25 ml)
(putrescine	: 650 879	: 752 252	: 529 813	: 1 287 089 )
(	:	:	:	)
(cadavérine	: 2 727 513	: 2 658 972	: 2 622 085	: 3 462 296 )
(	:	:	:	)
(histamine	: 1 377 059	: 1 460 146	: 1 577 072	: 1 364 955 )
(	:	:	:	)
(spermidine	: 47 533	: 31 330	: 33 450	: 32 726 )
(	:	:	:	)
(spermine	: 68 468	: 70 095	: 62 870	: 48 892 )

Tableau 19 : Surfaces corrigées des pics des 5 amines obtenues avec 4 protocoles d'extraction trichloracétique différents par la "nouvelle méthode" sur *Trigla cuculus*.

On peut constater que les surfaces obtenues sont similaires avec 2 ou 3 extractions, mais qu'elles sont supérieures pour la putrescine et la cadavérine avec 4 extractions.

D'autres essais comparatifs ont ensuite été pratiqués avec les modes d'extraction suivants : 4 x 25 ml ; 5 x 25 ml. Les volumes ont ensuite été ajustés à 150 ml. Les résultats sont portés dans le tableau 20.

( protocole	: 4 extractions	: 5 extractions	)
(	:	:	)
( amines	: avec 25 ml	: avec 25 ml	)
( putrescine	: 2 072 906	: 1 786 518	)
(	:	:	)
( cadavérine	: 11 009 051	: 11 739 878	)
(	:	:	)
( histamine	: 2 939 736	: 3 564 569	)
(	:	:	)
( spermidine	: 13 567	: 13 769	)
(	:	:	)
( spermine	: 57 887	: 57 202	)

Tableau 20 : Surfaces corrigées des pics des 5 amines obtenues avec 2 protocoles d'extraction trichloracétique différents par la "nouvelle méthode" sur *Trigla cuculus*.

Les surfaces obtenues pour chacune des amines permettent de constater des différences entre 4 et 5 extractions, notamment pour la putrescine et l'histamine. Toutefois pour la putrescine le résultat est inférieur avec 5 extractions, l'ensemble des résultats ne permet donc pas de conclure globalement à l'intérêt d'une cinquième extraction.

De ces résultats nous retenons que le protocole comprenant 4 extractions peut être adopté. Il est cependant laborieux et perfectible, comme le montrent les résultats du tableau 21 obtenus en lavant le culot avec 25 ml de TCA à l'issue des 4 extractions.

(	protocole	:	lavage du	)	
(		:	culot avec	)	
(	amines	:	25 ml de TCA	)	
(	-----				)
(	putrescine	:	661 496	)	
(		:		)	
(	cadavérine	:	3 052 101	)	
(		:		)	
(	histamine	:	796 477	)	
(		:		)	
(	spermidine	:	10 479	)	
(		:		)	
(	spermine	:	33 043	)	
(	-----				)

Tableau 21: Surfaces corrigées des pics des 5 amines obtenues en lavant le culot avec 25 ml de TCA après 4 extractions.

Les résultats n'ont pas de valeur quantitative, car le volume n'a pas été ajusté. Ils démontrent par contre que l'extraction des amines du poisson n'est pas totale avec le protocole retenu, cette étape de l'expérimentation nécessiterait des travaux complémentaires.

#### 2.2.8. Exploitation de la "nouvelle méthode" sur le poisson

La mise au point de cette "nouvelle méthode" de dosage des amines biogènes du poisson a permis d'engager l'étude de leur évolution à 0°C dans 2 espèces : le merlan et le maquereau. Sur chacun des échantillons ont été déterminés simultanément les indices d'altération et les teneurs en amines biogènes : putrescine, cadavérine, histamine, spermidine et spermine. La totalité des résultats est présentée sur les tableaux I et II de l'annexe 3. Les tableaux III et IV de la même annexe indiquent les teneurs moyennes en amines biogènes (en ppm) obtenues pour chacun des indices. Les courbes d'évolution de la putrescine, de la cadavérine et de l'histamine sont présentées sur les figures 1 (merlan) et 2 (maquereau). Les évolutions des teneurs en spermidine et en spermine chez le maquereau peuvent être observées sur la figure 3.

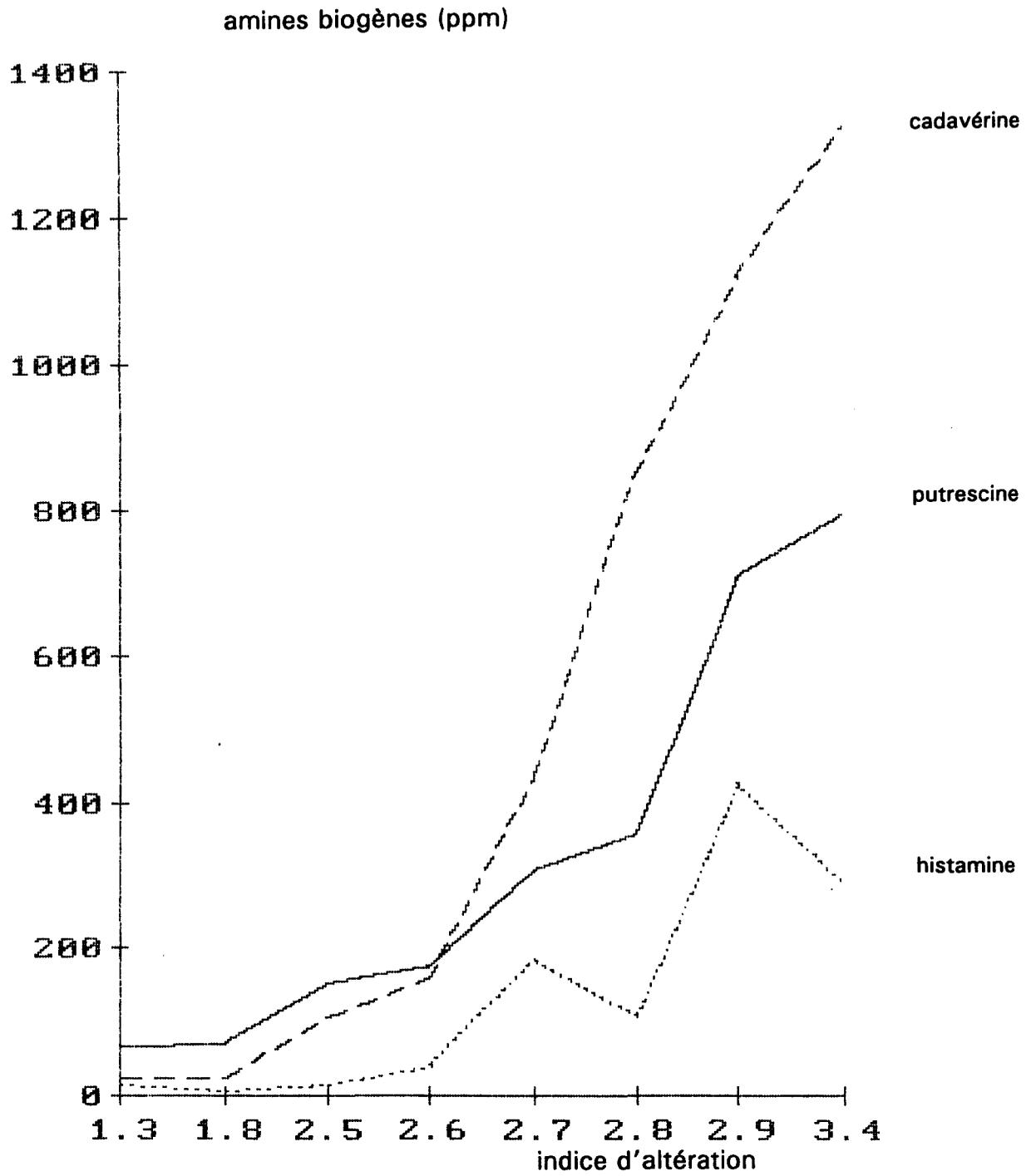


Figure 1. Formation de putrescine, cadavérine et histamine chez le merlan conservé à 0°C.

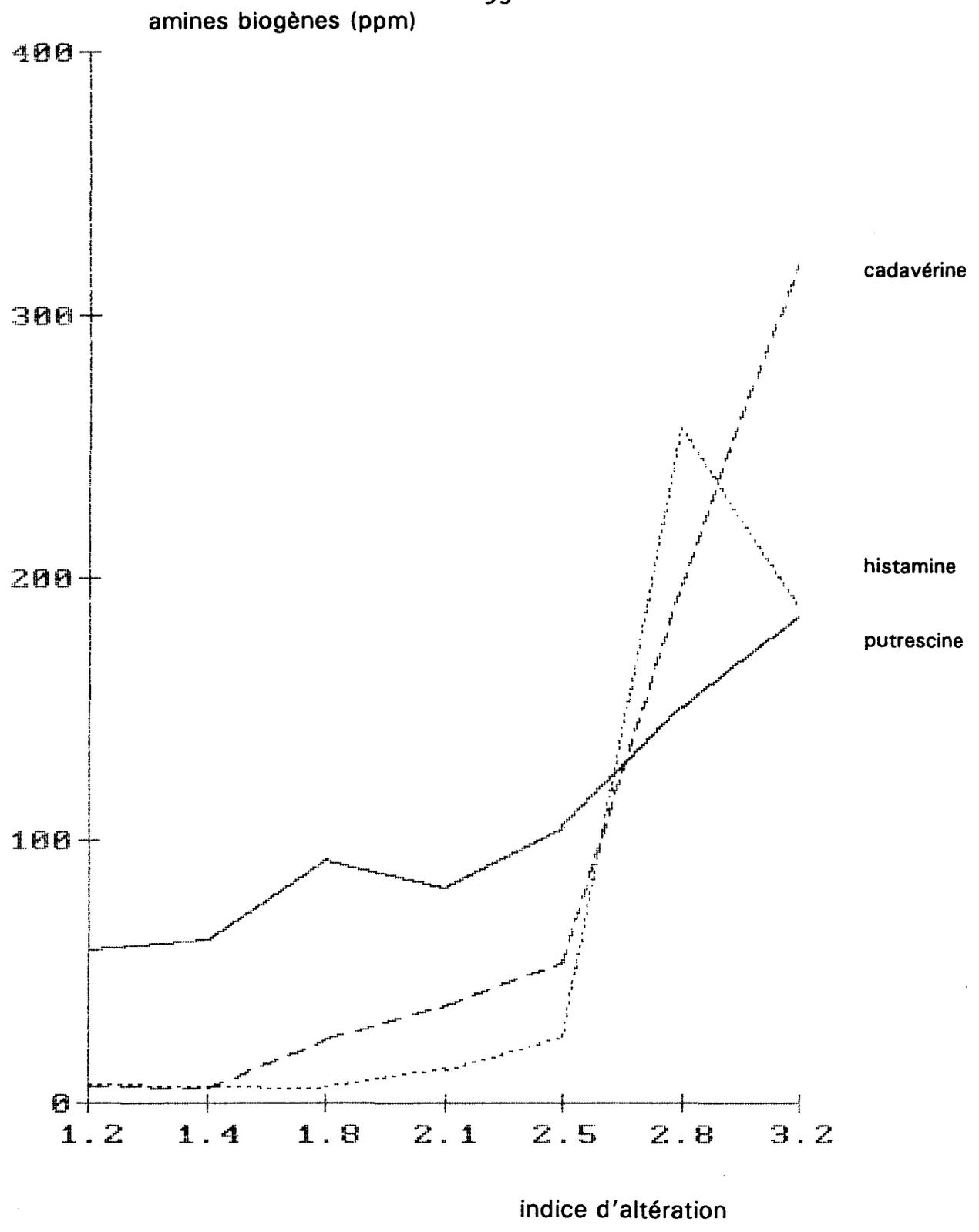


Figure 2. Formation de putrescine, cadavérine et histamine chez le maquereau conservé à 0°

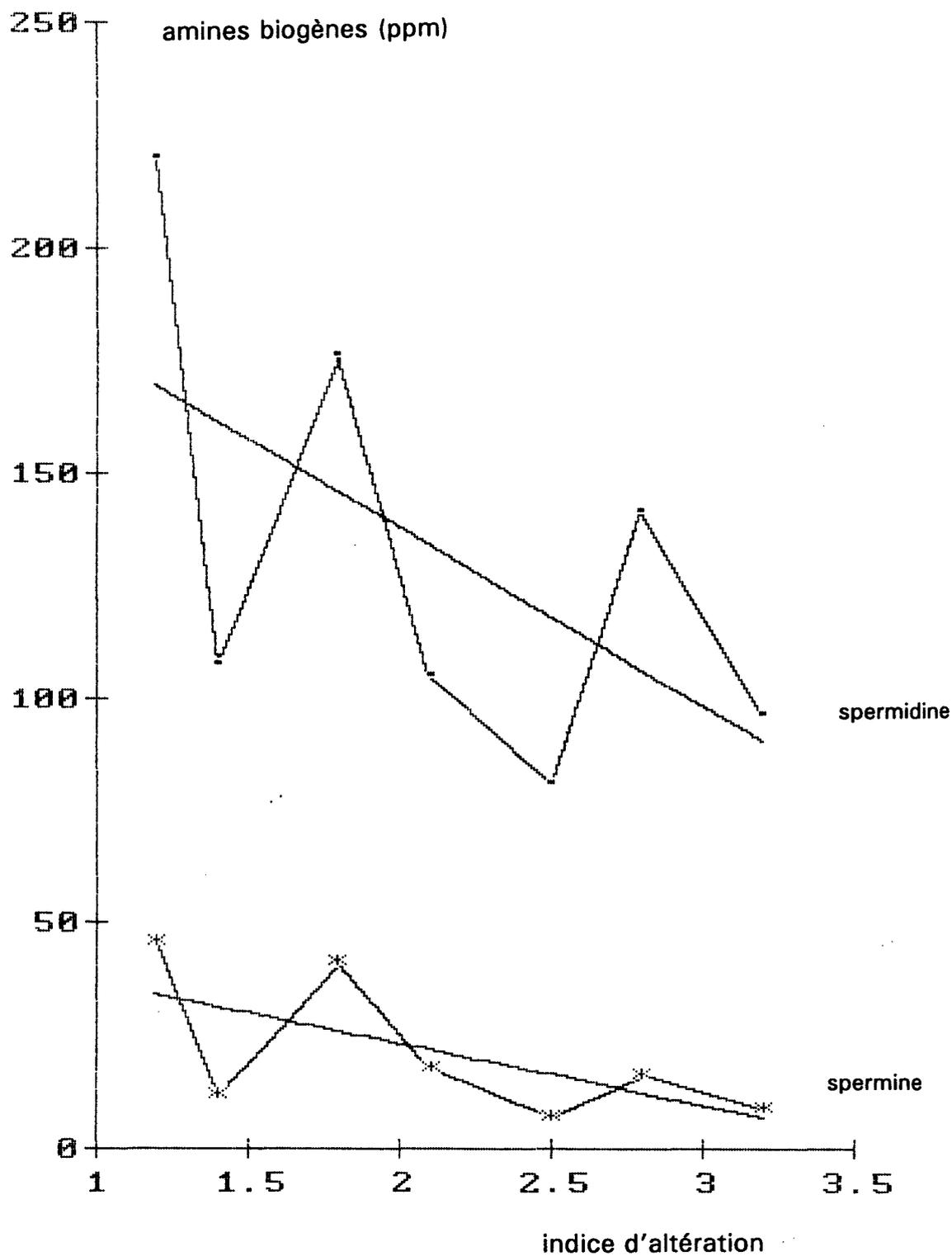


Figure 3. Evolution des teneurs en spermidine et spermine chez le maquereau conservé à 0°C

Les courbes représentant l'évolution de la putrescine, de la cadavérine et de l'histamine mettent en évidence une progression des teneurs en fonction du niveau d'altération. Les augmentations sont faibles dans les premiers stades, on peut ensuite observer une progression de type exponentiel qui se ralentit lorsque l'altération est très avancée. Concernant les polyamines : spermidine et spermine, non seulement on ne constate pas d'augmentation, mais l'évolution générale chez le maquereau indique une diminution des teneurs. Ces observations concordent avec celles de KARMAS (1981) qui a proposé un indice de qualité fondé sur les évolutions respectives des différentes amines (biogenic amine index) :

$$\text{BAI} = \frac{\text{histamine} + \text{putrescine} + \text{cadavérine}}{1 + \text{spermine} + \text{spermidine}}$$

Le principe sur lequel est fondé cet indice semble pouvoir être retenu, toutefois si les résultats que nous avons obtenus soulignent l'intérêt majeur de la putrescine, de la cadavérine et de l'histamine pour apprécier l'altération, ils ne mettent en évidence qu'un intérêt tout à fait secondaire de la spermidine et de la spermine.

