

N° d'ordre : 1831

THESE DE DOCTORAT

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPECIALITE : MICROBIOLOGIE et BIOCHIMIE

par

Michel VALLÉ

Mise au point de techniques microbiologiques et biochimiques
d'évaluation de l'altération de la chair de poissons marins et
essais de modélisation.

Soutenu le 22 Octobre 1996 devant la commission d'examen :

Mr	R. TAILLIEZ	Professeur à l'U.S.T. Lille	Président
Mr	R. TOMASSONE	Professeur à l'I.N.A. Paris- Grignon	Rapporteur
Mr	J.J. RODRIGUEZ JEREZ	Professeur à l'U.A. Barcelone	
	Rapporteur		
Mr	S. BOUQUELET	Professeur à l'U.S.T. Lille	Examineur
Mlle	C. LAHELLEC	Directrice de recherches au C.N.E.V.A.	Examineur
Mr	P. MALLE	Directeur du C.N.E.V.A. Boulogne sur Mer	Examineur

Ce travail a été réalisé au Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires sous la direction de Monsieur Pierre MALLE, Directeur du C.N.E.V.A. Boulogne sur mer que je tiens particulièrement à remercier pour ses conseils scientifiques, sa disponibilité et les moyens qu'il a mis à ma disposition.

J'exprime mes plus vifs remerciements au Conseil Régional du Nord Pas de Calais et au C.N.E.V.A. qui ont cofinancé cette thèse.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur R. TAILLIEZ Directeur du Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille d'avoir accepté de présider cette thèse et d'avoir dirigé les recherches au même titre que Monsieur le Professeur S. BOUQUELET du Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Mixte de Recherche n°111 du Centre National de la Recherche Scientifique) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur le Professeur R. TOMASSONE de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon (Laboratoire de Biométrie Mathématique et Informatique) qui m'a apporté de précieux conseils pour les études statistiques et a accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier Mademoiselle la Directrice de Recherches C. LAHELLEC Chef de département d'Hygiène Qualité et Sécurité des Aliments du Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires et Monsieur le Professeur J.J. RODRIGUEZ JEREZ du Département de Pathologie et de Productions Animales de l'Université Autonome de Barcelone de l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail malgré leurs nombreuses occupations.

Mes remerciements vont également à Madame C. SAUVET Directrice de la Recherche et de la technologie au Conseil Regional, Monsieur J. LAPORTE Directeur Scientifique et Technique du C.N.E.V.A., Monsieur P. EB Directeur des Etudes de L'institut Agricole et Alimentaire de Lille pour leurs conseils scientifiques tout au long de ces trois années de thèse.

Enfin, au personnel du CNEVA Boulogne sur Mer et à tous les stagiaires qui ont apporté directement ou indirectement leur contribution, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Ces travaux ont permis de réaliser 5 publications :

Assay of biogenic amines involved in fish decomposition, 1996. A.O.A.C. Int. 79, 1 : 43-49
P. Malle, M. Vallé, and S. Bouquelet

Liquid chromatographic determination of fish decomposition indexes from analyses of plaice, whiting, and herring. 1996. A.O.A.C. Int. 79, 5 : 1134-1140.
M. Vallé, P. Malle, and S Bouquelet.

Optimization of a liquid chromatographic method for determination of amines in fish, 1997.
A.O.A.C. Int. Sous presse
M. Vallé, P. Malle, and S Bouquelet.

Method of evaluation of bacterial reduction of trimethylamine N-oxide, 1997. J. Food Protect.
Accepté
Michel Vallé, Pierre Malle, Pascaline Demarque, Philippe Eb, Roger Tailliez.

Detection and enumeration of H₂S⁺ bacteria. - Application to Shewanella putrefaciens, 1997.
J. Food Protect. Avis très favorable d'un critique (Dr Fung).
Michel Vallé, Pierre Malle, Pascaline Demarque, Philippe Eb, Roger Tailliez.

D'autres publications sont en cours de rédaction.

Sommaire

INTRODUCTION	Page 8
--------------------	-----------

Chapitre I	9
------------------	---

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Microbiologie et Biochimie du poisson et processus d'altération

A. Caractéristiques microbiologiques	9
--	---

<u>I. Introduction</u>	9
------------------------------	---

<u>II. Origine de la flore bactérienne</u>	9
--	---

<u>III. Localisation de la flore bactérienne</u>	11
--	----

<u>IV. Flores particulières</u>	13
---------------------------------------	----

1. Les bactéries halophiles et halotolérantes	13
---	----

2. Les <i>Pseudomonas</i> et genres proches	13
---	----

3. La variabilité des microflores	14
---	----

B. Caractéristiques biochimiques	14
--	----

<u>I. Introduction</u>	14
------------------------------	----

<u>II. Composition chimique du poisson</u>	15
--	----

1. Les substances azotées	15
---------------------------------	----

1.1. Les matières azotées protéiques	16
--	----

1.2. Les matières azotées non protéiques	17
--	----

a) Les acides aminés et dipeptides libres	18
---	----

b) Les triméthylamines	19
------------------------------	----

c) L'urée	20
-----------------	----

d) L'ammoniac	21
---------------------	----

e) Les dérivés nucléotidiques	21
-------------------------------------	----

2. Les lipides	21
----------------------	----

3. Les glucides	23
-----------------------	----

4. Les vitamines	24
------------------------	----

5. Le formol	24
--------------------	----

6. Les minéraux	25
-----------------------	----

<u>III. Les indicateurs de pollution</u>	25
<u>IV. Facteurs de la variabilité de la composition biochimique</u>	25
C. Introduction à l'altération du poisson	26
D. Evolution de la flore	27
<u>I. La flore de contamination</u>	27
<u>II. La flore d'altération</u>	29
1. Introduction	29
2. Les bactéries dégradant les substances azotées	30
2.1. Les protéines et acides aminés libres	30
2.2. Les triméthylamines	31
2.3. Les dérivés nucléotidiques	32
3. Les bactéries dégradant les lipides	32
E. Les enzymes tissulaires	33
<u>I. Les enzymes dégradant les substances azotées</u>	33
<u>II. Les enzymes dégradant les lipides</u>	34
<u>III. Les enzymes dégradant les glucides</u>	34
F. Les enzymes digestives	35
G. Oxydation des acides gras	35
H. Facteurs influençant l'altération	35
<u>I. Les facteurs naturels</u>	35
<u>II. Les manipulations</u>	36
1. La pêche	36
2. Le traitement après la pêche	36
3. L'eau utilisée	37
<u>III. Les conditions de conservation</u>	37
1. Le traitement par le froid	37
2. La chaleur	38
3. Les agents chimiques de conservation	39
4. Les atmosphères modifiées	41
5. Autres méthodes de conservation	42
<u>IV. L'activité de l'eau (Aw)</u>	42
I. Evolutions biochimiques	43
<u>I. Le pH</u>	43
<u>II. Le potentiel d'oxydoréduction</u>	43
<u>III. Les substances azotées</u>	43

1. Les protéines et acides aminés libres	43
2. Les triméthylamines	45
3. Les dérivés nucléotidiques	47
<u>IV. Les lipides</u>	48
<u>V. Les glucides</u>	48
<u>VI. Caractéristiques organoleptiques</u>	49

Chapitre II

Matériels et méthodes

A. Échantillonnage du poisson	51
B. Microbiologie	52
<u>I. Prise d'essai et traitement des échantillons</u>	52
<u>II. Souches bactériennes</u>	52
<u>III. Recherche de la flore totale</u>	53
<u>IV. Recherche de la flore à Gram négatif</u>	53
<u>V. Recherche de la flore H₂S</u>	54
<u>VI. Recherche des besoins en NaCl des flores</u>	54
<u>VII. Etude comparative du mode de culture</u>	54
1. Nature de l'ensemencement	54
2. Températures de développement	55
<u>VIII. Recherche de la flore réductrice de l'OTMA</u>	56
1. Méthode qualitative	56
2. Méthode quantitative	56
<u>IX. Recherche de flores capables de produire des amines biogènes</u>	57
<u>X. Identification de souches</u>	58
C. Evaluation organoleptique	58
D. Biochimie	59
<u>I. Dosage des amines volatiles</u>	59
1. Méthode d'entraînement à la vapeur	59
2. Méthode de microdiffusion	59
<u>II. Dosage des amines biogènes</u>	60
1. Solutions	60
2. Méthode	61
3. Matériel	62
4. Gradient	62
5. Calcul du taux de perte	62

<u>III. Dosage de dérivés nucléotidiques</u>	63
1. Méthode.....	63
2. Gradient.....	63
3. Dosage par le Fresh-Tester (Transia).....	63
<u>IV. Dosage du formol</u>	64
1. Méthode.....	65
2. Étalonnage.....	65
<u>V. Dosage de groupements aminés libres</u>	65
1. Solutions.....	65
2. Méthode.....	66
<u>VI. Voie de dégradation de l'OTMA</u>	66
1. Souches bactériennes.....	67
2. Milieu de culture	67
3. Solutions.....	67
4. Méthodes	68
E. Statistiques	69

Chapitre III..... 73

Résultats et discussion

A. Etudes Microbiologiques	73
<u>I. Détermination du mode de culture</u>	73
1. Nature de l'ensemencement.....	73
2. Température d'incubation	75
3. Durée d'incubation.....	76
<u>II. Recherche d'un milieu pour le dénombrement de la flore totale</u>	76
1. A partir des milieux conventionnels.....	77
1.1. Analyse statistique.....	77
1.2. Seuil de dénombrement	82
2. A partir des milieux "H ₂ S"	85
3. Comparaison des conditions de culture de la flore totale	86
3.1. Analyse statistique.....	86
3.2. Seuil de dénombrement	88

a) Comparaison PCA-H ₂ S et TSA	88
b) Comparaison avec d'autres espèces et modes de conservation.....	89
III. Recherche d'un milieu pour le dénombrement de la flore à Gram négatif.....	92
1. Comportement de la flore à Gram négatif.....	92
2. Recherche d'un milieu de culture	93
2.1. Analyse statistique.....	93
2.2. Seuil de dénombrement.....	98
IV. Optimisation d'un milieu pour le dénombrement de la flore H₂S.....	100
1. Etude de la culture de <i>Shewanella putrefaciens</i>	100
2. Recherche de la flore H ₂ S à partir de la flore à Gram négatif	101
3. Recherche d'un milieu de culture	103
3.1. Analyse statistique.....	103
3.2. Seuil de dénombrement.....	108
4. Etude de la flore H ₂ S.....	110
V. Recherche de la flore réductrice de l'OTMA	112
1. Capacité de certaines souches bactériennes à réduire l'OTMA.....	113
1.1. Méthode qualitative.....	113
a) Tests des milieux de culture	113
b) Recherches d'autres indicateurs	114
c) Exploitation de la méthode qualitative.....	115
1.2. Méthode quantitative.....	116
a) Sur le milieu de culture Sea-fish.....	116
b) Essai d'un autre milieu.....	117
c) Exploitation de cette méthode	117
VI. Mise au point d'une méthode de dosage de la réduction de l'OTMA.....	121
1. Temps d'incubation.....	121
2. Exploitation sur du poisson.....	122
VII. Méthode qualitative d'évaluation de la production d'amines biogènes.....	124
B. Etudes Biochimiques	125
I. Mise au point d'une méthode de dosage des amines par C.L.H.P.....	125
1. Intérêt du protocole retenu	125
2. Optimisation de la phase d'extraction.....	126

2.1. Recherche de l'acide d'extraction	126
a) L'acide perchlorique.....	126
b) l'acide trichloroacétique.....	127
c) l'acide trifluoroacétique.....	128
d) Comparaison.....	128
2.2. Température de broyage.....	129
2.3. Nombre de broyages.....	131
2.4. Temps de broyage.....	131
2.5. Temps de centrifugation.....	133
2.6. pH de la phase aqueuse.....	134
a) Avec du poisson.....	134
b) Avec des solutions d'amines.....	134
3. Optimisation de la phase de marquage.....	136
3.1. Concentration de la solution de chlorure de dansyl.....	136
3.2. Temps de marquage.....	136
4. Optimisation de la phase de neutralisation du chlorure de dansyl.....	136
5. Optimisation de la phase de purification des amines.....	139
6. Vérification de la méthode.....	139
7. Nombre de mesures et d'échantillons à réaliser.....	141
8. Recherche d'autres amines.....	141
9. Évaluation de l'altération du poisson par les amines détectées.....	143
9.1. Information sur les amines volatiles.....	144
9.2. Recherche d'un indice d'altération.....	145
9.3. Recherche d'un seuil et essai de modélisation du rapport I.A.....	151
<u>II. Mise au point d'une méthode de dosage des dérivés de dégradation de l'ATP.....</u>	<u>157</u>
1. Recherche d'un nouveau gradient d'élution.....	158
2. Récupération des dérivés de l'ATP sur du poisson.....	161
3. Recherche d'un étalon interne.....	163
4. Recherche d'un rapport.....	165
4.1. Essais préalables.....	165
4.2. Essais de généralisation.....	167
<u>III. Mise au point d'une technique de dosage du formol pour le poisson.....</u>	<u>170</u>
1. Mise au point de la méthode de dosage du formol.....	170
2. Mise au point de la méthode de dosage des groupements aminés.....	171
2.1. Vérification de la réaction d'imination.....	171
2.2. Réaction d'imination sur les groupement NH ₂ du poisson.....	171
3. Évaluation du taux de formol et des groupement NH ₂ libres.....	172

4. Recherche d'un seuil d'altération et essai de modélisation du G.A.L.	174
5. Corrélation entre le G.A.L. et l'I.A.	175
6. Mise au point d'un nouveau rapport	176
<u>IV. Voie de dégradation de l'OTMA</u>	179
1. Etude de la voie de dégradation de l'OTMA	182
2. Production d'amines tertiaires chez le poisson.....	187
CONCLUSION	191
BIBLIOGRAPHIE	196
ABREVIATIONS	209

Introduction

Le poisson est une denrée alimentaire rendue fragile par la multiplication des opérations commerciales. Peu de méthodes normalisées existent aussi bien pour l'évaluation microbiologique que pour l'évaluation biochimique de l'altération du poisson. L'altération de ce substrat riche est complexe. Pourtant, les recherches en microbiologie et biochimie alimentaires se sont considérablement développées ces dernières années. Elles sont susceptibles de préciser l'évolution de l'altération en fonction de la nature des micro-organismes, des conditions de conservation ou encore de la qualité de la matière première.

Dans le but de mieux comprendre les variabilités de composition du poisson, nous développerons tout d'abord les caractéristiques microbiologiques et biochimiques de ce substrat. Puis, certains aspects de la variabilité de l'altération seront abordés et permettront d'orienter les recherches vers des méthodes d'analyses microbiologiques de la flore d'altération et vers des méthodes d'analyses biochimiques permettant de caractériser de nouvelles molécules spécifiques d'altération.

Les travaux seront réalisés à partir de poissons pêchés en eaux de mers froides ou tempérées à différentes périodes de l'année. Nous avons limité nos études aux bactéries d'altération colonisant le muscle du poisson marin. Les microflores pathogènes et les autres parties consommables du poisson ne seront pas abordées. Les recherches se baseront sur les connaissances actuelles de la flore d'altération par des méthodes de dénombrement référencées et sur des dosages chimiques les plus utilisés pour l'évaluation de cette altération.