Nous ne disposons pas actuellement d'un nombre suffisant de résultats pour discuter des teneurs en amines biogènes déterminées. Toutefois pour le maquereau, la courbe d'évolution de l'histamine est voisine de celle qui a été établie par RITCHIE et MACKIE (1980). D'autre part les teneurs en histamine déterminées chez le maquereau par KLAUSEN et LUND (1980) et correspondant au rejet sont respectivement de 43 ppm et 114 ppm pour des températures de conservation de 2°C et 10°C, les teneurs correspondantes en cadavérine étant de 200 ppm et 226 ppm. Ces valeurs permettent de situer nos résultats.

Les teneurs que nous avons déterminées pour chacune des amines dans les 2 espèces étudiées font apparaître des différences significatives d'une espèce à l'autre. KLAUSEN et LUND (1986) ont démontré que la formation des amines chez les Scombridés se différencie de celle des autres poissons, ce qui peut en partie expliquer les résultats que nous avons obtenus respectivement chez le merlan et le maquereau. Compte tenu de ces différences spécifiques, la détermination d'un indice de qualité intégrant tout ou partie des 5 amines biogènes étudiées, dont l'indice de KARMAS (BAI) constitue un exemple intéressant, s'avère nécessaire pour envisager une interprétation applicable aux différentes espèces.

La finalité de cette recherche est l'appréciation de la fraîcheur, cependant la méthode proposée permet de doser l'histamine, ce qui nous conduit à évoquer les problèmes de toxicité chez les Scombridés. Il existe une controverse sur le rôle exact de l'histamine dans l'intoxication dite "histaminique", ARNOLD et BROWN (1978) indiquent que d'autres amines peuvent avoir une action synergique. Des teneurs élevées en cadavérine augmenteraient les risques de toxicité dus à l'histamine (KLAUSEN et LUND, 1986). Ceci souligne la nécessité de disposer d'une méthode de dosage des principales amines biogènes qui soit à la fois fiable et compatible avec les exigences du contrôle.

Nos travaux ont consisté essentiellement à mettre au point une méthode visant ces objectifs. KARMAS et MIETZ (1978) avaient démontré que les dérivés dansylés peuvent être séparés facilement en HPLC avec une très grande sensibilité. Nous l'avons confirmé et c'est ce que nous avons gardé de leur méthode qui par ailleurs s'est révélée laborieuse et d'un rendement faible. Nous avons donc recherché un mode opératoire suffisamment simple pour éviter de cumuler des pertes successives de manière à augmenter le rendement et la fiabilité. Ces objectifs sont en partie atteints, et la démarche est poursuivie.

### 3. EVALUATIONS D'ACTIVITES MICROBIENNES

Les substances de dégradation les plus significatives provenant du catabolisme des substances azotées du muscle, nous avons envisagé d'apprécier le niveau d'altération du poisson en évaluant l'activité d'une part d'endopeptidases bactériennes et d'autre part d'enzymes microbiennes responsables de la réduction du TMAO.

#### 3.1 Activités peptidasiques

La dégradation bactérienne de différents substrats synthétiques entraîne la libération de substances chromogènes,  $\beta$  naphthylamide et p-nitroanilide, qui sont dosées au spectrophotomètre. Nous avons étudié l'intérêt de cette évaluation d'activités peptidasiques.

##### 3.1.1 Analyse des résultats obtenus avec les 6 substrats

Sont portés sur le tableau 22 les résultats des différents tests pratiqués sur le maquereau avec les 6 substrats suivants :

- A : L leucyl glycine  $\beta$  naphthylamide,
- B : glutaryl-glycyl-glycyl phénylalanine  $\beta$  naphthylamide,
- C : N benzoyl DL arginine p-nitroanilide,
- D : L valine  $\beta$  naphthylamide,
- E : L cystine di  $\beta$  naphthylamide,
- F : glutaryl L phénylalanine p-nitroanilide

Les coefficients de corrélation déterminés pour chaque substrat permettent d'analyser la liaison entre l'indice d'altération et le test d'activité peptidasique dont les résultats sont exprimés en D.O.

On observe que la liaison entre ces 2 critères n'est pas significative au risque de 5 % pour les réactifs B, C, D et E. Par contre il existe une liaison très significative au risque de 1 % pour les substrats A et F.

Des analyses complémentaires réalisées sur du maquereau avec les substrats A et F ont permis d'atteindre 32 couples de valeurs portés dans le tableau 23. Cette liaison hautement significative est confirmée, avec des coefficients de corrélation de 0,5649 (substrat A) et de 0,6341 (substrat F) supérieurs au seuil pour un risque de 1 % et un d.d.l. de 30 = 0,4487.

Est reportée dans le même tableau la moyenne arithmétique des D.O. obtenues pour les tests A et F. Le coefficient de corrélation est supérieur encore entre ce nouveau critère, globalisant les tests A et F, et l'indice d'altération : 0,6866. Ceci pourrait s'expliquer par une pondération des écarts.

( indice (d'altération	: A	: B	: C	: D	: E	: F
1,4	0,850	0,083	0,063	1,131	0,066	0,510
	0,876	0,055	0,059	1,225	0,120	0,634
1,5	0,935	0,052	0,078	1,030	0,118	0,387
	0,875	0,108	0,110	0,536	0,066	0,301
1,6	0,814	0,106	0,111	0,975	-	0,963
	0,678	0,072	0,132	0,823	0,098	0,372
1,7	0,781	0,082	0,082	0,767	0,101	0,339
	0,734	0,072	0,054	0,646	0,062	0,402
1,8	0,695	0,050	0,054	1,093	0,061	0,315
	0,825	0,082	0,111	0,889	0,104	0,423
	0,842	0,062	0,111	1,038	0,086	0,322
2,0	0,545	0,181	0,273	1,088	0,185	0,287
	0,548	0,196	0,172	0,647	0,216	0,363
2,2	0,583	0,151	0,119	0,975	0,093	0,349
2,3	0,686	0,084	0,086	1,242	0,086	0,486
2,4	0,530	0,097	0,140	0,964	0,106	0,286
	0,562	0,222	0,232	1,145	0,174	0,246
2,5	0,684	0,069	0,080	0,842	0,162	0,389
	-	0,074	-	1,038	-	0,401
	0,384	0,091	0,105	0,392	0,064	0,218
2,6	0,403	0,113	0,112	0,357	0,126	0,259
2,7	0,607	0,107	0,122	0,541	0,093	0,243
3,2	0,631	0,062	0,082	0,833	0,105	0,269
	0,437	0,120	0,140	0,477	0,093	0,104
(coefficient (de corrélation:	0,759	0,202	0,227	0,375	0,141	0,640

Tableau 22 : Résultats (exprimés en D.O.) des dosages de l'activité peptidasique du maquereau effectués avec les substrats : A (L leucyl glycine  $\beta$  naphthylamide), B (glutaryl-glycyl-glycyl phénylalanine  $\beta$  naphthylamide), C (N benzoyl DL arginine p-nitroanilide), D (L valine  $\beta$  naphthylamide), E (L cystine di  $\beta$  naphthylamide), F (glutaryl L phénylalanine p-nitroanilide).

indice	A	F	moyenne arithmétique des résultats des 2 tests
1,4	0,850	0,510	0,680
	0,876	0,634	0,755
1,5	0,935	0,387	0,661
	0,875	0,301	0,588
1,6	0,814	0,363	0,588
	0,678	0,372	0,325
1,7	0,781	0,339	0,560
	0,734	0,402	0,568
1,8	0,695	0,315	0,505
	0,825	0,423	0,624
	0,842	0,322	0,582
2,0	0,545	0,285	0,416
	0,548	0,363	0,455
2,1	0,657	0,171	0,414
2,2	0,583	0,349	0,466
2,3	0,686	0,486	0,586
	0,615	0,197	0,406
2,4	0,530	0,286	0,408
	0,562	0,246	0,404
2,5	0,684	0,389	0,536
	-	0,401	-
	0,384	0,218	0,301
2,6	0,403	0,259	0,331
2,7	0,607	0,243	0,425
	0,539	0,283	0,411
2,8	0,511	0,148	0,329
	0,872	0,451	0,661
2,9	0,844	0,135	0,489
	0,834	0,118	0,476
3,0	0,265	0,141	0,203
	0,541	0,278	0,409
3,2	0,631	0,269	0,450
	0,437	0,104	0,270

Tableau 23 : Résultats (exprimés en D.O.) des dosages de l'activité peptidasique du maquereau effectués avec les substrats : A (L leucyl glycine  $\beta$  naphthylamide), F (glutaryl L phénylalanine p-nitroanilide).

De l'analyse de ces résultats, il ressort que la L leucyl glycine  $\beta$  naphthylamide (A) et la glutaryl L.phénylalanine p-nitroanilide (F) sont les substrats les mieux appropriés pour déterminer le niveau de dégradation parmi ceux que nous avons étudiés. D'autre part la moyenne arithmétique des résultats obtenus par ces 2 tests est plus significative encore du niveau d'altération.

Nous avons constaté dès les premiers essais que la libération de chromogènes était inversement proportionnelle au niveau de l'altération. En poursuivant les essais, nous avons obtenu les résultats qui viennent d'être présentés et commentés, et qui ont confirmé cette observation. Une expérimentation complémentaire a alors été engagée dans le but de proposer une explication.

### 3.1.2 Expérimentation complémentaire

Pour les 2 substrats retenus, les équations des droites de régression sont les suivantes :

. L leucyl glycine  $\beta$  naphthylamide ..... : D.O. = - 0,1691 i + 1,0441

. glutaryl L phénylalanine p.nitroanilide : D.O. = - 0,1382 i + 0,6219

où i est l'indice d'altération.

Les pentes des droites sont négatives, donc l'hydrolyse du substrat est d'autant plus faible que l'altération est plus avancée. Or nous avons mis au point ces tests en considérant que l'hydrolyse du substrat fourni aux bactéries serait proportionnelle au niveau de contamination bactérienne, et donc au niveau d'altération . Ainsi nous sommes conduits à émettre l'hypothèse d'une compétition entre les substrats naturels utilisés habituellement par les bactéries (peptides, acides aminés) et les substrats synthétiques proposés.

L'expérimentation effectuée sur du maquereau avec la glutaryl L phénylalanine p.nitroanilide seule, ou avec ce substrat additionné de *casamino-acid*, a donné les résultats présentés sur la figure 4.

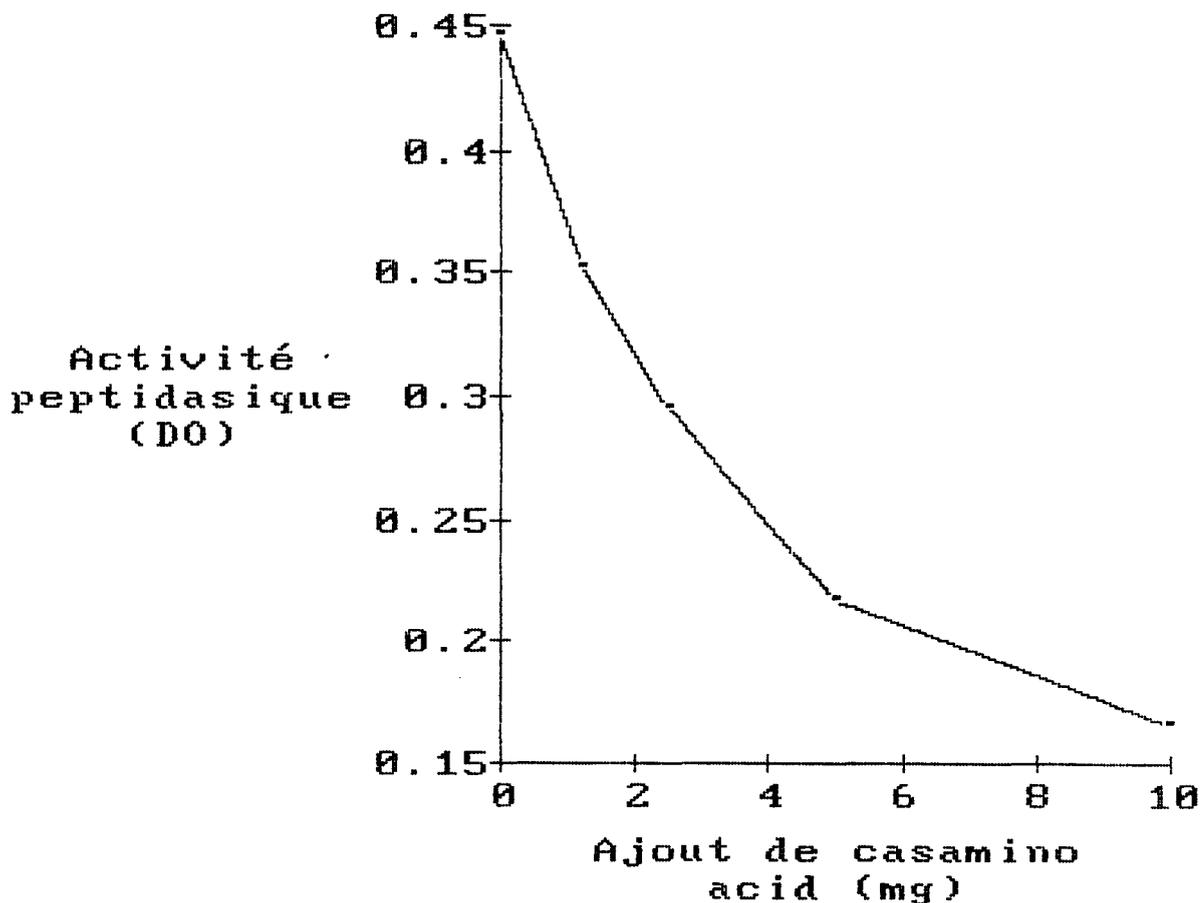


Figure 4 . Incidence de la présence de *casamino-acid* sur l'hydrolyse du substrat exprimée en D.O.

La réponse au test est d'autant plus faible que la quantité de *casamino-acid* ajoutée est plus élevée. Ceci confirme notre hypothèse : l'hydrolyse du substrat synthétique proposé aux bactéries diminue avec l'altération parce que les substances naturelles de dégradation du poisson, remplacées dans notre expérimentation par le *casamino acid*, entrent en compétition avec le substrat proposé. C'est ainsi qu'on obtient une réponse inverse car on ne mesure pas réellement le niveau d'hydrolyse des substrats synthétiques, mais on évalue de manière indirecte la protéolyse du tissu musculaire du poisson.

Ceci pose le problème incontournable d'une compétition entre les substrats naturels et tous les substrats qui peuvent permettre d'envisager la mise au point d'un test. La conception de nos expérimentations repose toujours sur l'utilisation d'une suspension-mère riche de tous les constituants du muscle et non sur l'utilisation d'une suspension bactérienne.