Les recherches s'orienteront dans un premier temps vers la mise au point de milieux de culture ou de méthodes de dosage permettant de suivre l'altération du poisson. Ces méthodes feront l'objet d'analyses statistiques pour l'optimisation. Dans un deuxième temps des essais seront réalisés sur des lots représentatifs de pêches industrielles avant de faire l'objet de modélisations mathématiques permettant de suivre l'évolution de l'altération. De cette manière, nous pensons mieux comprendre, d'une part, les facteurs pouvant intervenir dans les évaluations microbiologiques et/ou biochimiques de l'altération et d'autre part, évaluer la qualité d'un poisson à partir de ces méthodes.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Microbiologie et Biochimie du poisson et processus d'altération

A. Caractéristiques microbiologiques

I. Introduction

Le poisson vit dans un environnement complexe qui est sous l'influence de différents facteurs. L'eau dans laquelle il évolue n'est pas stérile. La flore aquatique se retrouve naturellement en contact avec les organes du poisson, d'autre part, la nature des contaminants est extrêmement variable.

II. Origine de la flore bactérienne

Les bactéries qui contaminent le poisson sont essentiellement celles du milieu ambiant : vase des fonds, eau et air. La flore est naturellement différente en mer et en eau douce tant par la nature et la variété des espèces, que par l'importance numérique des germes qui la constituent. La flore marine comprend un nombre limité de genres. L'eau douce qui est le véhicule normal des pollutions contient une plus grande variété de bactéries.

La qualité microbiologique de l'eau a une très grande influence sur la contamination du poisson. En effet, l'eau contient des bactéries provenant principalement du sol (*Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Moraxella*...), accidentellement des matières fécales (Entérobactéries, Entérocoques...) et parfois certains pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*...).

La flore que l'on retrouve sur le poisson varie avec les saisons (température, nourriture), la proximité des côtes (la zone de pêche), mais aussi avec la salinité de l'eau, la concentration en oxygène dissous, et le pH (Horsley, 1977).

L'eau de mer contient normalement quelques centaines de bactéries par ml en surface et beaucoup moins en profondeur, environ 10 par ml à 200 m (Soudan et coll., 1965).

Les mers et les eaux douces ne sont pas contaminées par les mêmes bactéries (tableau.1). La plupart des bactéries marines exigent du sodium pour leur croissance (Soudan et coll., 1965 ; Reichelt et Baumann, 1974).

Tableau 1. Bactéries rencontrées dans les eaux de pêches.

Genres	Mers		Eaux		
	Froides	Chaudes	du Littoral	Douces	Polluées
<i>Pseudomonas/Alteromonas</i>	++	+	+	++	++
<i>Moraxella/Acinetobacter</i>	++	+	+	++	+
<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	+	+	+	++	
<i>Vibrio</i>	+		+		++
<i>Alcaligenes</i>	+		+	+	
Enterobacteries			+		++
<i>Corynebacterium</i>		++	+		
<i>Bacillus</i>		++			+
<i>Micrococcus</i>		++	+	++	

++ : germes prédominants ; + germes souvent rencontrés

Dans les mers froides, on note la prédominance de bactéries psychrophiles et psychrotrophes à Gram négatif et un plus faible taux de bactéries mésophiles (Soudan et coll., 1965 ; Baumann et coll., 1972 ; Crepey, 1972 ; Gonzalez-Carrero et coll., 1979 cité par Sainclivier, 1983).

Dans les eaux chaudes, les bactéries mésophiles à Gram positif sont prédominantes et les bactéries psychrophiles ou psychrotrophes se trouvent en plus faible représentation (Gillepsie, 1975 ; Gillepsie et Macree, 1975 ; Gorczyka et coll., 1985 ; Shetty et Shetty, 1990).

La flore des eaux du littoral est plus complexe que celle de l'eau de mer : on rencontre des contaminations d'origine terrestre dont parfois un certain nombre de germes pathogènes (Soudan coll., 1965). Les microflores d'eau douce, des eaux domestiques, des eaux d'égouts

sans oublier des eaux rurales et industrielles viennent s'y ajouter (Shewan, 1971 ; Bonde, 1977).

Dans l'eau douce, les genres rencontrés sont généralement ceux du milieu terrestre (Soudan et coll., 1965).

Les eaux polluées peuvent contenir les différents types de bactéries cités précédemment auxquels s'ajoutent des Entérobactéries (Buttiaux, 1968 ; Bonde, 1977 ; Shewan, 1977 ; Rice et coll., 1984 ; Cahill, 1990).

III. Localisation de la flore bactérienne

La peau, les branchies et les intestins hébergent une flore commensale plus ou moins abondante. Toutefois l'intestin des poissons vivants est une barrière naturelle à la contamination : la membrane muqueuse peut retarder l'invasion des chairs par les bactéries. Des anticorps en circulation constante dans le corps empêchent le développement de certaines bactéries.

La peau des poissons constitue également une barrière naturelle : le mucus qui la recouvre peut contenir des substances anti-microbiennes ; anticorps ou lysozymes (carrelet, truite) (Murray et Fletcher, 1976 ; Shewan, 1977 ; Peleteiro et Richards, 1985 ; Lindsay, 1986). Cette activité anti-microbienne est attribuée chez la truite à des glycoprotéines contenues dans des lysosomes (Murray et Fletcher, 1976 ; Austin et Mac Intosh, 1988).

Le fait que le mucus de poisson ait des propriétés antibiotiques reste controversé car les bactéries contaminantes semblent se développer facilement dans le mucus et les téguments extérieurs (Jay, 1970).

En outre, la phagocytose des bactéries par les cellules du système réticulo-endothélial (lymphe) arrive à maintenir une sorte d'équilibre pour l'organisme sain ; de ce fait, le corps des poissons sains est débarrassé des invasions bactériennes, la chair est généralement stérile (Proctor et Nickerson, 1935).

Même si la diversité des espèces commercialisées (environ 3000), n'a qu'une faible incidence sur la nature et le nombre de bactéries initialement présents (Soudan et coll., 1965 ; Ward et Baj, 1988), il faut bien admettre que la composition de la flore n'est pas identique

suivant les poissons (Shewan, 1971). Les charges bactériennes ainsi que la nature de la flore des différents organes sont variables (Tableau 2). Elles dépendent principalement de facteurs environnementaux.

Tableau 2. Flore bactérienne des organes du poisson en contact avec le milieu environnant.

Eaux ou Mers	Peau et mucus			Branchies (Froides)	Intestins (Toutes)	Oeufs (Salage)
	Froides	Chaudes	Douces			
Charges (germes/cm ² ou /g)	10 ² à 10 ⁷	10 ² à 10 ⁷	10 ² à 10 ⁷	10 ³ à 10 ⁷	10 ³ à 10 ⁸	10 ³ à 10 ⁶
<i>Pseudomonas/Alteromonas</i>	++	+	++	++	+	++
<i>Moraxella/Acinetobacter</i>	++	+	+	++	++	+
<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	+	+		+	++	++
<i>Vibrio</i>	+		+	+	++	
<i>Alcaligenes</i>	+			+		
Enterobacteries				+	+	
<i>Corynebacterium</i>	+	++	+	+	++	+
<i>Bacillus</i>		++		+		
<i>Micrococcus</i>	+	++	+	+	+	+

++ : germes prédominants ; + germes souvent rencontrés

La flore de surface des poissons pêchés en eaux froides ou tempérées est nettement dominée par les bactéries à Gram négatif, psychrotrophes ou psychrophiles aérobies strictes ou aérobies-anaérobies facultatives (Shewan, 1949, 1962, 1971 ; Colwell, 1962 ; Soudan et coll., 1965 ; Horsley, 1973 ; Gilmour et Coll., 1976 ; Skovgaard, 1979 ; Hobbs et Hodgkiss, 1982 ; Hobbs, 1983 ; Austin, 1983 ; Cahill, 1990).

La flore de surface des poissons pêchés en eaux chaudes et tropicales présente un plus grand pourcentage de mésophiles à Gram positif (Gillespie et Macrae, 1975).

Les branchies sont contaminées par les mêmes germes que la peau (Shewan, 1949, 1961 ; Colwell, 1962 ; Simidu et coll., 1969 ; Horsley, 1973 ; Neito et coll., 1984 ; Mudarris et Austin, 1988).

La flore intestinale est principalement constituée de bactéries à Gram négatif avec une proportion de bactéries anaérobies facultatives ou strictes plus forte que pour les flores de surface et des branchies. On peut également rencontrer des Entérobactéries (Simidu et coll., 1969 ; Newman et coll., 1972 ; Shewan, 1977 ; Liston, 1980 ; Mac Farlane et coll., 1986 ; Austin et Al-Zahrani, 1988 ; Cahill, 1990). Cette flore dépend de l'alimentation du poisson.

La flore de surface des oeufs est similaire à celle de la peau (Bell et coll., 1971 ; Yoshimizu et coll., 1980 ; Sugita et coll., 1988).

IV. Flores particulières

1. Les bactéries halophiles et halotolérantes

Les bactéries marines se développent dans de l'eau de mer à 35 g/L de sel (NaCl) qui est un milieu plus ou moins homogène. Dans ces conditions, les bactéries peuvent être indifférentes à la concentration en sel (halotolérantes) ou ont besoin de cet élément pour leur développement (halophiles) (Soudan et coll., 1965 ; Oteng-Gyang, 1984).

Des bactéries halophiles rencontrées chez le poisson (*Sarcina*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio* et *Acinetobacter*) peuvent se propager dans les saumures utilisées pour conserver les filets.

Certaines bactéries ne sont qu'halotolérantes, elles peuvent se développer en présence ou en absence de sel.

2. Les *Pseudomonas* et genres proches

Les *Pseudomonas* sont souvent rencontrés dans la flore de contamination (Tableau 2 p. 12). Ils se caractérisent comme des germes à Gram négatif, mobiles présentant un métabolisme inerte ou oxydatif vis-à-vis du glucose.

Les *Pseudomonas* ont été classés dans un premier temps en 4 groupes (Buttiaux et coll., 1974) : les *Pseudomonas* de type I, fluorescents et oxydant le glucose (*aeruginosa*, *fluorescens*, *putida*) ; les *Pseudomonas* de type II, non pigmentés et oxydant le glucose ; les *Pseudomonas* de type III, non pigmentés et alcalinisant et les *Pseudomonas* de type IV, non pigmentés et inactifs.

Beaucoup réduisent l'oxyde de triméthylamine et les nitrates.

Lee et coll. en 1977 ont proposé de transférer les *Pseudomonas* ayant des pourcentages guanine-cytosine (GC %) d'environ 40 à 50 % dans le genre *Alteromonas*. C'est ainsi que *Pseudomonas putrefaciens* (groupe IV) est devenue *Alteromonas putrefaciens* (Leclerc et Mossel, 1989).

Alteromonas putrefaciens a été reclassée en *Shewanella putrefaciens* par les techniques moléculaires (Stenström et Molin, 1990). Les *Pseudomonas* sont actuellement caractérisés par un pourcentage GC compris entre 58 et 70%.

Pseudomonas, *Alteromonas*, *Shewanella* et *Aeromonas* ont des profils phénotypiques très proches (Stenström et Molin, 1990).

3. La variabilité des microflores

La flore dépend de facteurs environnementaux extrêmement variables que nous ne pouvons contrôler (§ II. p. 9)

Des charges bactériennes de surfaces sont réduites de 10 à 100 fois sur des poissons pêchés en eaux froides propres par rapport à des eaux polluées (Liston, 1980).

La flore intestinale est extrêmement variable : elle dépend de l'espèce, des aliments (Huss, 1988) ; mais également de l'état physiologique du poisson : la flore intestinale d'un poisson en période de jeûne précédant le frai est considérablement réduite (qualitativement et quantitativement) (Soudan et coll., 1965).

La flore microbienne des poissons varie suivant le traitement subi pendant la capture du poisson. Shewan (1961, 1971) a montré que les poissons attrapés par les chalutiers ont une charge bactérienne 10 à 100 fois supérieure à celle des poissons capturés à la ligne. Cette différence peut être attribuée, d'une part, au chalut qui drague le fond riche en bactéries et d'autre part, à une libération du contenu intestinal des poissons compressés dans les mailles du filet.

B. Caractéristiques biochimiques

I. Introduction

Les poissons, d'un point de vue zoologique sont hétérogènes ; on distingue les Sélaciens et les Téléostéens qui sont physiologiquement et génétiquement très éloignés. Il en découle une certaine diversité de la composition chimique des poissons.

Le poisson est constitué des mêmes éléments chimiques que les mammifères ou les oiseaux mais les proportions et les enchaînements des composés élémentaires : acides aminés, acides gras,... donnent leur physionomie particulière.

Nous ne nous intéressons qu'aux muscles (la chair) des poissons. Ils représentent environ 35-40 % de la masse du poisson entier chez le lieu noir, le merlan, la morue, la sole et 65-70 % chez le hareng, la carpe, l'anchois, la vieille. La composition de la chair constituée par les muscles rouges et blancs évolue au cours de la croissance des poissons et n'est pas la même entre les espèces (Sainclivier, 1983).

II. Composition chimique du poisson

Nous ne prendrons en considération que le muscle au sens large (regroupant les muscles rouges et blancs). Le muscle comprend des fibres, du tissu conjonctif qui les entourent, des vaisseaux sanguins et des nerfs, du tissu contenant des lipides, et de la myoglobine. Le muscle renferme (tableau 3) environ 74 % d'eau, 19 % de protéines, 4,5 % de lipides dont 0,3 à 1 % de phospholipides, 1% de glucides, 1,2 % de sels minéraux (dont 38 % d'ions potassium intracellulaire et 7 % d'ions sodium extracellulaires). Les muscles se composent donc principalement d'eau et de matières azotées.

La teneur en eau varie en sens inverse de la teneur en lipides.

Tableau 3. Composition moyenne du muscle de poisson en % (Jacquot, 1961; Stanby 1962; Murray et Burt, 1969)

Poisson	Eau	Protéines	Lipides	Cendres
Poissons gras	68,6	20	10	1,4
Poissons semi-gras	77,2	19	2,5	1,3
Poissons maigres	81,8	16,4	0,6	1,2
Moyennes	74	19	4,8	1,2

La texture du muscle de poisson dépend de l'espèce, de l'âge, de la taille et de la nutrition (Dunajski, 1979) : il n'est pas rare de trouver des taux de lipides supérieurs à 20 % chez les poissons gras suivant la saison de pêche et la nutrition des animaux.

1. Les substances azotées

La répartition des composés azotés dans les muscles de poisson, est comme on peut le constater tableau 4 (p. 16), peu différente entre les espèces de même embranchement.

Les matières azotées du poisson sont essentiellement protéiques ; les composés azotés non protéiques ne représentent que 9 à 18 % de l'azote total chez les Téléostéens et plus de 30% chez les Sélaciens mais ils jouent un rôle important dans l'évaluation de l'altération.

Tableau 4. Répartition des composés azotés dans les muscles de poissons (Soudan et coll., 1965).

	Azote total % de muscle frais	Azote protéique % de l'azote total		Azote non protéique % de l'azote total
		Stroma	Intracellulaire	
Sélaciens			59,5	34
Chien de mer	3,3 à 4,0	6,5	60	33 à 36
Raies	3,6 à 4,0	5		
Téléostéens			83	12
Gadidés	2,6 à 3,0	2,5 à 4,5	84	11 à 14
Pleuronectes	2,7 à 3,2	6,2	82	9 à 13
Clupéidés	2,4 à 3,7	4,2		13 à 18
Scombriformes	3,1 à 3,6	1,3 à 3,2		11 à 15
Autres	2,6 à 3,2	4,5	84	10 à 12

1.1. Les matières azotées protéiques

Les principaux constituants protéiques du muscle (tableau 5) sont les protéines sarcoplasmiques, les protéines myofibrillaires et les protéines du tissu conjonctif.