Des essais pratiqués sur le merlan n'ont mis en évidence aucune liaison significative entre l'indice d'altération et le résultat des tests A (L leucyl glycine  $\beta$  naphthylamide) et F (glutaryl L phénylalanine p nitroanilide), puisque les coefficients de corrélation sont respectivement de 0,00198 et 0,0614 pour un d.d.l. de 15 alors que le seuil est de 0,4821 au risque de 5%. Des essais ponctuels effectués sur d'autres espèces (tableau 24) à 2 niveaux de fraîcheur (indices d'altération : 1,5 et 3) permettent d'envisager une exploitation de ces tests dans certaines espèces, alors que dans d'autres espèces il n'y a pas d'évolution significative. Cette variabilité des réponses est due à ce que la compétition ne s'exerce pas de la même façon dans toutes les espèces. Il faut donc s'orienter désormais sur un substrat naturel qui sera choisi préférentiellement par la majorité des populations bactériennes présentes.

		indice	:	:
		d'altération	1,5	3
espèces				
Carrelet	:	A	0,862	1,027
	:	F	0,390	0,336
Chinchard	:	A	1,050	0,197
	:	F	0,473	0,180
Dorade grise	:	A	0,587	0,480
	:	F	0,307	0,179
Hareng	:	A	1,038	0,517
	:	F	0,300	0,253
Limande	:	A	1,022	0,041
	:	F	0,387	0,325
Morue	:	A	1,145	0,798
	:	F	0,433	0,402
Grondin gris	:	A	1,016	0,923
	:	F	0,392	0,320
Rascasse du Nord	:	A	0,662	0,441
	:	F	0,395	0,152
Rouget	:	A	1,002	0,706
	:	F	0,318	0,217
Truite	:	A	1,114	0,146
	:	F	0,713	0,108

Tableau 24: Evolution de l'hydrolyse des substrats A et F exprimée en D.O.

Résultats (exprimés en D.O.) des tests effectués sur différentes espèces à 2 niveaux d'altération avec les substrats A et F.



A 20°C les valeurs se situent dans les 2 espèces au dessus du seuil correspondant au risque de 1 % (0,5487 pour un d.d.l. de 19 dans le cas du merlan ; 0,7079 pour un d.d.l. de 10 dans le cas du maquereau). Ainsi les liaisons se révèlent hautement significatives, ces résultats mettent en évidence une meilleure corrélation avec l'ABVT à 20°C qu'à 25°C.

### 3.2.3 Evolution des flores impliquées dans la réaction

L'exploitation des résultats du test TMAO a été complétée chez le merlan par l'étude de la cinétique du rapport  $R = \text{TMAO à } 25^\circ\text{C} / \text{TMAO à } 20^\circ\text{C}$ .

merlan :  $n = 21$  échantillons  
 $R = - 0,080 x + 1,692$   
 $r = 0,814$ .

Le rapport R évolue en fonction du nombre de jours de conservation (x). Il diminue au cours du temps, ce qui indique le passage progressif d'une flore microbienne préférant la température de 25°C à une flore mieux adaptée à 20°C. Les travaux antérieurs où nous avons comparé les températures de 25°C et 37°C permettaient de constater que les températures supérieures à 30°C ne convenaient pas à la flore d'altération du poisson. Les résultats ci-dessus confirment le caractère psychrotrophe de la flore dominante et permettent de penser que le choix de la température de 20°C est préférable pour apprécier la flore d'altération. La discussion sur la température optimale d'incubation, 20°C ou 25°C, est poursuivie plus loin dans le cadre des dénombrements des flores aérobies totales.

#### *- remarque générale sur le test*

*En portant la durée d'incubation à 17 heures et en dosant la TMA produite au lieu de mesurer l'augmentation de pH, nous observons des variations significatives des valeurs même si les niveaux de contaminations sont bas. Nous disposons ainsi d'un test plus sensible permettant d'évaluer l'activité de faibles populations microbiennes.*

## 4. APPLICATION AU POISSON DE METHODES RAPIDES DE DENOMBREMENT

Les applications au poisson de méthodes de dénombrement dites rapides, reposant sur les techniques d'épifluorescence et de bioluminescence ATP, présupposent de pouvoir séparer les bactéries de leur substrat et de pouvoir les concentrer s'il s'agit de faibles contaminations.

### 4.1 Dénombrement de la microflore totale en épifluorescence

#### 4.1.1 Mise au point d'une technique de filtration

La méthode DEFT (Direct Epifluorescence Filter Technique) nécessite de concentrer les bactéries sur une membrane filtrante. La filtration est aisée pour les eaux (SIERACKI et al., 1985) ou le lait (PETTIPHER et al., 1980), ce n'est pas le cas pour les broyats de produits alimentaires solides. Le colmatage de la membrane par des débris d'aliments nécessite alors une préfiltration (PETTIPHER et RODRIGUES, 1982 ; QVIST et JAKOBSEN, 1985), et nous avons constaté que pour de nombreuses espèces de poissons un traitement enzymatique était nécessaire pour augmenter la filtrabilité.

La durée d'action des enzymes testées ne doit pas permettre une multiplication bactérienne qui entrainerait une surévaluation des microflores. Ceci a conduit à retenir un temps d'incubation maximum de 30 minutes. A l'inverse, pour éviter une sous-évaluation, le traitement enzymatique ne doit pas avoir d'effets bactéricides, c'est ce que nous avons entrepris de vérifier.

L'utilisation d'enzymes protéolytiques a pour but de lyser une partie des cellules somatiques responsables d'un colmatage rapide de la membrane, le choix s'est porté sur la trypsine (CAMASCHELLA et CISLAGHI, 1987 ; ROSSERO et al., 1987 ; ABGRALL et BOURGEOIS, 1989) et la papaïne qui est utilisée dans les usines de sous produits pour traiter le tissu musculaire des poissons, notamment dans les fabrications de farines et d'hydrolysats. Des essais complémentaires ont été réalisés avec un enzyme moins spécifique, la pronase isolée de *Streptomyces griseus*.

##### 4.1.1.1 *Mise au point d'un traitement enzymatique*

Les essais ont été réalisés sur un broyat de filet de maquereau (*Scomber scombrus*) qui est très peu filtrable. L'efficacité de l'action enzymatique est évaluée en déterminant le volume de filtrat obtenu. Les résultats des traitements pratiqués, après une décantation de 5 minutes, avec la trypsine ou la papaïne, sont portés respectivement sur les tableaux 25 et 26.

( volume de trypsine ajoutée	:	0	:	1	:	1,5	:	2	)
( (ml /10 ml de broyat)	:		:		:		:		)
( volume filtré ( ml)	:	6,5	:	10,5	:	12	:	15,5	)
(	:		:		:		:		)
( colmatage	:	+	:	+	:	+	:	+	)

Tableau 25 : Action de la trypsine sur un broyat de maquereau exprimée par le volume filtré.  
(volume initial de broyat : 20 ml)

( volume de papaïne	:	0	:	10	:	20	:	30	:	40	)
( ajoutée ( $\mu$ l / 10 ml)	:		:		:		:		:		)
( volume filtré (ml)	:	7,5	:	10	:	10,5	:	10	:	13,5	)
(	:		:		:		:		:		)
( colmatage	:	+	:	+	:	+	:	+	:	+	)

Tableau 26 : Action de la papaïne sur un broyat de maquereau exprimée par le volume filtré.  
(volume initial de broyat : 20 ml)

Des essais ont été pratiqués sur un broyat identique avec un mélange trypsine papaïne. Ce traitement réalisé après préfiltration sur BAGFILTER a donné les résultats portés sur le tableau 27.

( mélange enzymatique	:		:		:		:		:		)
( . trypsine (ml/10ml)	:	0	:	0,5	:	0,5	:	1	:	1	)
( . papaïne ( $\mu$ l/10ml)	:	0	:	10	:	40	:	10	:	40	)
( volume filtré	:	8,5	:	20	:	20	:	20	:	20	)
(	:		:		:		:		:		)
( colmatage	:	+	:	-	:	-	:	-	:	-	)

Tableau 27 : Action du mélange trypsine papaïne sur un broyat de maquereau exprimée par le volume filtré  
(volume initial de broyat : 20 ml)

Le mélange 0,5 ml de trypsine et 40  $\mu$ l de papaïne pour 10 ml de broyat préfiltré a permis d'obtenir un éclaircissement plus net du broyat. C'est cette composition du mélange enzymatique que nous avons retenue.

#### 4.1.1.2 Effet bactéricide du mélange enzymatique

Des dénombrements de flore aérobie mésophile ont été réalisés sur des poissons diversement altérés, avec ou sans hydrolyse enzymatique préalable. Les résultats sont portés sur la figure 5 .

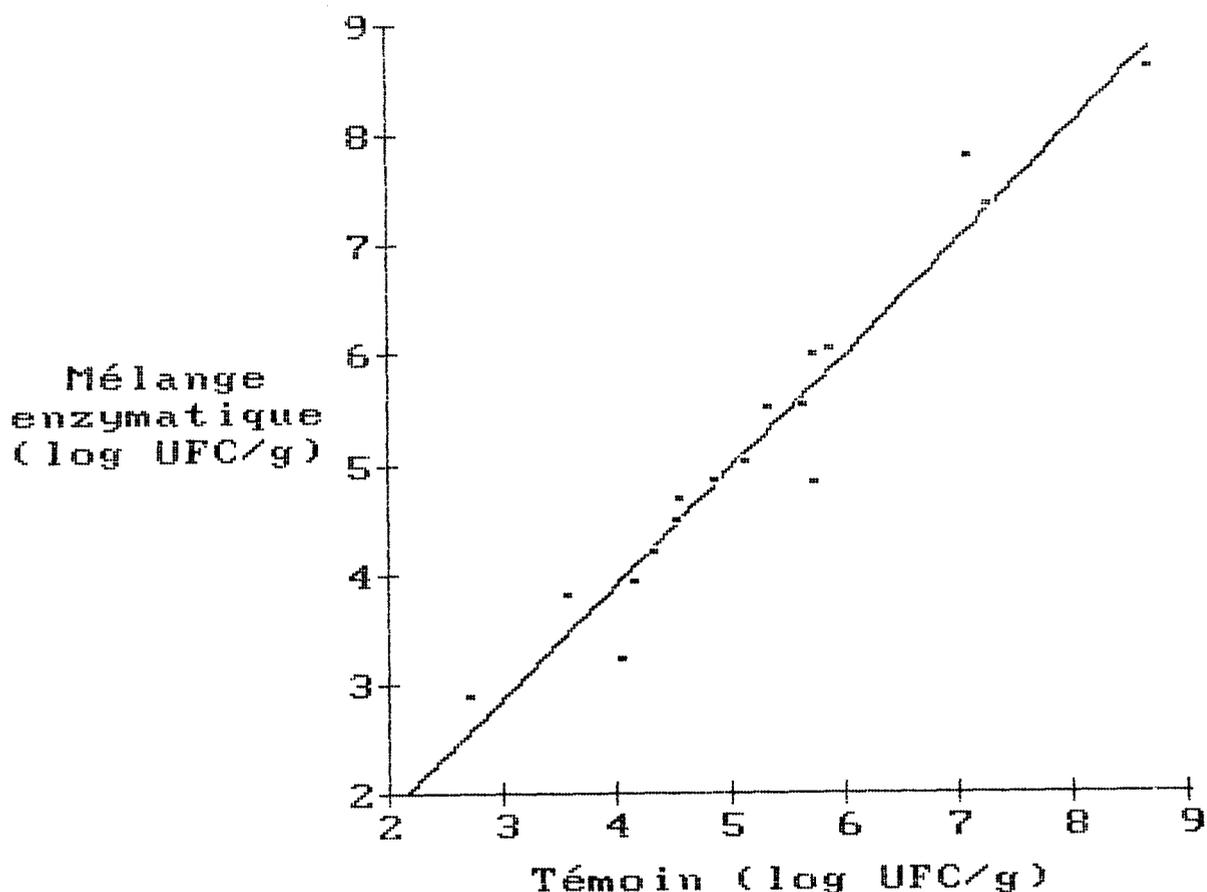


Figure 5 . Action du mélange enzymatique "trypsine papaïne" sur la flore aérobie mésophile totale du poisson

$$\begin{aligned}n &= 17 \text{ échantillons} \\y &= 1,04 x - 0,29 \\r &= 0,97.\end{aligned}$$

Ces résultats ne mettent en évidence aucun effet bactéricide significatif.

#### Commentaires :

- Pour la mise au point du traitement enzymatique notre choix s'est porté sur le maquereau à la suite d'une étude préalable qui nous a permis de déterminer de grandes différences de filtrabilité selon les espèces. Des essais pratiqués sur 10 espèces différentes ont permis de distinguer 3 catégories de poissons selon les volumes obtenus par filtration directe après décantation gravimétrique et préfiltration :

\* volume filtré supérieur ou égal à 20 ml :

. cabillaud	<i>Gadus morrhua</i>
. lieu noir	<i>Pollachius virens</i>
. flétan	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>

\* volume filtré compris entre 5 et 20 ml :

. merlan	<i>Merlangus merlangus</i>
. hareng	<i>Clupea harengus</i>
. lieu jaune	<i>Pollachius pollachius</i>

\* volume filtré inférieur ou égal à 5 ml :

. maquereau	<i>Scomber scombrus</i>
. rascasse	<i>Sebastes marinus</i>
. loup	<i>Anarhichas lupus</i>
. tacaud	<i>Gadus luscus</i>

- Des essais ponctuels ont été réalisés avec la pronase. Elle permet d'augmenter notablement la filtrabilité, mais les données sont insuffisantes pour en tirer des conclusions fiables. Il n'a pas été mis en évidence d'effet bactéricide significatif, et il serait possible de compléter ces travaux pour envisager d'ajouter la pronase au mélange "trypsine papaïne".

#### 4.1.2 Comparaison des dénombrements en épifluorescence et en milieu gélosé

Le traitement enzymatique mis au point ci-dessus a été intégré au mode opératoire et appliqué selon le protocole suivant à des filets de maquereaux : le broyat dans le tryptone-sel est décanté dans le sachet BAGFILTER, la suspension ainsi clarifiée est soumise à l'hydrolyse enzymatique, et l'hydrolysate subit une préfiltration (20  $\mu$ ) puis une filtration (0,45  $\mu$ ). Cette dernière permet de retenir les bactéries sur une membrane qui est alors traitée pour effectuer le dénombrement en épifluorescence.

Les résultats obtenus sont représentés graphiquement sur la figure 6 .

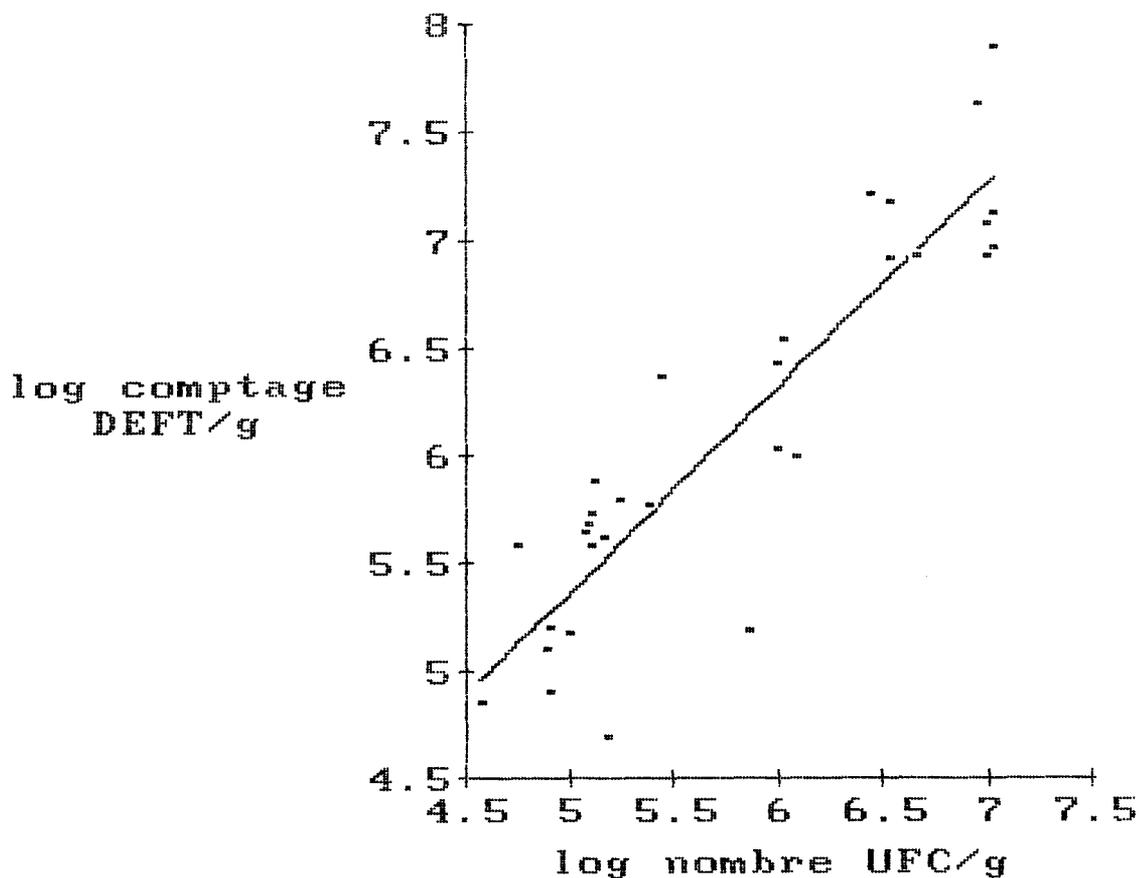


Figure 6. Corrélation entre les dénombrements en épifluorescence (DEFT) et en milieu gélosé (PCA 30°C)

Soit  $x = \log$  du nombre UFC (PCA.30°C)/g,  
 $y = \log$  du nombre bactéries (DEFT)/g,

l'équation de la droite de régression est :

$$y = 0,952 x + 0,589$$

avec les paramètres de corrélation linéaire suivants :

$$n = 31$$
$$r = 0,901$$

La valeur de ce coefficient de corrélation se situe très nettement au dessus du seuil correspondant au risque de 1 % avec un degré de liberté égal à 29. La liaison entre les résultats obtenus par les 2 méthodes est donc hautement significative.