Tableau 5. Composants protéiques du muscle de poisson.

Protéines	Sarcoplasmiques	Myofibrillaires	Tissu conjonctif
% des protéines totales	25 à 30	65 à 75	3 à 10
Composants essentiels	myoglobine albumines globulines nucléoprotéines enzymes	myosine actine actomyosine tropomyosine	collagène élastine kératine réticuline
Caractéristiques	protéines globulaires, solubles de faibles poids moléculaires.	riche en groupements -SH libres.	forte teneur en acides aminés apolaires : leucine, valine, proline, glycocolle, hydroxyproline, isoleucine. la kératine possède de nombreux ponts disulfures (cystéine).

Les protéines fibrillaires des poissons sont plus courtes que celles des autres animaux.

Le collagène qui maintient en place les fibres musculaires est également le constituant majeur de la peau, des tendons, des cartilages et des os. Il est résistant à la décomposition du fait de sa forte teneur en acides aminés apolaires.

La kératine est une protéine constituant la partie majeure des écailles de poissons.

On rencontre dans les protéines du muscle de poisson différents acides aminés (tableau 6).

Il ne semble pas y avoir de différences majeures dans la composition en acides aminés du muscle des poissons d'eau douce et des poissons de mer (Angel et coll., 1977 cité par Sainclivier, 1983; Legrand et coll., 1981).

Tableau 6. Composition en acides aminés (en g/100 g de chair) des protéines du muscle de poisson (Geirger et coll., 1962 ; Borgstrom, 1962). AA : Acides aminés essentiels.

Acides aminés	Maquereau	Saumon	Morue	Églefin	Limande	Hareng	Poissons
Aspartate							6,2 à 11,5
Glutamate							13,4 à 16,9
Sérine							4,6 à 5,5
Glycocolle							3,0 à 5,5
<u>Histidine</u>	3,8	2,6	3,47	3,67	3,62	3,69	2,2 à 3,9
<u>Arginine</u>	5,8	5,8	6,74	6,99	6,76	7,33	5,9 à 6,9
<u>Thréonine</u>	4,9	4,4	5,26	5,79	5,70	5,34	5,2 à 6,0
<u>Alanine</u>			7,19	6,99	6,94	7,35	5,1 à 7,3
Proline							2,9 à 4,2
Tyrosine							3,5 à 4,6
<u>Valine</u>	5,4	5,6	5,79	5,68	5,85	6,00	5,6 à 9,3
<u>Méthionine</u>	2,7	3,0	2,07	3,22	3,42	2,02	3,1 à 3,7
<u>Isoleusine</u>	5,2	4,9	4,88	4,68	5,47	5,09	5,0 à 7,9
<u>Leucine</u>	7,2	7,3	9,31	9,31	8,70	9,59	7,4 à 9,4
<u>Phénylalanine</u>	3,5	3,7	4,67	4,67	4,85	4,73	3,4 à 5,2
<u>Lysine</u>	8,1	8,0	10,32	11,02	10,73	10,29	9,9 à 11,8
<u>Tryptophane</u>	1,0	0,8	1,32	1,43	1,56	1,41	1,1 à 1,4

1.2. Les matières azotées non protéiques

L'azote non protéique représente de 9 à 14 % chez les Gadidés et 16 à 18 % chez les Clupéidés (Simidu, 1961) soit 9,2 à 18,3 % de l'azote total chez les Téléostéens, et de 33 à 38,6 % chez les Sélaciens (tableau 4 p. 16).

Les composés azotés non protéiques comprennent (tableau 7 p. 18) :

- la plupart des aminoacides libres : par exemple l'histidine et des dipeptides comme la carnosine et l'ansérine, des dérivés de la guanidine, de la créatine,
- des bases triméthyl-ammonium : par exemple l'oxyde de triméthylamine (OTMA), la triméthylamine (TMA) et les bêtaïnes,

- des bases volatiles regroupées sous le nom d'azote basique volatil total (ABVT) contenant notamment l'ammoniac, la TMA et l'urée,
- des nucléotides et des complexes nucléotidiques (Jacquot, 1961 ; Simidu, 1961).

La teneur élevée en matières azotées non protéiques des Sélaciens est surtout due à l'urée et à l'OTMA réduit en TMA. Ils sont probablement les principaux responsables de la flaveur (Soudan et coll., 1965 ; Simidu, 1961).

Tableau 7. : Matière azotée non protéique des extraits de muscle de poisson (en mg/100 g de matière sèche) (Shewan et Murray, 1979)

	Morue	Hareng	Requin
Extrait total	1200	1200	3000
Acides aminés libres totaux	75	300	100
Créatine	400	400	300
Bétaïne	-	-	150
Oxyde de triméthylamine	350	250	500-1000
Ansérine	150	-	-
Urée	-	-	2000

- : composé non décelé

a) Les acides aminés et dipeptides libres

Dans ce paragraphe, il ne sera présenté que certains acides aminés et dipeptides libres.

L'histidine est un aminoacide hétérocyclique basique comportant des imines. Elle se trouve systématiquement à un taux élevé dans les muscles à chair rouge des Clupéidés, des Scombridés, des Bramidés, des Cyprinidés, des Percidés (Jacquot, 1961 ; Shewan, 1961 ; Soudan et coll., 1965 ; Bourgeois et coll., 1988).

Une forte teneur en histidine peut favoriser la formation d'histamine à des taux tels que le poisson peut devenir toxique (> 100 ppm d'histamine) (Edmunds et Eitenmiller, 1975). L'histamine et des substances voisines (saurine) sont responsables d'empoisonnements caractérisés par des nausées, vomissements, rougeurs faciales, maux de tête, douleurs épigastriques, sensation de brûlure dans la gorge, difficulté à avaler, soif, lèvres gonflées, urticaire... Ces observations ont été faites notamment après ingestion de maquereau espagnol (*Scombero morus maculatus*) et de truite mouchetée (*Cynoscion nebulosus*) (Sainclivier, 1983).

La lysine, existe à l'état libre en quantité importante dans le poisson. Parmi les poissons d'eau douce on trouvera de la lysine chez le gardon, la brème, la tanche (Bramstedt et coll., 1961 cité par Soudan et coll., 1965).

Les acides aminés soufrés ; cystéine (cystine = 2 cystéines) et méthionine se trouvent en quantité plus élevée dans la chair des poissons par rapport à la chair des mammifères.

La méthionine est un fournisseur de groupements méthyle. Elle doit d'abord être activée par l'ATP pour donner la **S-adénosyl-méthionine** qui est un agent participant aux processus de transméthylation (formation de choline, créatine, adrénaline, ARN-t méthylé)

La carnosine est un composé de β alanine et d'histidine, elle joue un rôle biologique actif dans le transfert du phosphate au cours de la construction musculaire. Elle ne se trouve pas chez les poissons d'eau douce sauf chez l'anguille (0,5 %) (Jacquot, 1961), abondante dans la chair rouge de thon (Ikeda, 1980), et décelée chez l'esturgeon (Geiger et coll., 1962).

L'ansérine est composée de β alanine et de méthylhistidine. Elle se trouve dans la morue et le congre, ne se trouve pas chez les poissons d'eau douce ni les Clupéidés (Bramstedt et coll., 1961 cité par Soudan et coll., 1965 ; Simidu, 1961).

La créatine est une base diaminée (l'acide méthyl-guanidine-acétique). Elle existe à des taux élevés dans les espèces à nage rapide (hareng, saumon, carpe) environ 160 à 720 mg pour 100 g de chair (Ikeda, 1980). Elle participe au métabolisme énergétique de la contraction musculaire (phosphocréatine). L'arginine est précurseur de la créatine.