Comme dans l'analyse statistique détaillée précédemment pour le critère P (TMA / ABVT), nous pouvons déterminer pour les valeurs obtenues par les 2 méthodes de dénombrement la précision d'estimation à partir de l'écart-type lié

$$\Sigma = \sqrt{\sigma^2 (1 - r^2)}.$$

La précision d'estimation est donc de  $1,96\Sigma$ , soit :  $1,96 \times 0,373 = 0,731$  unité log., pour un intervalle de confiance de 95 %.

La bonne corrélation obtenue entre les résultats des 2 méthodes ne doit pas cacher les difficultés de l'application de la méthode DEFT au poisson. En effet la mise en oeuvre de cette méthode sur des produits alimentaires solides broyés pose le problème de la filtrabilité des suspensions (ABGRALL et BOURGEOIS, 1989). Dans le cas du poisson, ce problème est particulièrement difficile à résoudre. La filtrabilité des broyats, qui est variable selon les espèces, se révèle parfois excessivement faible. Cette mise au point pour la méthode DEFT d'une technique de filtration intégrant un traitement enzymatique a une double finalité puisqu'elle permet également d'envisager l'application de l'ATP métrie au poisson.

En conclusion de leurs travaux, ABGRALL et BOURGEOIS (1989) observent que les homogénats de chair de poisson contiennent encore, après la mise en oeuvre de leur protocole, des micro-particules ; celles-ci constituent, compte tenu de l'amplification microscopique, un bruit de fond important (coloration verte) gênant le dénombrement. Notre technique, qui comporte une décantation, une hydrolyse enzymatique, une préfiltration et une filtration, ne supprime pas cet inconvénient, mais l'atténue.

Il est relativement facile de respecter la règle qui consiste à choisir de manière aléatoire les champs à dénombrer. Par contre les recommandations de PETTIPHER et al. (1980, 1986) relatifs à la densité cellulaire des champs n'ont pas toujours été suivies : pour obtenir 25 à 150 agglomérats par champ, il est parfois nécessaire de faire de nouvelles préparations, ce qui augmente à la fois la durée et le coût de l'analyse.

Si on considère que le nombre de bactéries par champ doit être égal ou supérieur à 25, on peut définir à partir du seuil théorique de détection (comptage d'un agglomérat par champ), qui se situe à environ 20 000 bactéries/g, le seuil pratique de la méthode qui est dans nos conditions de travail de  $5 \cdot 10^5$  bactéries/g de poisson. Dans leurs travaux, ABGRALL et BOURGEOIS (1989) indiquent un seuil pratique d'application de  $7,3 \cdot 10^5$ /g. Lorsque c'est techniquement possible, la filtration de 20 ml au lieu de 10 nous permet de descendre à un seuil pratique de 250 000/g, ce n'est pas possible pour toutes les espèces et c'est un seuil relativement élevé compte tenu des niveaux des flores généralement rencontrés dans le poisson.

Les recommandations de PETTIPHER, indiquées précédemment au sujet de la densité cellulaire des champs, ne correspondent pas à celles de DELATTRE (1986) qui estime que le nombre de germes ne doit pas être supérieur à 30 ou 40 par champ. Il estime qu'au delà il est difficile en comptage visuel de dénombrer tous les germes, mais nous avons contourné cette difficulté en adaptant au niveau de l'oculaire un accessoire comportant un quadrillage. Il indique d'autre part que la fluorescence de l'acridine orange s'affaiblit rapidement, ce que nous avons constaté. Pour notre part, nous pensons comme PETTIPHER qu'une densité cellulaire de 150 agglomérats par champ reste acceptable, et nous considérons comme DELATTRE que des valeurs inférieures à 25 peuvent être prises en compte, ce qui conduit à nuancer le propos ci-dessus. Si cette valeur est portée à 10, le seuil pratique de la méthode se situe alors à 200 000 bactéries/g en filtrant 10 ml.

#### 4.2. Appréciation de la qualité microbiologique par bioluminescence

Les populations bactériennes présentes dans le muscle des poissons sont relativement réduites à l'exception des cas où le poisson devient inconsommable. Pour obtenir une réponse en ATP métrie, il convient donc de concentrer les bactéries comme pour la méthode DEFT, et la technique d'hydrolyse enzymatique mise au point pour cette dernière a donc été appliquée également à la bioluminescence ATP.

#### 4.2.1 Etude de l'évolution de l'ATP somatique dans le poisson

*Post mortem*, l'abaissement du potentiel d'oxydo réduction entraîne le passage de la glycolyse aérobie, où il y a décomposition du glycogène en eau et CO<sub>2</sub> avec régénération de l'ATP en quantité suffisante, à la glycolyse anaérobie dont le rendement est mauvais, ce qui entraîne une diminution du taux de resynthèse de l'ATP. Parallèlement la dégradation de l'ATP se poursuit sous l'action de l'ATPase sarcoplasmique. La disparition de l'ATP coïncide avec l'apparition de la *rigor mortis*, elle a lieu beaucoup plus tôt chez les poissons que chez les homéothermes (SAINCLIVIER, 1983 ; CHEFTEL, 1984). Nous avons étudié la disparition de l'ATP somatique chez la truite (*Salmo gairdneri*) et chez la sole (*Solea vulgaris*).

Pour cette étude le mode opératoire a subi quelques aménagements compte tenu du fait que l'analyse est pratiquée à un stade où le muscle est stérile.

Le poisson est tué dès son arrivée au laboratoire et le prélèvement est effectué stérilement dans la partie dorsale. A 200 µl d'un broyat au 1/10 dans le tryptone sel, on ajoute 100 µl de NRS ou de NRB. Après une durée d'action de l'extractant de 30 secondes, on ajoute 100 µl de LUMIT PM et on procède à la lecture immédiatement. Le seuil significatif est fixé à 100 URL. A chaque mesure est retirée la valeur du blanc (200 µl de tryptone sel).

Les résultats des tableaux 28, 29 et 30 sont exprimés en URL et correspondent à l'ATP contenu dans 200 µl de broyat. (Ces valeurs doivent être multipliées par un facteur 50 pour être rapportées à 1 g de poisson).

. évolution des taux d'ATP à température ambiante :

( durée de (conservation ( <i>post mortem</i> ( (heures)	poisson 1		poisson 2	
	NRS	NRB	NRS	NRB
( 0	68349	258723	264046	261924
( 2	312	4306	4481	267862
( 4	79 *	935	3643	31131
( 8	10 *	496	70 *	1188
( 10	122	615	215	1535

Tableau 28: Mesures de bioluminescence (exprimées en URL/0,02 g) déterminées après extraction avec NRS ou NRB chez la truite (*Salmo gairdneri*) conservée à température ambiante. (\* Valeurs inférieures au seuil).

( durée de (conservation ( post mortem ( (heures)	poisson 1		poisson 2	
	NRS	NRB	NRS	NRB
( 0	514	4502	754	25987
( 1	11 *	897	355	9417
( 3	7 *	996	51 *	2204
( 5	73 *	1371	88 *	983
( 7	28 *	1979	32 *	2372

Tableau 29 : Mesures de bioluminescence (exprimées en URL/0,02 g) déterminées après extraction avec NRS ou NRB chez la sole (*Solea vulgaris*) conservée à température ambiante.

Les résultats des tableaux 28 et 29 correspondant à une conservation à température ambiante sont en concordance avec les résultats de travaux rapportés par SAINCLIVIER (1983) : le taux d'ATP devient nul chez la carpe en 6 à 8 heures à 25°C. Nos résultats obtenus sur la truite et la sole permettent en effet de constater une chute rapide du taux d'ATP après la mort.

Une première remarque concerne les différences observées entre l'utilisation d'un extractant somatique (NRS) ou d'un extractant bactérien (NRB). Dans nos conditions expérimentales, le muscle est stérile aux différents stades étudiés, et l'ATP mesuré provient exclusivement des cellules somatiques. En utilisant en parallèle le NRS et le NRB, on attendait des résultats équivalents, or les mesures de bioluminescence sont nettement supérieures avec l'extractant bactérien. Le NRB a certes un pouvoir extractant plus élevé que le NRS puisqu'il est capable de perméabiliser la paroi bactérienne, mais le NRS est censé assurer l'extraction de tout l'ATP somatique. En fait il n'en est rien car les résultats indiquent qu'une partie de l'ATP somatique reste fixé à l'intérieur des cellules et n'est pas systématiquement libéré avec le NRS. Ceci peut s'expliquer par la structure complexe des cellules eucaryotes, notamment par la présence d'adénosine triphosphate dans les mitochondries et le reticulum endoplasmique (SHARPE et al., 1970). Il en résulte un vrai problème pour l'évaluation de l'ATP bactérien qui repose sur l'élimination préalable de l'ATP somatique.

La seconde remarque concerne les valeurs de bioluminescence obtenues respectivement avec la truite et la sole. On observe chez la truite de pisciculture, prélevée dans un bassin juste avant son arrivée au laboratoire, des valeurs très élevées au départ puisque l'appareil est saturé (valeurs supérieures à 100000 URL). Ce n'est pas le cas de la sole dont la mort a été provoquée au même instant que celle de la truite, mais qui avait subi antérieurement le stress de la capture et les conséquences de l'asphyxie. SOUDAN (1965) notait que les techniques de pêche traditionnelles, et notamment l'activité musculaire, l'asphyxie, les meurtrissures, activent l'apparition de la rigidité cadavérique, ce sont donc également des facteurs qui activent la chute du taux d'ATP. Ainsi dans les conditions usuelles de pêche, les valeurs d'ATP somatique sont déjà très basses lors du débarquement du poisson.

. évolution des taux d'ATP à 3°C :

( durée de (conservation ( post mortem ( (heures)	poisson 1		poisson 2	
	NRS	NRB	NRS	NRB
( 0	5542	257001	6322	266609
( 4	128	15351	92 *	2322
( 6	107	11488	74 *	1914
( 8	97 *	8633	64 *	1821
( 25	44 *	2134	64 *	1129

Tableau 30 : Mesures de bioluminescence (exprimées en URL/0,02 g) déterminées après extraction avec NRS ou NRB chez la truite (*Salmo gairdneri*) conservée à 3°C.

Les résultats portés sur le tableau 30 et correspondant à une conservation à 3°C conduisent à observer une chute des mesures de bioluminescence plus étalée dans le temps, mais la dégradation de l'ATP demeure très rapide et les valeurs se trouvent réduites d'un facteur de l'ordre de 50 après 4 heures de conservation. L'importance du choix de l'extractant se trouve à nouveau soulignée dans les résultats obtenus.

. dispersion des taux d'ATP du muscle :

Suite aux résultats précédents, nous avons choisi le NRB pour extraire l'ATP somatique. Dans cette expérimentation, nous avons effectué 4 mesures sur un même poisson à chaque stade de conservation pour déterminer si la répartition de l'ATP somatique dans les muscles est homogène. Les résultats sont portés dans le tableau 31.

( durée de conservation ) ( post mortem )	localisation du prélèvement			
	1	2	3	4
( 1 heure ) ( poisson 1 )	15382	10386	17958	39784
( 3 heures ) ( poisson 2 )	1992	1326	1622	2392
( 5 heures ) ( poisson 3 )	978	2300	796	1252
( 10 heures ) ( poisson 4 )	794	514	512	1154

Tableau 31 : Mesures de bioluminescence (exprimées en URL/0,02 g) déterminées après extraction avec NRB chez des truites (*Salmo-gairdneri*) conservées à température ambiante, en effectuant 4 prélèvements par poisson.

Ces résultats montrent une dispersion importante des taux d'ATP dans les différentes parties du muscle qui peut être due à la fois à une dispersion naturelle chez l'animal vivant, mais également à des vitesses de dégradation différentes dans le muscle, elle doit être prise en compte lors de l'interprétation.

En conclusion concernant l'ATP somatique, il faut retenir la chute rapide des teneurs initiales chez les poissons. SAINCLIVIER (1983) rappelle que l'amplitude de la disparition de l'ATP du muscle est principalement déterminée par l'importance de la teneur initiale en créatine phosphate, or les teneurs de ces composés sont plus faibles chez les poissons que chez les mammifères, d'où une évolution plus précoce. Les premières réactions de dégradation de l'ATP sont autolytiques. Selon BURT (1974) et IKEDA (1980), le passage à l'inosine 5 monophosphate est souvent en cours au moment de la mort du poisson dans le chalut, et il est complet après une journée de conservation au froid. Ceci explique l'abaissement rapide des taux d'ATP observés, et l'amplitude de la disparition s'est révélée extrêmement importante. Dans ces conditions, à l'exception de mesures de bioluminescence qui seraient effectuées dans les premières heures qui suivent la pêche, ce qui serait dénué de tout intérêt, on peut considérer que les quantités d'ATP somatique dans le muscle sont faibles et ceci limite son interférence avec l'ATP bactérien dans le poisson. Nous avons toutefois gardé le principe d'une extraction de l'ATP somatique avec le NRS suivie d'une hydrolyse, et la discussion préalable concernant l'efficacité de l'extractant somatique est peu déterminante dans le cas du poisson puisqu'une grande proportion de l'ATP non microbien a disparu.

Une remarque s'impose dans le cadre de cette discussion, à savoir que le terme d'"extractant bactérien" que nous avons utilisé précédemment convient mal au NRB, il est préférable de l'appeler "extractant total".

Autre précision nécessaire, les comparaisons entre NRS et NRB ont fourni des résultats suffisamment différents pour que les conclusions ne puissent être contestées, il faut toutefois savoir qu'il existe des phénomènes de "quenching", c'est à dire des interférences optiques dues au milieu ou des interférences chimiques dues aux réactifs. Ainsi les interférences ne sont pas identiques entre NRS et luciférase, ou NRB et luciférase, ce qui pourrait expliquer les différences entre les mesures si elles étaient faibles : ce n'est pas le cas.

#### 4.2.2 Corrélation entre les mesures de bioluminescence et les dénombrements en milieu gélosé.

Le mode opératoire utilisé pour séparer les bactéries du substrat est celui qui a été pratiqué pour la méthode DEFT, comprenant un traitement enzymatique du broyat, une préfiltration et une filtration.

A ce stade, la membrane qui a retenu les bactéries est traitée selon le protocole décrit page 61. Par rapport à la technique de ROSSERO et al. (1987), où le mélange NRS somase, et ultérieurement le NRB, sont introduits dans le dispositif de filtration, nous avons choisi d'extraire la membrane et de la traiter dans une boîte de Petri. D'autre part, suite au stress résultant de la filtration, il s'est avéré souhaitable de revivifier les bactéries dans un bouillon exempt d'ATP.