La sarcosine est un produit de dédoublement de la créatine (Legrand et coll., 1981) qui est rencontrée chez les Sélaciens (Shewan, 1961).

b) Les triméthylamines

L'oxyde de triméthylamine (OTMA)

Il peut être considéré comme un aminoxyde (amine tertiaire). L'OTMA peut jouer le rôle d'accepteur biologique d'hydrogène et se transformer en triméthylamine (TMA). L'origine et le rôle de l'OTMA sont encore discutés. Il provient probablement de la choline comme les bêtaïnes (Ikeda, 1980) ou d'un turn-over entre la triméthylamine (TMA) et

l'OTMA catalysé par une monooxygénase (NADPH H⁺ dépendant) (Agustsson et Strom, 1981).

L'OTMA est aussi présent dans les poissons d'eau douce mais en plus faible quantité (Simidu, 1961). Il est naturellement présent à des concentrations variables : inférieures à 0,6 g / 100 g pour les poissons plats, il peut atteindre 1 g / 100 g chez les Gadidés et de 0,5 à 1,5 g / 100 g chez les Sélaciens (Yamada, 1967 ; Harada, 1975 ; Ikeda 1980).

La triméthylamine (TMA)

La TMA produite par réduction de l'OTMA est en partie responsable de la flaveur du poisson. La teneur en TMA des poissons est faible : environ 0,2 mg/100 g de muscle blanc et de 2 à 3 mg/100 g de muscle rouge (Kawabata, 1953).

La bétaine

La bétaine est à rapprocher de l'OTMA en tant que donneur de radicaux méthyle et par conséquent, elle a une action synergique avec la méthionine en l'absence de choline. Les teneurs en bétaine sont élevées surtout dans la chair de Téléostéens (Jacquot 1961), plus faibles chez les Sélaciens (70 à 160 mg pour 100g) et chez les poissons d'eau douce, 10 mg chez les carpes (Soudan et coll., 1965).

La glycérylphosphorylcholine

Elle apparaît sous l'action successive de phospholipases (A₁ et A₂) qui détachent les deux acides gras de la molécule de glycérophosphorylcholine (appelée glycérophospholipide ou phosphatide). Les glycérophospholipides sont des constituants importants de la membrane cellulaire.

c) L'urée

L'urée, ou carbamide, a été découverte pour la première fois chez la raie et le requin (Sélaciens) à la fin du siècle dernier.

L'urée s'accumule dans les muscles, le foie, les liquides biologiques des poissons : environ 2 g pour 100 g de muscle chez les Sélaciens et seulement 0,5 à 15 mg pour 100 g chez les Téléostéens et environ 0,65 g pour 100 g de muscle chez les poissons d'eau douce (Soudan et coll., 1965 ; Read, 1968).

L'urée joue un rôle important dans le métabolisme des Sélaciens, on lui attribue généralement la responsabilité de la régulation osmotique des fluides du corps de ces poissons (Simidu, 1961).

L'urée est toxique et son accumulation entraînerait une inhibition des enzymes et donc une mort de l'animal. Les grenouilles (*Xenopus laevis*) utilisent "les triméthylamines" pour neutraliser l'urée (Wray et Wilkie, 1995) au même titre que les Sélaciens (Somero, 1986 ; Anderson, 1995) : il y a pour deux molécules d'urée, une molécule de triméthylamine (2/1) (Yancey et Somero, 1980).

d) L'ammoniac

Il est un constituant normal de la chair de poisson. L'ammoniac représente au moins 5 mg/ 100g de chair chez les Téléostéens de mer et d'eau douce (Soudan et coll., 1965).

Mais compte tenu de la variation du métabolisme de l'urée, des divergences importantes existent entre les Sélaciens et les Téléostéens.

e) Les dérivés nucléotidiques

La teneur en acides nucléiques est plus faible chez les poissons que chez les mammifères : elle oscille entre 0,2 et 2,5 mg d'ADN (acide déoxyribonucléique) et entre 42 et 142 mg d'ARN (acide ribonucléique) pour 100 g de chair (Sainclivier, 1983).

Dans les muscles de poisson les adénine-nucléotides (5 à 8 $\mu\text{mol/g}$) représentent plus de 90 % des nucléotides totaux, le principal constituant est l'ATP (Adénosine triphosphate) (Ikeda, 1980).

2. Les lipides

La caractéristique physique principale de la matière grasse des poissons est sa fluidité c'est pourquoi on utilise le terme d'huile.

La matière grasse est constituée chez le poisson de beaucoup plus d'acides gras insaturés que chez les mammifères, ce qui les rend très oxydables.

Les lipides entrant dans la composition du muscle des poissons sont extrêmement variables aussi bien quantitativement que qualitativement (tableau 8 p. 22).

Tableau 8. Répartition des différents constituants lipidiques dans les huiles musculaires de poissons maigres et gras (Jacquot, 1961).

	Églefin <i>Gadus aeglefinus</i>	Morue <i>Gadus callarias</i>	Thon <i>Germo alalunga</i>
Lipides totaux % muscle	0,55	0,6	10,3
Triglycérides	2,4	3	96,1
Lécithine	42,8	35	
Phosphatidyléthanolamine	5,4	7	2,4
Lipides inositols	4,4	2	0,9
Esters de cholestérol	3,4	5	0,12
Acides gras libres	6,1	6	
Cholestérol libre	6,1	8	

La fraction lipidique est globalement constituée de la manière suivante :

- d'acides gras saturés C_8 à C_{24} (15 à 40 %) constitué majoritairement de C_{16} (acide palmitique) (Notevarp, 1961),

- d'acides gras insaturés (plus de 40 %) avec une forte proportion d'acides en C_{18} (acide oléique), C_{20} (acide arachidonique), C_{22} (acide docosahexaénoïque) (Tsuchiya, 1961) quel que soit le poisson (de mer ou eau douce). Les acides gras les plus insaturés se rencontrent chez les poissons dits gras dont la proportion peut atteindre 75 % mais avec un degré d'insaturation variable (Jacquot, 1961).

On distingue, suivant la teneur en lipides, différents types de poissons (tableau 9 p. 23) :

- les poissons maigres : les muscles ne contiennent que quelques grammes de lipides pour 100 g de chair, en majorité des phospholipides (65% des lipides) et 35 % de glycérides. Le foie, par contre, peut en contenir de 40 % à 70 %.

- les poissons gras : les muscles contiennent en général plus de 8% de matière grasse essentiellement des triglycérides (80 à 90 %). Les graisses sont sous forme de globules gras extracellulaires dans les muscles et dans le mésentère ; elles forment des couches sous la peau et dans la cavité abdominale.

Une chair riche en lipide est dite "crayeuse".

Tableau 9. : Matière grasse des poissons (g/ 100g de chair) (Tremolliere et coll., 1980).

Poissons maigres		Poissons gras		Intermédiaires	
Morue	0,1 à 0,9	Sardine	1,0 à 23	Carrelet	1,1 à 3,6
Églefin	0,1 à 0,6	Hareng	0,8 à 25	Turbot	2,1 à 3,9
Lieu noir	0,3 à 0,6	Maquereau	6,0 à 23	Sole	1,8 à 2,3
Lieu jaune	0,6 à 0,8	Saumon	0,4 à 14		
Merlan	0,2 à 0,6	Anguille	0,8 à 31		
Merlu	0,4 à 1,9	Anchois	0,9 à 6		
Raie	0,1 à 1,6				
Lingue	0,1 à 0,4				

Les lipides se rencontrent :

- en inclusions lipidiques sous forme de gouttelettes de graisse en suspension dans le sarcoplasme, souvent proches des mitochondries,
- dans le réticulum sarcoplasmique, composé à 40 % de lipides dont les 2/3 sont des phospholipides,
- dans la peau qui peut en contenir des quantités non négligeables (jusqu'à 50% chez le maquereau) (Ackman, 1980),
- dans les tissus abdominaux (Labuza, 1971). La partie ventrale entourant la cavité viscérale est une partie généralement riche en matière grasse.
- dans le foie.

3. Les glucides

Le poisson est pauvre en glucides. Le glycogène est généralement une forme de stockage du glucose. Dans le muscle de poisson le taux de glycogène varie selon les espèces, l'état alimentaire et de fatigue de l'animal. Il est cependant équivalent à celui des mammifères : environ 1 à 1,5 % (Bramstedt et coll., 1961 cité par Soudan et coll., 1965).

Les granules de glycogène se trouvent en suspension dans le sarcoplasme sous forme de particules sombres de 0,025 à 0,03 μm de diamètre proche du sarcolemme.

4. Les vitamines

Les vitamines principalement représentées par les vitamines A, B et D (tableau 10) se concentrent en général dans les organes internes plutôt que dans le muscle (Ikeda, 1980).

Tableau 10. Les principales vitamines du poisson

	Vitamines	Quantité	Auteurs
Liposoluble	A	1.000 à 650.000 U.I./g dans le foie 260.000 U.I./g dans les viscère 50 à 150 U.I./g dans la chair	Higashi, 1961
	D	70 à 45.000 U.I./g dans le foie 500 à 3.000 U.I./g dans la chair	Cruickshank, 1962
Hydrosoluble	Thiamine (vitamine B ₁)	10 % des besoins quotidiens pour l'homme dans 100 g de chair	Sainclivier, 1983
	Riboflavine	5 à 10 % des besoins quotidiens pour l'homme dans 100 g de chair	
	Acide folique	0,5 à 30 µg / 100 g de chair	Higashi, 1961
	B12		
	Acide panthoténique	1 à 25 mg pour 100 g de chair	Higashi, 1961
	Niacine		
	Biotine	10 × plus dans les sardines que dans le boeuf	Jacquot, 1961

U.I. : unité internationale.

L'acide folique entre dans la composition de l'acide tétrahydrofolique (THF) co-enzyme transporteur d'unités monocarbonées (méthyle), permettant la formation de sérine à partir du glycolle.

5. Le formol

Le formol ou formaldéhyde est décelé aussi bien dans le poisson frais que dans le poisson salé mais ce fait est peu connu. Tous les produits marins contenant de l'OTMA renferment du formol (19 à 175 mg par Kg) (Soudan et coll., 1965 ; Castell et coll., 1973 ; Dingle et coll., 1977 ; Gill et coll., 1979 ; Sainclivier, 1983). Le formol se fixe aux protéines hydrosolubles et réduit considérablement leur extraction (Owusu-Ansah et Hultin, 1987).

Le formol entraîne une dénaturation des protéines par une réaction d'imination (Malle et coll., 1981). Cette réaction se réalise entre le groupement —NH_2 des composés aminés et le formol (HCHO) pour former un dérivé iminé stable (—N=CH_2). Cette réaction s'effectue dans les tissus des poissons fumés (la fumée contient du formol et autres aldéhydes).

6. Les minéraux

Les principaux minéraux retrouvés sont le potassium, le phosphore, le soufre, le chlorure de sodium à raison de 50 à 300 mg pour 100 g de chair, le calcium et le magnésium de l'ordre de 10 à 100 mg pour 100 g de chair (Ikeda, 1980). Le fer se trouve à des concentrations de l'ordre de 0,5 à 2.5 mg pour 100 g de chair (Ludorff et Meyer, 1973).

III. Les indicateurs de pollution

Les polluants industriels qui se retrouvent dans la mer sont susceptibles de contaminer les poissons.

On retrouve ainsi des résidus de pétrochimie tels que des dérivés du benzène, de l'anthracène ou du naphtalène (Kuehn et coll., 1995). Ces produits seraient à l'origine de cancers chez le poisson (Malins et Ostrander, 1994).

Dans certains cas, il s'agit de métaux lourds (Pb, Cd, Hg) qui s'accumulent dans les tissus et se retrouvent dans l'assiette du consommateur (catastrophe de Minamata, Japon).

Enfin, il peut s'agir de contamination par des pesticides (malathion et dieldrine) susceptibles d'agir au niveau du génome des poissons en entraînant l'activation d'une enzyme qui détruit les amines aromatiques (Rodriguez-Ariza et coll., 1995).

IV. Facteurs de la variabilité de la composition biochimique

Les paramètres biochimiques évoqués aux paragraphes précédents sont susceptibles de varier parfois de manière importante. La composition des poissons varie suivant les espèces, les aspects, la physiologie (âge, cycle sexuel, saisons), l'environnement et leur alimentation (Sainclivier, 1983).

Des divergences de composition lipidique et protéique importantes existent entre des poissons d'espèces différentes qui ont des alimentations variées, mais également dans une même espèce si les aliments sont différents. Chez le maquereau, on observe à la même période de pêche des taux variables de lipides dans les muscles : certains poissons contiennent de 62,7% d'eau et 16,4 % de lipides alors que d'autres contiennent 78,6 % d'eau et 2,2 % de lipides (Jacquot, 1961).

Les poissons qui vivent dans des eaux froides (5-10°C) accumulent plus d'acides gras insaturés à longues chaînes que ceux des mers chaudes (Dey et coll., 1993).

Goldspink (1995) a observé des variations d'expression génétique en fonction de la température de l'eau pour une protéine contractile (myosine) et une enzyme nécessaire à la contraction musculaire (ATPase myofibrillaire).

L'âge peut jouer un rôle : les plus vieux poissons d'une espèce donnée présentent généralement une surcharge graisseuse plus importante que les autres.

La teneur en protéine et en lipide de la chair va varier en fonction du cycle sexuel de chaque espèce.

Les lipides sont généralement utilisés comme réserve d'énergie pendant les périodes de jeûne et plus particulièrement pendant les périodes de reproduction.

Remarque : nous n'avons pas abordé les phycotoxines qui peuvent engendrer des intoxications alimentaires.

C. Introduction à l'altération du poisson

Nous l'avons vu, le poisson vivant a des moyens naturels de protection contre les bactéries. La barrière intestinale, le mucus, la peau mais aussi des anticorps en circulation constante dans le corps arrivent à maintenir une sorte d'équilibre dans l'organisme sain.

L'altération, qui commence dès la mort, est un processus complexe, mettant en jeu des phénomènes physiques, chimiques et bactériologiques.

Les tissus musculaires sont le siège de processus de dégradation particulièrement rapides du fait de l'action d'enzymes endogènes et de bactéries. Ces dernières, présentes en très grand nombre sur la peau et dans l'intestin, se répandent et se multiplient dans les autres tissus où le pH et l'hydratation sont beaucoup plus élevés et où l'abondance de substrats de faible poids moléculaire (acides aminés, amines) crée un milieu favorable à leur prolifération. Ces petites molécules donnent lieu à l'apparition de composés volatils malodorants. Par ailleurs, les protéases bactériennes et les protéases tissulaires provoquent un ramollissement rapide du muscle ; en même temps, la diffusion des hémoprotéines modifie la couleur de la chair, les lipides s'hydrolysent et les acides gras s'oxydent.

D. Évolution de la flore

I. La flore de contamination

Dans son milieu naturel, le poisson respire et se nourrit, les bactéries de l'eau sont adsorbées par le mucus de la peau, par les branchies et par le tractus digestif (la cavité abdominale). Elles fournissent la première flore de contamination.

Dans le premier stade de l'altération, on observe une prolifération bactérienne sur la peau, le mucus, et dans les intestins. Dans un deuxième temps, on assiste à la contamination bactérienne de la chair qui ne se fait pas de manière uniforme. Il est habituellement admis que les bactéries pénètrent :

- par les branchies et poursuivent par le système vasculaire (principalement par la veine caudale),
- par les intestins dans la cavité abdominale et ses membranes (péritoine),
- par la peau et de là après quelques jours passent dans la chair (Sainclivier, 1983).

Ces processus sont facilités par les enzymes tissulaires et les enzymes digestives naturelles (Jay, 1970).

L'évolution de la flore de contamination de la chair (matière première) dépend dans un premier temps de la température de conservation, que nous sommes obligés de prendre en considération immédiatement.