Les résultats obtenus sont représentés graphiquement sur la figure 7 :

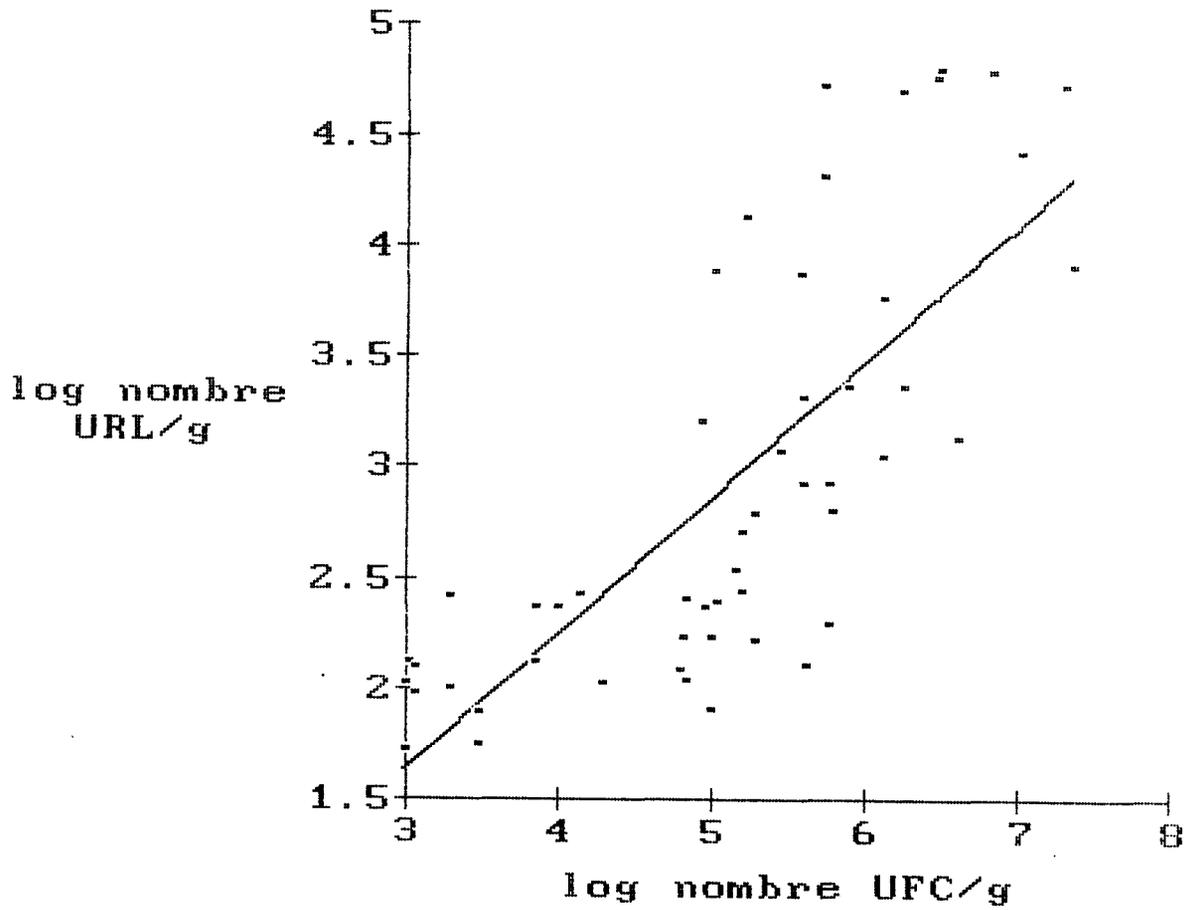


Figure 7. Corrélation entre les mesures de bioluminescence et les dénombrements en milieu gélosé (PCA.30°C)

Soit  $x = \log$  du nombre UFC (PCA 30°C)/g,  
 $y = \log$  du nombre URL/g,

l'équation de la droite de régression est :

$$y = 0,614 x - 0,223$$

avec les paramètres de corrélation linéaire suivants :

$$n = 52$$
$$r = 0,7590$$

La valeur du coefficient de corrélation est supérieure au seuil pour le risque de 1 % avec un degré de liberté égal à 50 (0,3541). La liaison est donc très significative.

La précision d'estimation est de  $1,96\sigma$ , soit :  $1,96 \times 0,636 = 1,247$  unité log., pour un intervalle de confiance de 95 %.

Nous avons également étudié cette corrélation en ne retenant que les dénombrements de flore aérobie mésophile inférieurs à 50 000 par g., l'équation de la droite de régression est la suivante :

$$y = 0,233 x + 1,258.$$

Pour cet échantillon de 14 couples de valeurs, on obtient  $r = 0,456$ . C'est une valeur inférieure au seuil correspondant au risque de 10 % pour un degré de liberté de 12. La liaison n'est pas significative.

Ainsi les mesures obtenues en ATP métrie sont bien corrélées avec les dénombrements sur PCA si on exploite l'ensemble des résultats. Par contre la corrélation n'est pas bonne si on se limite aux échantillons correspondant à des valeurs inférieures à 50 000 UFC/g.

S'agissant du poisson, les flores bactériennes peuvent être très basses et par conséquent inférieures à ce niveau. Il faut donc considérer que cette méthode rapide, qui permet d'évaluer la flore aérobie mésophile totale en moins de 2 heures, ne peut avoir exactement la même finalité que l'analyse microbiologique classique. Toutefois si elle est pratiquée sur un échantillon statistiquement significatif, elle peut incontestablement permettre de sélectionner des lots correspondants à différents niveaux de qualité microbiologique.

Il faut préciser ici que les valeurs corrélées correspondent à des approches très différentes. D'une part le dénombrement sur PCA ne permet d'obtenir que les bactéries revivifiables, qui cultivent dans les conditions de l'essai (POUMEYROL et GUITTONNEAU, 1987). D'autre part l'ATP métrie prend en compte toutes les bactéries, mais les taux d'ATP diffèrent selon leur stade physiologique (BIGRET, 1984 ; CARLIER et al., 1983). Ajoutons à cela que chaque genre bactérien est susceptible de libérer une quantité différente d'ATP par unité de temps (SHARPE et al., 1970 ; QUESNEAU, 1983 ; CARALP, 1987), et que le substrat lui-même peut avoir une influence sur les mesures (BOTHIA et al., 1986). Dans les produits alimentaires comme le poisson, où les microflore sont très hétérogènes, les conditions ne sont donc pas optimales pour l'application de cette méthode. Toutefois des résultats concordant avec ceux de méthodes classiques, ont pu être obtenus aux conditions suivantes : un protocole bien défini est rigoureusement respecté, et une microflore bactérienne suffisamment développée.

## 5. ETUDE COMPARATIVE DE TESTS D'EVALUATION QUALITATIVE DU POISSON

Les évaluations du niveau d'altération par différentes méthodes étudiées précédemment ont été réalisés d'une part sur des poissons entiers, d'autre part sur des filets, ceux ci constituant sur le plan microbiologique un cas de figure très différent.

### 5.1. Poissons entiers

Une étude approfondie a d'abord été menée sur des poissons entiers, ce choix permet de disposer d'un critère supplémentaire par rapport aux filets de poisson : l'indice d'altération, qui constitue un élément de référence largement reconnu (tableaux 32, 33 et 34).

( Indice :	ABVT :	TMA :	P :	TMAO 20°C :	TMAO 25°C :	PCA 30°C :
( : (mg/100g)	: (mg/100g)	: (%)	: (mg/100g)	: (mg/100g)	: (log)	
( 1,4 :	11,62 :	2,49 :	21,43 :	37,33 :	74,67 :	2,48
( 1,4 :	11,9 :	2,21 :	18,57 :	31,11 :	52,89 :	2,48
( 1,4 :	12,45 :	2,49 :	20 :	24,89 :	37,33 :	2
( 2,2 :	19,09 :	7,19 :	37,66 :	87,11 :	99,56 :	2,3
( 2,2 :	19,37 :	5,53 :	28,55 :	87,11 :	62,22 :	2
( 2,2 :	17,43 :	4,15 :	23,81 :	105,78 :	124,44 :	2
( 2,6 :	25,46 :	9,96 :	39,12 :	108,89 :	127,56 :	2,85
( 2,6 :	22,97 :	8,85 :	38,53 :	71,56 :	77,78 :	3,8
( 2,6 :	24,07 :	8,85 :	36,77 :	118,22 :	77,78 :	3,83
( 2,7 :	22,97 :	8,58 :	37,35 :	99,56 :	112 :	2
( 2,7 :	17,16 :	6,64 :	38,69 :	99,56 :	80,89 :	2,3
( 2,7 :	22,14 :	9,41 :	42,5 :	121,33 :	133,78 :	2
( 2,9 :	22,14 :	11,34 :	51,22 :	189,78 :	174,22 :	3
( 2,9 :	19,65 :	7,19 :	36,6 :	248,89 :	168 :	3,3
( 2,9 :	21,58 :	8,58 :	39,76 :	196 :	208,44 :	3,95
( 3,4 :	48,42 :	23,8 :	49,15 :	199,1 :	155,5 :	4,6
( 3,4 :	55,34 :	30,44 :	55 :	280 :	146,2 :	4,6
( 3,4 :	44,27 :	30,44 :	68,76 :	233,33 :	230,2 :	4,3
( 3,8 :	44,3 :	21,6 :	48,76 :	227,11 :	112 :	4
( 3,5 :	30,4 :	15,2 :	50 :	162,22 :	136,89 :	4,77
( 3,5 :	36 :	23,5 :	65,28 :	108,89 :	205,3 :	4

Tableau 32 . Détermination de différents critères d'appréciation de la qualité chez le merlan entier conservé sous glace.

( Indice :	ABVT :	TMA :	P :	TMAO 20°C :	TMAO 25°C :	PCA 30°C :
( : (mg/100g)	: (mg/100g)	: (%)	: (mg/100g)	: (mg/100g)	: (log)	
( 1,6 :	12,73 :	1,11 :	8,72 :	/ :	121,33 :	2,18
( 1,6 :	12,73 :	1,11 :	8,72 :	/ :	84 :	2,3
( 1,8 :	16,05 :	1,11 :	6,92 :	/ :	56 :	2,3
( 2 :	12,45 :	2,76 :	22,17 :	130,66 :	149,33 :	3,78
( 2,2 :	13,8 :	2,21 :	16,01 :	149,33 :	124,44 :	3,45
( 2,2 :	13,8 :	1,94 :	14,06 :	105,78 :	102,66 :	3,69
( 2,6 :	14,66 :	/ :	/ :	192,9 :	149,33 :	4,03
( 2,6 :	14,11 :	/ :	/ :	174,22 :	174,22 :	3,78
( 2,8 :	21,03 :	/ :	/ :	108,9 :	93,33 :	4,28
( 4 :	31,5 :	13,3 :	42,22 :	258,22 :	211,55 :	4,48
( 4 :	37,3 :	18,8 :	50,40 :	180,44 :	217,78 :	4,3
( 3 :	18 :	4,15 :	23,06 :	143,11 :	180,44 :	4,48
( 3,3 :	40,95 :	22,69 :	55,41 :	314,22 :	248,89 :	4
( 3,3 :	45,1 :	20,48 :	45,41 :	267,55 :	130,66 :	4
( 3,4 :	49,81 :	28,22 :	56,66 :	217,78 :	164,89 :	4,3

Tableau 33 . Détermination de différents critères d'appréciation de la qualité chez le maquereau entier conservé sous glace.

( Indice :	ABVT :	TMA :	P :	TMAO 20°C :	TMAO 25°C :	PCA 30° :
( : (mg/100g)	: (mg/100g)	: (%)	: (mg/100g)	: (mg/100g)	: (log)	
( 1,6 :	12,45 :	1,94 :	15,58 :	18,67 :	62,22 :	2,20
( 1,6 :	11,90 :	1,38 :	11,60 :	71,56 :	84,00 :	2,74
( 1,6 :	14,39 :	1,94 :	13,48 :	65,33 :	90,22 :	2,54
( 1,8 :	12,73 :	2,49 :	19,56 :	267,55 :	276,89 :	2,13
( 1,8 :	11,90 :	2,21 :	18,57 :	217,78 :	230,22 :	3,11
( 1,8 :	12,73 :	1,94 :	15,24 :	183,55 :	227,11 :	1,90
( 2,4 :	24,07 :	12,73 :	52,89 :	273,78 :	292,44 :	2,85
( 2,4 :	17,71 :	7,47 :	42,18 :	295,55 :	438,67 :	3,15
( 2,4 :	13,84 :	4,70 :	33,96 :	317,33 :	398,22 :	4,21
( 3,4 :	62,81 :	47,59 :	75,77 :	320,44 :	836,89 :	4,21
( 3,4 :	29,05 :	17,99 :	61,93 :	336,00 :	672,00 :	4,74
( 3,4 :	54,79 :	44,27 :	80,80 :	298,67 :	360,89 :	5,13
( 4,5 :	84,39 :	51,19 :	60,66 :	323,55 :	367,11 :	6,37
( 4,5 :	71,66 :	54,79 :	76,46 :	261,33 :	270,67 :	5,27
( 4,5 :	64,75 :	52,02 :	80,34 :	239,55 :	248,89 :	5,48

Tableau 34 . Détermination de différents critères d'appréciation de la qualité chez le merlan entier conservé à 8°C.

Nous avons porté dans le tableau 35 les valeurs des coefficients de corrélation reliant chacun des critères chimiques (ABVT, TMA, P) et microbiologiques (TMAO 20°C, TMAO 25°C, PCA 30°C) à l'indice d'altération :

	(	ABVT	:	TMA	:	P	:	TMAO 20°C	:	TMAO 25°C	:	PCA 30°
merlan	:		:		:		:		:		:	
conservé à 0°C:		0,821	:	0,822	:	0,885	:	0,805	:	0,705	:	0,749
maquereau	:		:		:		:		:		:	
conservé à 0°C:		0,786	:	0,805	:	0,892	:	0,633	:	0,754	:	0,828
merlan	:		:		:		:		:		:	
conservé à 8°C:		0,940	:	0,945	:	0,907	:	0,604	:	0,515	:	0,936

Tableau 35 . Coefficients de corrélation reliant les critères chimiques et microbiologiques (y) à l'indice d'altération (x).

En prenant en compte les différents degrés de liberté, on constate que les liaisons sont toutes significatives, et la plupart hautement significatives puisque pour le merlan et le maquereau conservés à 0°C toutes les valeurs sont situées au dessus du seuil correspondant au risque de 1 %.

*- flore aérobic mésophile (PCA 30°C)*

Pour l'ensemble des poissons entiers, on dénombre des flores aérobies mésophiles basses, même quand l'ABVT est élevé (merlan et maquereau conservés sous glace). Ceci conduit à s'interroger sur leur signification en tant que flores d'altération.

On peut toutefois constater une excellente corrélation entre ce critère et l'indice d'altération, ce qui a motivé une analyse statistique complémentaire sur les résultats correspondant aux poissons conservés sous glace. La saisie étant systématique à l'indice 3 et fortement conseillée à l'indice 2,8, nous avons déterminé à nouveau les coefficients de corrélation entre chacun des critères et l'indice d'altération en ne retenant que les poissons d'indice inférieur à 2,8. Dans ces conditions, c'est à dire dans les limites où le poisson est consommable, la flore aérobic mésophile ne présente plus de liaison significative avec l'indice d'altération ( $r = 0,349$  pour un ddl de 15), alors que les autres critères (ABVT, TMA, P, TMAO 20, TMAO 25) restent bien corrélés avec l'indice. Les dénombrements sur PCA à 30°C constituent donc un critère contestable sur lequel nous reviendrons.

*- flore réductrice de l'oxyde de triméthylamine  
(TMAO 20°C - TMAO 25°C)*

Ces 2 critères gardent une liaison significative avec l'indice d'altération, que l'ensemble des résultats soient pris en compte ou les seuls résultats correspondant à un indice inférieur à 2,8. Ce critère microbiologique est donc plus représentatif des flores d'altération que ne l'est la flore aérobie mésophile.

Lorsqu'on analyse les résultats, il apparaît globalement que les coefficients de corrélation sont supérieurs quand l'incubation est effectuée à 20°C. Pour l'ensemble des poissons conservés sous glace, en reliant ces tests à l'indice d'altération, on obtient respectivement à 20°C et 25°C des coefficients de corrélation de 0,756 (ddl = 31) et 0,709 (ddl = 34). En ne retenant de ces mêmes déterminations que les poissons d'indice inférieur à 2,8, les valeurs sont 0,682 (ddl = 15) à 20°C et 0,504 (ddl = 18) à 25°C. Les valeurs se situent toutes au dessus du seuil correspondant au risque de 1%. Il semble préférable de choisir 20°C sans que toutefois les degrés de signification soient très différents entre 20 et 25°C.

$$- P = TMA / ABVT (\%)$$

Nous avons proposé initialement le critère P pour pallier aux insuffisances de l'ABVT. Dans les cas présents où l'ABVT se révèle un critère performant, il est toutefois intéressant de constater que le critère P a une liaison hautement significative avec le niveau d'altération, il permet alors de confirmer l'information fournie par l'ABVT et de l'affiner. En tout début d'altération, il présente l'avantage d'évoluer plus vite que l'ABVT.

Dans les différentes configurations, qu'il s'agisse de merlan ou de maquereau, d'une conservation sous glace ou à 8°C, les liaisons entre ce pourcentage P et les valeurs fournies par le test TMAO 20°C sont toutes hautement significatives, avec des valeurs des coefficients de corrélation très supérieures aux seuils pour le risque de 1 %. Or il s'agit de 2 nouvelles déterminations, le fait qu'elles fournissent des informations concordantes nous conforte dans l'idée qu'elles sont liées à des réactions essentielles dans le processus d'altération du poisson.

*- incidence de la température de conservation*

Lors de l'analyse des liaisons entre les différents critères chimiques ou microbiologiques et l'indice d'altération, nous avons établi par la méthode des moindres carrés les droites de régression et nous avons constaté pour chacun des critères que la pente des droites est plus élevée dans le cas d'une conservation à 8°C que dans celui d'une conservation à 0°C. Ceci avait déjà été souligné lors des travaux sur le critère P. Pratiquement cette différence ne fait pas obstacle à la détermination de valeurs de référence, elle pénalise le non respect de la conservation à 0°C, cette pénalisation est logique.

5.2. Filets

Dans l'étude des filets de poisson, nous avons retenu la température de 20°C pour le test TMAO.

(	ABVT	:	TMAO 20°C	:	PCA 30°C	)
(	(mg/100g)	:	(mg/100g)	:	(log)	)
(	10,13	:	73,12	:	4,07	)
(	10,42	:	130,66	:	5,08	)
(	11,17	:	90,22	:	4,86	)
(	12,43	:	60,70	:	5,03	)
(	12,77	:	87,11	:	5,60	)
(	13,27	:	149,33	:	5,53	)
(	14,03	:	182,43	:	5,69	)
(	14,70	:	360,89	:	6,23	)
(	15,04	:	77,78	:	5,25	)
(	15,12	:	62,22	:	5,00	)
(	16,21	:	292,44	:	5,84	)
(	17,56	:	189,78	:	4,64	)
(	17,60	:	336,00	:	5,91	)
(	22,34	:	77,78	:	4,60	)
(	27,30	:	384,22	:	6,65	)
(	29,15	:	320,44	:	5,82	)

Tableau 36 . Détermination de différents critères d'appréciation de la qualité de filets de merlans.

*- flore aérobie mésophile (PCA 30°C)*

On peut tout d'abord observer que les dénombrements des flores aérobies mésophiles (PCA 30°C) sont beaucoup plus élevés sur les filets qu'ils ne le sont sur les poissons entiers. D'autre part, si on étudie la liaison entre la flore aérobie mésophile et l'ABVT pour l'échantillon de 16 couples de valeurs, le coefficient de corrélation obtenu (0,458) est inférieur au seuil pour le risque de 5 %. Par contre la liaison entre le test TMAO 20°C et l'ABVT donne une valeur de 0,590, ce qui est supérieur au seuil pour le risque de 2 %.

Plusieurs éléments peuvent être proposés pour tenter d'expliquer la mauvaise corrélation entre la flore aérobie mésophile et l'ABVT. Les filets ont été analysés le jour du filetage ou dans les 2 jours suivants, la flore due aux contaminations exogènes n'a pas eu le temps de dégrader le poisson de manière significative. On peut penser d'autre part que la flore dénombrée sur PCA à 30°C ne correspond pas réellement à la flore d'altération. A l'inverse la flore réductrice du TMAO est bien corrélée avec l'ABVT, ce qui signifie que cette flore correspond davantage à la flore d'altération que la flore aérobie mésophile .

*- incidence du sel et de la température sur les dénombrements des "flores aérobies totales"*

Les dénombrements de flores totales sur PCA à 30°C ne constituent donc pas pour les poissons un critère d'altération fiable, même s'ils peuvent avoir une signification hygiénique. Ce constat n'est pas surprenant si on se reporte aux travaux de SHEWAN (1977) précisant le caractère psychrotrophe de la microflore des poissons pêchés dans des eaux froides ou tempérées. Les tendances halophiles de la microflore endogène des poissons marins constituent un autre élément à prendre en compte.

En gardant le principe de déterminer une "microflore totale", nous avons effectué des dénombrements dans des filets de poissons en utilisant d'une part le milieu PCA à 30°C et d'autre part le même milieu avec des paramètres de culture différents, notamment la concentration en NaCl et la température d'incubation.

Le milieu PCA salé diffère du milieu de base par l'addition de NaCl à la concentration de 35 g par litre, ce qui correspond à la salinité de l'eau de mer. Les températures retenues pour ces expérimentations sont 25°C et 20°C, températures permettant d'obtenir des résultats dans des délais acceptables, ce qui n'est pas le cas de la température de 8°C.

Les résultats sont portés sur le tableau suivant :

(Echant :	Incubation à 20°C		Incubation à 25°C		Incubation à 30°C	
	PCA	PCA salé	PCA	PCA salé	PCA	PCA salé
	x 10 <sup>3</sup>					
1	133	126	88	112	557	47
2	168	103	152	100	70	53
3	67	78	52	71	39	54
4	660	550	545	460	250	42
5	1 260	2 170	1 510	2 310	845	880
6	2 700	8 200	3 000	9 500	2 500	4 900
7	16 000	20 200	20 300	19 600	15 000	17 000
8	201 800	223 000	118 700	130 100	128 600	129 600
9	102 000	121 000	78 000	86 000	58 000	69 000
10	133 000	155 000	77 000	97 000	89 000	125 000
11	45 000	68 000	26 000	34 00	29 000	36 000
12	45 000	52 000	20 000	24 000	28 000	33 000
13	127	393	85	194	54	99
14	88	120	77	101	40	51
15	52	77	36	45	17	51
16	81	103	82	54	29	33
17	505	1 145	335	425	173	222
18	510	5 300	345	1 745	189	1 295
19	500	1 215	380	425	93	194
20	315	995	124	218	80	194
21	4 550	10 400	3 300	5 750	1 700	4 400
22	1 445	4 145	760	1 490	590	1 070
23	600	910	330	490	390	330
24	108 700	147 750	75 600	84 000	29 000	63 000
25	1 200	3 290	630	810	430	350
26	1 085	1 215	850	580	430	570
27	560	810	300	495	145	450
28	1 275	2 250	1 050	1 750	950	1 650
29	1 650	3 450	915	1 370	680	880
30	6 350	17 000	5 700	12 500	2 200	3 900

Tableau 37 . Analyses de filets de merlans : dénombrements réalisés sur PCA et PCA salé (3,5 % NaCl), incubations aux températures de 20°C, 25°C et 30°C.

Chaque valeur de ce tableau est une moyenne de 2 numérations.

Pour faciliter l'exploitation, nous avons calculé les rapports des dénombrements obtenus dans les différentes conditions de salinité et de température.

		( moyenne arithmétique )	
		( n = 30 )	
( (1)	<u>PCA 25</u>	:	1,70
(	PCA 30	:	
(		:	
( (2)	<u>PCA 20</u>	:	1,46
(	PCA 25	:	
(		:	
( (3)	<u>PCA salé 25</u>	:	1,90
(	PCA salé 30	:	
(		:	
( (4)	<u>PCA salé 20</u>	:	1,90
(	PCA salé 25	:	
(		:	
( (5)	<u>PCA salé 20</u>	:	2,02
(	PCA 20	:	
(		:	
( (6)	<u>PCA salé 25</u>	:	1,52
(	PCA 25	:	
(		:	
( (7)	<u>PCA salé 30</u>	:	1,68
(	PCA 30	:	
(		:	
( (8)	<u>PCA salé 20</u>	:	5,16
(	PCA 30	:	

Tableau 38. Moyenne des rapports entre dénombrements obtenus sur PCA dans des conditions de culture différentes.

Les rapports 1 et 3 expriment les effets du passage d'une température de 30°C à 25°C sur les dénombrements, ce qui correspond en moyenne à un facteur de 1,80.

La moyenne des rapports 2 et 4 constitue le facteur correspondant au passage de 25°C à 20°C : x 1,68.

On peut en déduire que le passage de 30°C à 20°C entraîne une augmentation des dénombrements d'un facteur 3. (1,80 x 1,68 = 3,02).

La moyenne des rapports 5, 6 et 7 donne le facteur exprimant l'incidence de l'addition de NaCl sur le nombre d'unités formant colonies : x 1,74.

Le rapport 8 exprime les effets cumulés de l'addition de NaCl et du passage de 30°C à 20°C sur le dénombrement des flores aérobies : x 5,16. Ce chiffre correspond effectivement à la combinaison des 2 paramètres ( $3,02 \times 1,74 = 5,25$ ).

Cette expérimentation permet de distinguer les incidences respectives d'une addition de sel et d'un abaissement de température. On constate ainsi que les cultures sur PCA à 30°C permettent seulement le développement de 20 % des bactéries se développant sur PCA salé à 20°C. Cette approche, uniquement quantitative, souligne de manière précise le problème de la signification de la flore aérobie mésophile du poisson marin. Elle fournit des éléments de réponse et devrait être prolongée par une étude qualitative de la microflore.

Lors de l'étude expérimentale de la réduction du TMAO par les bactéries, les espèces constituant selon (SHEWAN et al. (1960) la microflore d'altération dominante des poissons marins ont manifesté une tendance psychrotrophe. Ceci permet de comprendre les résultats de nos travaux relatifs aux flores aérobies totales, il est logique que la température d'incubation de 20°C permette d'obtenir des dénombrements supérieurs à celle de 30°C. En gardant la notion de flore totale, on peut envisager d'abandonner la flore aérobie mésophile au profit de la flore aérobie psychrotrophe.

La définition "méthodologique" de la flore aérobie mésophile est relativement restrictive : "microorganismes aptes à donner des colonies visibles après 72 heures d'incubation à 30°C sur gélose pour dénombrement". En effet ce milieu convient mal à certains microorganismes exigeants, notamment les halophiles. D'autres paramètres que la température interviennent donc. La composition du milieu est déterminante, nous avons notamment démontré l'incidence du chlorure de sodium sur le développement de la "microflore totale" des poissons marins.

Quelle peut être la signification d'une "microflore aérobie psychrotrophe totale à caractère halophile" dans le poisson marin ? La flore aérobie mésophile est une méthode d'appréciation de la qualité microbiologique générale des aliments, elle peut avoir une signification hygiénique, et dans certains cas, notamment lorsqu'elle est élevée, elle peut fournir des informations sur la progression du processus d'altération. Dans le poisson marin la microflore aérobie psychrotrophe dénombrée sur milieu salé devrait exprimer davantage la flore endogène d'altération que la flore exogène de contamination dont les caractères psychrotrophe et halophile sont plus improbables. Cette recherche d'une microflore totale impliquée dans l'altération devra être poursuivie.

La microflore réductrice de l'oxyde de triméthylamine constitue également un axe de recherche, car elle exprime plus fidèlement l'altération que la "flore mésophile totale". L'intérêt de cette microflore est démontré, la réduction du TMAO se situe au coeur du processus de dégradation du poisson. Ces travaux soulignent le rôle déterminant d'une microflore directement impliquée dans l'altération, mais la technique que nous avons mise au point n'entre pas dans les techniques classiques de microbiologie alimentaire, ceci justifierait le prolongement des recherches.

## CONCLUSION GENERALE

Mise à part la méthode organoleptique chiffrée, qui n'est d'ailleurs applicable qu'au poisson entier, les méthodes d'appréciation de la fraîcheur du poisson consistent à évaluer la charge bactérienne du muscle ou son niveau de dégradation.

Aucune détermination chimique ne constitue actuellement un critère de fraîcheur universel. Toutefois les amines volatiles fournissent dans de nombreux cas des informations fiables si les résultats des dosages sont exploités de manière rigoureuse. L'intérêt de l'ABVT est démontré dans de nombreuses espèces et la teneur en triméthylamine donne des indications sur la composition de l'ABVT, elle ajoute des données qualitatives à ce critère. Nous avons précisé les conditions dans lesquelles cette exploitation plus complète des amines volatiles permet de fonder une décision. Pour les amines biogènes, nous avons proposé une technique comprenant une dérivation pré-colonne et un dosage en HPLC. Nos travaux ont consisté essentiellement en une mise au point de cette technique qui permet d'extraire du poisson et de doser les amines suivantes en moins de 3 heures : putrescine, cadavérine, histamine, spermidine et spermine. Les 3 premières évoluent de manière significative au cours de l'altération, et le prolongement de ces travaux permettra de proposer pour les amines biogènes des spécifications complémentaires de celles que nous avons déterminées pour les amines volatiles.

Parmi les critères chimiques, la mesure des produits de dégradation de l'ATP dans le muscle du poisson exprimée par la valeur K ( $K = \text{Inosine} + \text{Hypoxanthine}/\text{IMP} + \text{Inosine} + \text{Hypoxanthine}$ ) constitue une approche différente pour déterminer la fraîcheur (MALLE et LE PEZENEC, 1992). Ce critère évolue dès les premiers jours de conservation, ce qui est un premier avantage, d'autre part il permet une évaluation fiable de la fraîcheur dans des espèces où nous avons constaté que les amines volatiles ne sont pas un critère performant.

L'étude expérimentale de la réduction du TMAO par diverses bactéries, qui a été réalisée avec un milieu de culture d'une composition aussi proche que possible de celle du tissu musculaire du poisson, a permis de constater que toutes les souches bactériennes testées possèdent l'équipement enzymatique nécessaire pour utiliser le TMAO comme accepteur biologique d'hydrogène, et de redéfinir sur la base de cette réaction les tendances psychrophile, psychrotrophe et mésophile des bactéries inoculées. La définition des mésophiles ne pose pas problème, et nos résultats nous ont conduits à retenir pour les psychrotrophes la définition de CATSARAS et GREBOT (1969) et pour les psychrophiles celle de MORITA (1975). Les travaux que nous avons effectués sur les " microflores totales " confirment largement le caractère psychrotrophe de la flore dominante du poisson marin. La flore réductrice du TMAO est bien corrélée avec l'altération, la réaction de réduction du TMAO en TMA se révèle être fondamentale dans le processus de dégradation du poisson.

L'application au poisson de 2 méthodes microbiologiques rapides à nécessité la mise au point préalable d'une technique permettant de retenir les bactéries du tissu musculaire sur une membrane filtrante. Les dénombrements des bactéries par la méthode DEFT sont bien corrélés avec les dénombrements des colonies en milieu gélosé, mais le seuil d'application de la méthode est supérieur à  $2.10^5$  bactéries /g. Nos travaux relatifs à l'évolution de l'ATP somatique dans le muscle ont permis d'envisager favorablement l'application de la bioluminescence au poisson. Les résultats obtenus en ATP métrie sont bien corrélés avec la microflore totale au delà de 50.000 bactéries /g. Ces techniques rapides sont donc opérationnelles sur le poisson et permettent de définir un niveau de qualité microbiologique. Une information plus précise pourra être obtenue en poursuivant les travaux sur la microflore d'altération dans le but de la déterminer avec des techniques rapides sélectives, notamment l'impédance-métrie.

Les méthodes de laboratoire, qu'elles soient chimiques ou microbiologiques, ne fournissent chacune que des informations limitées sur la fraîcheur du poisson. La conjonction de ces données permet désormais une approche globale fiable, et la contribution de l'appréciation organoleptique ne doit jamais être négligée lorsqu'elle est applicable.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABGRALL B., BOURGEOIS C.M. (1989)

Dénombrement de la flore totale de produits alimentaires par la technique DEFT.  
Sci. Aliments. 9: 713-724.

ADAMS R., LERKE P. and FARBER L. (1964)

Bacteriology of spoilage of fish muscle incidence of spoilers during spoilage.  
J. Appl. Microbiol. 12: 277-279.

ARNOLD S.H. and BROWN W.D. (1978)

Histamine toxicity from fish products.  
Adv. Food Res. 24 : 114-147.

AYRES P.A. (1975)

The quantitative bacteriology of some commercial bivalve shellfish entering the british markets.  
J. Hyg. Comb. 74: 431-440.

BABITT J.K. (1972)

Decomposition of TMA oxide and changes in protein extractibility during frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius productus*) muscle.  
J. Agric. Food Chem. 20: 1052-1054.

BARILE L.E., MILLA A.D., REILLY A. and VILLADSEN A. (1985a)

Spoilage patterns of mackerel (*Rastrelliger faughni matsui*)  
1. Delays in icing.  
Asean Food J. 1, 2: 70.

BARILE L.E., MILLA A.D., REILLY A. and VILLADSEN A. (1985b)

Spoilage patterns of mackerel (*Rastrelliger faughni matsui*)  
2. Mesophilic and psychrophilic spoilage.  
Asean Food J. 1, 3: 121-127.

BEATTY S.A. and GIBBONS N.E. (1937)

The measurement of spoilage in fish.  
J. Biol. Bd. Can. 3: 77-91.

BEHLING R; and TAYLOR S.L. (1982)

Bacterial histamine as a function of temperature and time of incubation.  
J. Food Sci. 47: 1311-1317.

BERGEY'S manual of determinative bacteriology (1984)

Ed. Williams et Wilkins. Baltimore.

BIGRET M, (1984)

Influence de la composition des aliments sur une technique d'appréciation rapide de leur qualité bactériologique : le dosage de l'ATP par bioluminescence.  
Thèse de doctorat de 3<sup>o</sup> cycle. Compiègne.

BILLON J, OLLIEUZ N. et TAO SH. (1979)

Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'azote basique volatil total pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche.

RTVA. 149 : 13-17.

BOTHA W.C., H.LÜCK et P.J. JOOSTE. (1986)

Determination of bacterial ATP in milk. The influence of adenosine triphosphate hydrolyzing enzymes from somatic cells and *Pseudomonas fluorescens*.

J. Food Prot. 49: 822-825.

BURT J.R. (1974)

Chromatography and fish.

Process Biochem. 9: 23-28.

BUTTIAUX R., BEERENS H. et TACQUET A. (1974)

Manuel de techniques bactériologiques 4<sup>e</sup> édition.

Flammarion, Médecine, Sciences Paris.

CAMASCHELLA P., CISLAGHI S. (1987)

La méthode à épifluorescence pour le dénombrement de bactéries lactiques spécifiques sur le yaourt.

Sci. Aliments.N°hors série.VII 7 : 149-156.

CANN D.C (1977)

Bacteriology of shellfish with reference to International Trade.

In Proceedings of the Conference on the Handling, Processing, and Marketing of Tropical Fish: 377-394.

London: Tropical Products Institute.

CANTONI C., CATTANEO P. and AUBERT S.D. (1976)

Bacteriology and evaluation of freshness of freshwater fish.

Industria Alimentari. 15: 105-111.

CARALP P. (1987)

Contribution à l'étude des méthodes rapides de contrôles bactériologiques dans l'industrie.

Thèse de Doctorat en Pharmacie. Lille.

CARLIER V, G. RINGUENET, F.BOLNOT et J.ROZIER. (1983)

ATP : Etude de trois espèces bactériennes en fonction de la température, du pH et du milieu.

RTVA. 192 : 27-34.

CASTELL C.H. and ANDERSON G.W. (1948)

Bacteria associated with spoilage of cod fillets.

J. Fish. Res. Board Can. 7: 370-377.

CASTELL C.H., RICHARDS J.F. and WILHOT I. (1949)

*Pseudomonas putrefaciens* from cod fillets.

J. Fish. Res. Board Can. 7: 430-431.

CASTELL C.H and GREENOUGH M.F. (1958)

The action of *Pseudomonas* on fish muscle. 4. Relation between substrate composition and the development of odors by *Pseudomonas fragi*.

J. Fish. Res. Board Can. 16: 21-31.

CASTELL C.H., NEAL W.E. and SMITH B. (1971)

Production of dimethylamine in muscle of several species of gadoid fish during frozen storage, especially in relation to presence of dark muscle.

J. Fish. Res. Bd. Can. 28: 1-5.

CASTELL C.H., NEAL W.E. and DALE J. (1973)

Comparison of changes in trimethylamine, dimethylamine and extractable protein in iced and frozen gadoid filets.

J. Fish. Res. Board Can. 30, 8: 1246-1248.

CATSARAS M., GREBOT D. (1969)

Etude complémentaire sur les bactéries psychrotrophes des viandes.

Ann. Inst. Pasteur Lille 20: 231-238.

CHAI T., CHEN C., ROSEN A. and LEVIN R.E. (1968)

Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. II. Relative incidence of *Pseudomonas putrefaciens*.

Applied Microbiology 16 11: 1738-1741.

CHEFTEL J.C. et CHEFTEL H. (1984)

Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments.

Ed.Tech. et Doc., Lavoisier. PARIS. Vol 1 et 2.

CONWAY E.J. (1962)

Determination of volatile amines.

In E.J. Conway Microdiffusion analysis and volumetric error. 5th ed. Crosby Lockwood, London 195-200.

CUTTING C.L. (1953)

Changes in the pH and buffering capacity of fish during spoilage.

J. Sci. Food Agric. 4: 597-603.

DEBEVERE J.M. and VOETS J.P. (1974)

A rapid selective medium for the determination of trimethylamineoxide-reducing bacteria.

Zeitschrift für Allg.Mikrobiologie 14: 655-658.

DELATTRE J.M. (1986)

Le contrôle bactérien rapide des eaux par épifluorescence.

Journal Français d'Hydrologie. 17: 59-70.

DIEUZEIDE R. et NOVELLA M. (1951)

Essai sur la technique de fumage du poisson

Bull. Stat. Exper. Aquicul. Pêche Castiglione (Alger) n° 169.

DISNEY J.G. (1976)

The spoilage of fish in the tropics. In "Proceedings of the first Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technology Conference."

Ed. Cobb B.F. and Stockton A.B. 1: 23.

Texas A&M Univ. Sea Grant , College Station, Tex.

DYER W.J. and MOUNSEY Y.A. (1945)

Amines in fish muscle IV. Développement of trimethylamine and other amines.

J. Fish. Res. Bd. Can. 6: 359

EHIRA S. and UCHIYAMA H.(1969)

Rapid estimation of freshness of fish by nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 35: 1080-1085.

FERNANDEZ SALGUERO J. and MACKIE I.M. (1979)

Histidine metabolism in mackerel. Studies on histidine decarboxylase activity and histamine formation during storage of flesh and liver under sterile and non sterile conditions.

J. Food Technol. 14: 131-139.

FLETCHER T.C. (1968)

Carbohydrate-polypeptide polymers of epithelial secretions and connective tissue of fish.

Ph. D. Thesis, University of Aberdeen.

FORSTER J. (1887)

Ueber einige Eigenschaften leuchtender Bakteriolen.

Parasitenk. 2: 337-340.

GEORGALA D.L. (1957)

Changes in the skin Flora of cod after washing and icing.

J. Appl. Bact. 20: 23-29.

GILLESPIE N.C. and MACRAE I.C. (1975)

The bacteriol flora of some queensland fish and its ability to cause spoilage.

J. Appl. Bact. 39: 91-100.

GORCZYKA E., SUMNER J.L., COHEN D. and BRADY P. (1985)

Mesophilic fish spoilage.

Food technol. Austr. 37: 24-27.

GOUYGOU J.P., MARTIN C., SINQUIN C. and DURAND P. (1989)

Determination of biogenic amines in fish.

Oceanis. 15, 4: 599-604.

GOUNOT A.M. (1991)

Bacterial life at low temperature : physiological aspects and biotechnological implications.

J. Appl. Bact. 71: 386-397.

GRAND B. (1983)

Evaluation de la contamination microbienne superficielle des viandes par ATPmétrie. Utilisation d'un photomultiplicateur.

Thèse de Doctorat Vétérinaire. Faculté de Médecine de Créteil.

GRANROTH B., KIESVAARA M. and PIETKAENIEMI M. (1978)

Exopeptidases in Baltic herring.

Finn. Chem. Lett. 108-111.

HARADA K. (1975)

Studies of enzyme catalysing formation of formaldehyde and dimethylamine in fishes and shells.

J. Shimonoseki Univ. Fish. 23: 165-241.

HERBERT P.A., HENDRIE M.S., GILISAN D.M. and SHEWAN J.M (1971)

Bacteria active in the spoilage of certain sea foods.

J. Appl. Bact. 31: 41-50.

HERBORG L. and VILLADSEN A. (1975)

Bacterial infection/invasion in fish fresh.

J. Food Technol. 10: 507-513.

HOBBS G. (1982)

Changes in fish after catching.

Fish-Handling and Processing: 20-27

Ed. Arkten A., Mackie I.M., Meritt J.H., Windsor M.L.

HOBBS G. and HODGKISS W. (1982)

The bacteriology of fish handling and processing.

Dev. in Food microbiology. 1: 71-117.

Ed. Davies R., Applied Science Publishers.

HORIE S., OKUZUMI M., KIMURA M., AKAHORI M. and KAWAMAE M. (1972)

Studies on psychrophilic spoilage bacteria of chilled sea fish (II), bacteria flora in the spoilage of raw fish.

Journal of the food hygienic society of Japan. 13, 5: 410-421.

HORSLEY R.W. (1977)

A review of the bacteriol flora of teleosts and elasmobranchs including methods for its analysis.

J. Fish Biol. 10: 529-553.

HUGHES R.B. (1959)

Chemical studies on the herring (*Clupea harengus*).

1. Trimethylamine oxide and volatile amines in fresh, spoiling and cooked herring flesh.

J. Sci. Food Agric., London. 10: 431-434.

HUI J. Y. and TAYLOR S.T. (1983)

High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods,

J. Assoc. Off Anal. Chem. 66 : (4) , 853-857.

HUSS H.H. and ESKILDSEN V. (1974)

Botulism in farmed trout caused by *Clostridium botulinum* type E.  
Nord. Vet. Med. 26: 733-738.

IDLER D. and BITNERS I. (1959)

Biochemical studies on Sockeye Salmon during spawning migration.  
J. Fish. Res. Bd Can. 16: 235-241.

IKEDA S.(1980)

Other organic components and inorganic components.  
Extrait de "Advances in fish science and technology" CONNELL J.J.  
Ed. Fishing News Books Ltd Farnham, England : 111-123.

ITO Y., SANCHES L. and SILVA D.R. (1969)

Seasonal variation of the chemical composition of sardine.  
Contrib. Inst. Oceanogr. Univ. S. Paulo, Ser. Technologia,  
Sao Paulo. 6: 1-8.

JOUVE J.L., V. CARLIER et J. ROZIER. (1981)

Détermination rapide de la contamination superficielle des viandes par bioluminescence.  
RTVA. 172: 14-17.

JOUVE J.L., DROMIGNY E. et VINCENT P. (1991)

Physiologie des organes animaux.  
In : La conserve appertisée. 1 : 45-61  
Sciences et Techniques Agro Alimentaires. Lavoisier . Apria . Paris

KARMAS E. and MIETZ J.L. (1978 )

Polyamine and histamine content of tuna fish and the relationship to decomposition.  
Lebensm. Wiss. u. Tech. 11: 333-337.

KARMAS E. (1981)

Biogenic amines as indicator of seafood freshness.  
Lebensm. Wiss. u. Tech. 11: 333-337.

KAWABATA T. (1953)

Studies on the trimethylamine oxide-reductase. 1. Reduction of trimethylamine oxide in the dark muscle of pelagic migrating fish under aseptic conditions.  
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 19, 4: 505-512.

KLAUSEN N.K. and LUND E. (1986).

Formation of biogenic amines in herring and mackerel.  
Z.Lebensm. Unters. Forsch. 182: 459-463.

KRUEGER, K.E, (1972).

Psychrotrophic micro-organisms in fish.  
Arch. Lebensmittelhyg. 23: 275-277.

LAHELLEC C., COLIN P. (1980)

La flore psychrotrophe.

In: Techniques d'analyses et de contrôle dans les Industries Agro Alimentaires. 3: 98-104.  
Technique et Communication. Apria. Paris.

LANNELONGUE M., FINNE G., HANNA M.O, NICKELSON R. and VANDERZANT C.

(1982)

Microbial and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias glodus*) steaks in retail packages containing CO<sub>2</sub> enriched atmospheres.

J. Food Prot. 45, 13: 1197-1203.

LAYCOCK, R. A., and L. W. REGIER. (1971)

Trimethylamine-producing bacteria on haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) fillets during refrigerated storage.

J. Fish. Res. Bd Canada. 28: 305-309.

LECLERC H., BUTTIAUX R., GUILLAUME J. et WATTRE P. (1977)

Microbiologie appliquée.

Doin éditeurs.

LECLERC H. et MOSSEL D.A.A. (1989)

Microbiologie. Le tube digestif, l'eau et les aliments.

Doin éditeurs.

LEE J.V., GIBSON D.M. and SHEWAN J.M (1973)

The toxonomy of the marine Pseudomonads.

Presented to the Pseudomonas Sub-Committee of the International Committee on Systematic Bacteriology at the first International

Conference of Bacteriology, Sept., in Jerusalem.

LERKE P., ADAMS R. and FARBER L. (1965)

Bacteriology of spoilage of fish muscle III, characterization of spoilers.

J. Appl. Microbiol. 13: 625-630.

LEVIN L.R. (1968)

Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria of fish.

Appl. Microbiol. 16: 1734-1737.

LEVIN L.R. (1972)

Correlation of DNA base composition and metabolism of *Pseudomonas putrefaciens* isolates from food, human clinical specimens and other sources.

Antonie Van Leeuwenhoek, 38: 121-127

LIMA DOS SANTOS C.A.M (1981)

The storage of tropical fish in ice - a review.

Trop. Sci. 23: 97-127.

LISTON J. (1980)

Fish and shellfish and their products.  
In *Microbial ecology of foods*, 2: 567-605.  
Col. Silliker J.H et al. New York, Academic Press.

LITTEL K.J., PIKELIS S. et SPURGASH A. (1986)

Bioluminescent ATP assay for rapid estimation of microbial numbers in fresh meat.  
*J. Food Prot.* 49 : 18-22.

LUNDSTROM R. C. and L. D. Racicot (1983)

Gas chromatographic determination of dimethylamine and trimethylamine in seafoods.  
*J.assoc. of anal. Chem.* 66: 1158-1162.

MACKIE J.M. et THOMSON B.W. (1974)

Decomposition of trimethylamine oxide during iced and frozen storage of whole and comminuted tissue of fish.  
*Proc. Int. Congr. Food Sci. Technol.* 4, 1: 243-250.

MALLE P. (1980)

Le fumage à froid du saumon : aspects microbiologiques  
Thèse de Doctorat d'Université , Lille.

MALLE P., EB P. et TAILLIEZ R. (1981a)

Etude expérimentale de l'action antiseptique de la fumée sur *Escherichia coli*.  
*Revue des Ind. Alim. Agric.* 98, 3 : 175-180.

MALLE P., EB P. et TAILLIEZ R. (1981b)

Le fumage du saumon: influence de la qualité de la matière première sur l'action antiseptique de la fumée.  
*RTVA.* 172 : 25-31.

MALLE P., NOWOGROCKI G., TAILLIEZ R. (1983)

Corrélation entre l'indice d'altération et l'azote basique volatil total pour divers poissons marins.  
*Sciences des aliments.* 3: 311-322.

MALLE P., EB P. and TAILLIEZ R. (1986)

Détermination of the quality of fish by measuring trimethylamine oxide reduction.  
*Int. J. Food Microbiol.* 3 : 225-235.

MALLE P. et TAO S.H. (1987)

Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation.  
*J. Food Prot.* 50 : 756-760.

MALLE P., VANELLE A.M., PETIT A. (1989 a)

Teneur en azote basique volatil total du tissu musculaire des poissons marins.  
*Rec. Méd. Vét.* 165: 395-402.

- MALLE P. et POUMEYROL M. (1989 b)  
A new chemical criterion for the quality control of fish :Trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%).  
J. Food Prot. 52: 419-423.
- MALLE P. et LE PEZENNEC I. (1992)  
Rapid determination of fish freshness by evaluation of ATP degradation reflected in K value.  
Sci. Aliments. 12 : 257-269.
- MARTINEK R.G., BERGER L., BROIDA D. (1964)  
Simplified estimation of aminopeptidase (L.A.P.) activity.  
Clin. Chem. 10 : 1087-1097.
- MENDES, M.H.M., and F.M. LAJOLO. (1975)  
Evolucao das bases volateis totais e da trimetilamina em pescados e o seu uso como indicador de qualidade.  
Rev. Farm. bioquim. Univ. 13: 303-322.
- MIETZ J.L. and KARMAS E. (1977)  
Chemical quality index of canned tuna as determined by high pressure liquid chromatography.  
J. Food Sci. 42: 155-158.
- MIETZ J.L. and KARMAS E. (1978 )  
Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition.  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 1: 139-145.
- MILLER A. (1973)  
Identification des composés volatils produits dans le muscle de poisson stérile-*Sebastes melanops* -  
par *Pseudomonas fragi*.  
Appl. Microbiol. 25 : 952-955 et 26 : 18-21.
- MORITA R.Y. (1975)  
Psychrophilic bacteria.  
Bacteriological reviews 39, 2: 144-169.
- MURRAY C.K. and FLETCHER T.C (1976)  
The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L) tissues.  
Journal of Fish Biology, 9: 329-334.
- MURRAY C.K., HOBBS G. and GILBERT R.G. (1982)  
Scombrototoxin and scombrototoxin-like poisoning from canned fish.  
Journal of Hygiene. 82:215-220.
- MURRAY J. and BURT J.R. (1969)  
The composition of fish.  
Torry Advis. Note, Aberdeen. 38.

NAFTALIN L., SEXTON M., WHITAKER J.F., TRACEY D. (1969)  
A routine procedure for estimating serum glutamyl transpeptidase activity.  
Clin. Chem. 26 : 293-296

OKUZUMI M., HORIE S., KIMURA M., AKAHORI M. and KAWAMAE M. (1972)  
Studies on psychrophilic spoilage bacteria of chilled sea fish (III), Differentiating properties of the five groups, *Pseudomonas* I/II, III/IV,-NH, III/IV-H, *Vibrio* and *Moraxella*.  
Journal of the food hygienic society of Japan. 14, 1: 81-89.

OKUZUMI M., SHIMIZU M. and MATSUMOTO A. (1981)  
Spoilage and bacterial flora of thawed fishes, partially frozen at -3°C, during chill storage.  
Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries. 47, 2: 239-242.

PETTIPHER G.L., MANSELL R., MCKINNON C.H., COUSINS C.M. (1980)  
Rapid membrane filtration. Epifluorescent Microscopy Technique for direct enumeration of bacteria in raw milk  
Appl. Environ. Microbiol. 39: 423-429.

PETTIPHER G.L., RODRIGUES U.M. (1982)  
Rapid enumeration of microorganisms in foods by the direct epifluorescent filter technique.  
Appl. Environ. Microbiol. 44: 809-813.

PETTIPHER G.L., (1986)  
Review : the direct epifluorescent filter technique.  
J. Food Technol. 21: 535-546.

POULTER R.G., CURRAN C.A. and DISNEY J.G. (1981)  
Chill storage of tropical and temperate water fish - Differences and similarities. Advances in the refrigerated treatment of fish, especially underutilized species.  
Bull. Intl. Inst. Refrig. 49: 111.

POUMEYROL M., GUITTONNEAU V. (1987)  
Estimation de la flore bactérienne de viandes hachées par ATP métrie.  
Sci. Aliments. 7: n° hors série VII, 23-31.

PROCTOR B.E. and NICKERSON J.T.R. (1935)  
An investigation of the sterility of fish tissues.  
J. Bact. 30: 377.

QUESNEAU R. (1983)  
La luminescence.  
La technique laitière. 974: 49-59.

QVIST S.H., JAKOBSEN M., (1985)  
Applications of the direct epifluorescent filter technique as a rapid method in microbiological quality assurance in the meat industry  
Int. J. Food Microbiol. 2: 139-144.

RAGUENES N. (1988)

Les amines biogènes.

Microbiologie Alimentaire, 1: 134-147.

Ed. Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J., Tech. et Doc. Lavoisier.

READ L.J. (1968)

Urea and trimethylamine oxide levels in elasmobranch embryos.

Biol. Bull., 135: 537-547.

REAY G.A (1949)

The spoilage of fresh fish and its control.

Chem. and Ind. Rev. : 35.

REICHARDT W. and MORITA R.Y. (1982)

Temperature characteristics of psychrotrophic and psychrophilic bacteria.

J. General Microbiol. 128: 565-568.

RITCHIE A.H. and MACKIE I.M. (1980).

The formation of diamines and polyamines during storage of mackerel (*Scomber scombrus*).

Extrait de "Advances in fish science and technology". CONNELL J.J.

Ed. Fishing News Books Ltd Farnham, England : 489-494.

RODRIGUES U.M., PETTIPHER G.L. (1984)

Use of the direct epifluorescent filter technique for predicting the keeping quality of pasteurized milk within 24 hours.

J. Appl. Bact. 57: 125-130.

ROSSERO A., M.D. DE BRITO, J.L. JOUVE (1987)

Appréciation rapide de la qualité microbiologique des viandes hachées par bioluminescence ATP.

Sci. Aliments, n° hors série VII. 7 : 49-65

SAINCLIVIER M. ( 1983)

L'industrie alimentaire halieutique.

Volume 1: Le poisson matière première.

Bull. Soc. Techn. Ens. Agro. Rennes.

SAINCLIVIER M. (1985)

L'industrie alimentaire halieutique.

Volume 2: Des techniques ancestrales à leurs réalisations contemporaines.

Bull. Soc. Techn. Ens. Agro. Rennes.

SAITO T., ARAI K. and MATSUYOSHI M. (1959)

A new method for estimating the freshness of fish.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 24: 749-750.

SHARPE A., WOODROW M., JACKSON A. (1970)

Adenosine triphosphate levels in foods contaminated by bacteria.

J. Appl. Bact. 33: 758-767.

SHEWAN J.M. (1937)

The spoilage of haddock stored in ice.  
Rep. Food Inv.Bd.Gr.Brit. 4: 75-78.

SHEWAN J.M. (1949)

Some bacteriological aspects of handling processing and distribution of fish.  
J. R. Sanit. Inst. 69: 394.

SHEWAN J.M. (1961)

The microbiology of seawater fish.  
In Borgstrom G. Ed., Fish as Food, 1, Academic Press, Inc., New York.

SHEWAN J.M. (1962)

The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes.  
In : Recent advances in food science. 1: 167-193. Ed. Hawthorn J. and Huilleitch J., Londres, Butterworths.

SHEWAN J.M. (1971)

The microbiology of fish and fishery products - a progress report.  
J. Appl. Bact. 34, 2 : 299-315.

SHEWAN J.M. (1977)

The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action.  
In : Handling, processing and marketing of tropical fish: 51-66.  
Londres: Tropical Products Inst.

SHEWAN J.M., HOBBS G. and HODGKISS W. (1960)

The Pseudomonas and Achromobacter groups of bacteria in the spoilage of marine white fish.  
J. Appl. Bact. 23: 463-468.

SHEWAN, J.M., D.M. GIBSON, and C.K. MURRAY. (1971)

Estimation of trimethylamine in fish muscle.  
Fish Insp. Qual. contr. 71: 183-186.

SIERACKI M.E., JOHNSON P.W., SIEBURTH J.Mc.N.(1985)

Detection, enumeration and sizing of planktonic bacteria by Image-Analyzed Epifluorescence Microscopy.  
Appl. Environ. Microbiol. 49: 799-810.

SIKORSKI Z.E. (1980)

Structure and proteins of fish and shellfish. Part. 2.  
Advances in fish science and technology. Connell J.J., 78-85.  
Ed. Fishing News Books Ltd. Farnham, England.

SILVERIO R. and LEVIN R.E. (1967)

Evaluation of methods for determining the bacterial population of fresh fillets.  
J. Milk Food Technol. 30: 242-246.

SKOVGAARD N. (1979)

Bacterial association of and metabolic activity in fish in north western Europe.  
Archiv. fur Lebensmittelhygiene. 30: 106-109.

SOUDAN F., DAKNOF A., BAZIN J., CHAPEL G., DASPET G., SEYNAVE R. (1957)

Appréciation de l'altération du poisson frais par un examen organoleptique systématique.  
Annales de la nutrition et de l'alimentation. 11: 1-24.

SOUDAN F., ANQUEZ H. et BENEZIT A. (1965)

Conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques.  
Baillière et fils, Paris.

SPENCER R. (1961)

The bacteriology of distant water cod landed at hull.  
J. Appl. Microbiol. 24: 4.

STANIER R.Y., PALERONI N.J. and DOUDOROFF M. (1966)

The aerobic Pseudomonas: a taxonomic study.  
J. Gen. Microbiol. 43 : 159-217.

STANSBY M.E. and HALL A.S. (1967)

Chemical composition of commercially important fish of the USA.  
Fish. Ind. Res. 3, 4: 29-34.

STEVE L. and TAYLOR P.D. (1984)

Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods.  
Rapport OMS, Ref. VPH/FOS/85/1.1. 31.

SUMNER J.L., GORCZYKA E., COHEN D. and BRADY P. (1984)

Do fish from tropical waters spoil less rapidly in ice than fish from temperate waters?  
Food Technol. Australia. 36: 328.

TABOR H. and TABOR C. W. (1973)

Quantitative determination of aliphatic diamines and polyamines by automated liquid chromatography procedure.  
Anal. Biochem. 55 : 457-467.

TARR H.L.A. (1939)

The bacterial reduction of trimethylamine oxide to trimethylamine.  
J. Fish Res. Bd. Can. 4: 367-377.

TARR H.L.A. (1966)

Post-mortem changes in glycogen, nucleotides, sugar phosphates, and sugars in fish muscle.  
J. Food Sci. 31: 846-854.

TILGNER D.J. (1967)

Effets du fumage et substances actives dans la fumée.  
Die Fleishwirtschaft. 47, 4.

TREMOLIERES J. (1980)

Manuel d'alimentation humaine. II. Les aliments.  
8<sup>ème</sup> Ed. E S F Paris. 124-135.

TROLLER J.A. et CHRISTIAN J.H.B. (1978)

Water activity and food.  
Ed. Academic Press, New York.

VAN DEN BROEK M.J.M., MOSSEL D.A.A. and MOL H. (1984)

Microbiological quality of retail fresh fish fillets in the Netherlands.  
Int. J. Food Microbiol. 1: 53-61.

VAN SPREEKENS K.J.A. (1977)

Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria.  
Antonie van Leeuwenhoek. 43: 283-303.

WARD D.R, LA ROCCO K.A et HOPSON D.J., (1986)

Adenosine triphosphate bioluminescent assay to enumerate bacterial numbers on fresh fish.  
J. Food Prot. 49 : 647-650.

WARD D.R. and BAJ N.J. (1988)

Factors affecting microbiological quality of seafoods.  
J. Food Technol. 42, 3: 85-89.

WATANABE, K. (1965)

Sardina congelada : alteracoes durante armazenamento a-18°C  
contrib. Inst. Oceanogr. Univ. S. Paul, Ser.Technologia,  
Sao Paulo. 3: 1-12.

WATSON D.W. (1939)

Studies of fish spoilage. IV - The bacterial reduction of trimethylamine oxide.  
J. Fish. Res. Bd. 4 : 252-266

WYATT L.E. (1978)

Microbiological profiles of fresh water catfish.  
Dissertation Abstracts International. B 38: 5206.

YAMADA K. (1967)

Occurrence and origin of trimethylamine oxide in fishes and marine invertebrates.  
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 33: 591-603.

ZAITSEV V.I., KIZEVETTER L., LAGUNOV T., MAKAROVA L. and  
PODSEVALOV V. (1969)  
Fish curing and processing.  
MIR publishers, Moscow.

ZAMBONI C.Q. (1962)  
Verificacao da deterioracao da sardinha (*Sardinella aurita*) por microdifusao (metodo de Conway).  
Rev. Inst. Adolfo Lutz Sao Paulo. 22: 73-76.



## RESUME

La grande altérabilité du poisson est liée à la fois à ses caractéristiques biochimiques et aux particularités de sa microflore bactérienne. Ont été décrits successivement dans une étude bibliographique les facteurs microbiologiques et biochimiques de l'altération, les mécanismes de l'altération et ses conséquences.

Dans le tissu musculaire du poisson, la réduction de l'oxyde de triméthylamine (TMAO) en triméthylamine (TMA) par les bactéries constitue une réaction essentielle du processus d'altération, ce qui a justifié l'étude de la production de TMA par diverses souches bactériennes. Ces travaux ont permis de déterminer expérimentalement les tendances psychrophile, psychrotrophe et mésophile des bactéries inoculées.

L'évaluation expérimentale de l'altération consiste à déterminer ou la charge bactérienne du tissu musculaire ou son niveau de dégradation. Le critère chimique le plus anciennement et le plus largement utilisé pour le poisson est l'azote basique volatil total (ABVT). Nous avons tenté d'optimiser son utilisation et de définir les limites de son application. Le critère P, qui exprime le pourcentage que représente la TMA dans l'ABVT, a été proposé comme critère complémentaire.

Parmi les substances de dégradation, les amines biogènes constituent désormais l'axe majeur de recherche pour évaluer plus précisément le niveau de dégradation du tissu musculaire par des déterminations chimiques, mais leur extraction demeure un problème difficile. Les méthodes existantes ne permettant pas une application en "routine", nous avons élaboré une nouvelle méthode comprenant une extraction trichloracétique des amines, la formation de dérivés dansylés et leur dosage en HPLC.

Pour évaluer le niveau d'altération bactérienne ont été mis au point des tests qui consistent à utiliser l'activité des microorganismes. Les tests fondés sur des activités peptidasiques ont mis en évidence des phénomènes de compétition entre substrats et n'ont donc pas été retenus comme critères. Par contre le test fondé sur l'estimation de l'activité d'enzymes microbiennes responsables de la réduction du TMAO s'est révélé un critère fiable d'appréciation de l'altération.

L'application au poisson de méthodes nouvelles, dites rapides, de dénombrement des bactéries a nécessité la mise au point préalable d'une technique pour les séparer de leur substrat et les concentrer. Des dénombrements classiques sur milieu gélosé ont été corrélés avec des comptages obtenus par la méthode DEFT (Direct Epifluorescence Filter Technique) et avec des mesures de bioluminescence consistant à évaluer l'ATP bactérien.

Une comparaison de tests d'évaluation qualitative du poisson a permis d'étudier leur intérêt respectif et de déterminer précisément l'incidence de la concentration en NaCl du milieu de culture et celle de la température d'incubation sur le dénombrement des microflores du poisson.

Mots clés : *altération, amines, bactéries psychrotrophes, méthodes rapides, oxyde de triméthylamine, poisson marin.*