Le poisson est généralement conservé par le froid (sens large) avant toute transformation commerciale, par contre, dans les régions chaudes (des pays en voie de développement) le poisson est souvent laissé à l'air, ce qui entraîne une évolution différente de la flore de contamination.

En général, une chute de température provoque une prolongation de la phase de latence des différentes bactéries, et l'élimination progressive de certains germes. A une température de 5°C, les mésophiles se développent moins bien, puis si la température est encore diminuée, certains psychrophiles et psychrotrophes cessent de se développer (Bedford, 1933 ; Soudan et coll., 1965).

Après une phase de latence de conservation sous glace des poissons de mers froides, de mers chaudes ou d'eaux douces (Shewan, 1977 ; Herbert et coll., 1975), les bactéries psychrophiles et psychrotrophes à Gram négatif (80 % de la flore d'après Barile et coll. 1985 et Gorczyka et coll., 1985) dominées par le genre *Pseudomonas* (tableau 11) se développent sur la peau de façon exponentielle (tableau 12), pour atteindre des populations de 10^7 à 10^8 germes/ cm² de peau après 8-10 jours à 0°C (Shewan 1971; 1977 ; Horie et coll., 1972 ; Simmonds et Lamprescht, 1980). Cette évolution est d'autant plus rapide que la température de conservation est plus élevée.

Tableau 11. Evolution de la flore de la peau de morue (*Gadus morhua*) conservé dans la glace pilée (Hobbs, 1983).

Jours de stockage	% de bactéries			
	0	5	10	15
<i>Pseudomonas/Alteromonas</i>	26	33	84	82
<i>Moraxella/Acinetobacter</i>	33	26	7	13
<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	0	8	0	0
<i>Corynebacterium</i>	25	12	8	3
<i>Micrococcus</i>	14	21	0	0
Non identifiés	2	0	1	2

Tableau 12. : Évolution de la flore totale du merlu (*Cape Hake*) conservé à 0°C sous glace et à 5°C. (Simmonds et Lamprescht, 1980).

Stockage sous glace 0°C		
Jours d'altération	(log) flore totale de la peau	(log) flore totale de la chair
0	4,69	4,34
4	6,39	5,31
7	7,10	6,71
11	7,14	6,97
14	7,64	7,30
Stockage à 5°C		
0	4,56	4,33
1	5,04	4,78
3	6,29	5,46
6	7,82	7,07

On retrouve dans la chair des proportions identiques (de 60 à 90%) de *Pseudomonas* au bout de 12 jours d'altération, avec une prédominance des *Pseudomonas* du groupe III-IV (Spencer, 1961 ; Shewan, 1971 ; Skovgaard, 1979 ; Hobbs et Hodgkiss, 1982; Lannelongue et coll., 1982).

La conservation par le froid des poissons tropicaux aurait pour conséquence d'accroître la durée de conservation de ces espèces par rapport à celles des eaux froides contenant, dès le début de la conservation plus de psychrophiles (Cann, 1977 ; Shewan, 1977 ; Sumner et coll., 1984).

Les poissons des régions tropicales stockés à des températures supérieures à 5°C sont caractérisés par une flore bactérienne mésophile (Gorczyka et coll., 1985).

La flore intestinale évolue de la même façon que la flore de la peau mais elle contient plus de bactéries anaérobies strictes telles que *Clostridium* qui sont très faiblement représentées dans la chair même après une altération de plusieurs jours (Crepey, 1972 ; Liston, 1980).

II. La flore d'altération

1. Introduction

Il apparaît dans les travaux de Van Spreekens (1974) et de Herborg et Villadsen (1975) que la flore d'altération provient en début de conservation du poisson, de la flore intestinale, puis de la flore de surface qui pénètre au travers de la peau dans les derniers stades d'altération du poisson.

Pour d'autres auteurs, l'activité bactérienne est essentiellement localisée sur la peau ; les bactéries n'envahissent la chair que dans les stades avancés de l'altération (Murray cité par Shewan, 1977). Dans le cas des filets, la pénétration est plus rapide, mais l'essentiel de l'activité bactérienne est aussi détecté en surface (Liston, 1980).

L'activité hydrolytique bactérienne est généralement proportionnelle à la croissance, mais il est également possible qu'une activité bactérienne ait lieu sans multiplication des cellules (phase stationnaire).

Initialement, les bactéries d'altération, c'est-à-dire capables de produire les odeurs et saveurs caractéristiques de produits altérés, ne constituent qu'une très faible proportion de la flore de contamination (moins de 10 %) (Adams et coll., 1964). La flore d'altération des sucres est très peu étudiée car ce substrat disparaît très rapidement et est utilisable par toutes ces bactéries.

2. Les bactéries dégradant les substances azotées

2.1. Les protéines et acides aminés libres

Toutes les bactéries possèdent des protéinases endocellulaires.

Les principales bactéries impliquées dans la dégradation des substances azotées protéiques de poisson sont *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Sarcina sp.*, *Proteus sp.*, *Bacillus sp.* (Eskin et coll., 1971 ; Ryser et coll., 1984).

Pendant la contamination bactérienne, il y a une modification considérable des aminoacides produits. La protéolyse bactérienne est réduite pendant la première phase de l'altération car les bactéries utilisent les acides aminés libres, mais elle augmente ensuite rapidement en raison de la disparition des ces petites molécules (Spinelli, 1971).

La réaction de conversion des polypeptides en peptides est catalysée par les peptidases.

La dégradation microbienne des acides aminés est effectuée soit par réaction de décarboxylation, soit par réaction de désamination. Ces réactions enzymatiques sont très importantes dans la dégradation du poisson (Ritchie et Mackie, 1980). Nous pouvons citer par exemple l'action de l'histidine-décarboxylase qui dégrade l'histidine en histamine.

Parmi les bactéries responsables de la production d'histamine on trouve *Pseudomonas fluorescens*, *Morganella morganii* (anciennement *Proteus morganii*), *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, et certains lactobacilles (Rice et Koehler, 1976 ; Joosten et Northolt, 1989 ; Lopez-Sabater et coll., 1994 ; Roig-Sagues et coll., 1996).

Le catabolisme des amines biogènes est réalisé par *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Clostridium* et *Klebsiella* (Bourgeois et Coll., 1988).

La dégradation des acides aminés soufrés est essentiellement due à des *Pseudomonas* des groupes III et IV (*Shewanella putrefaciens*) occasionnellement par *P. fluorescens* et *P. fragi* (Herbert, 1975 ; Lee et coll., 1977 ; Van Landschoot et De Ley, 1983 ; Mac Donell et Colwell, 1985) sans oublier certains *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Clostridium* et *Proteus*.

La flore H₂S est une flore caractéristique de la flore d'altération du poisson. La flore H₂S augmente au cours de l'altération du poisson. Un taux supérieur à 10⁶ germes/g soit plus

de 40% de la flore totale est le signal d'une altération avancée (Liston, 1980 ; Gillespie (1975) cité par Liston, 1982).

Shewanella putrefaciens représente fréquemment l'élément majeur de la flore H₂S (Mac Meekin et coll., 1982 ; Bremner et Statham, 1983 ; Stenström, 1985 ; Gram et coll., 1987).

Cette bactérie, hormis sa capacité à produire de l'H₂S, est capable de produire du méthyl-mercaptan, des diméthyl di et tri-sulfure, ces composés entraînent l'apparition d'odeurs de type sulfhydryle qui influencent directement l'évaluation organoleptique du poisson (Herbert et coll., 1975).

2.2. Les triméthylamines

La réduction de l'OTMA est principalement provoquée par des bactéries aérobies-anaérobies facultatives, notamment à Gram négatifs, oxydases positives, psychrotrophes et psychrophiles (Beatty et Gibbons, 1937). De nombreux travaux démontrent que la majeure partie de la flore de contamination est capable de produire de la TMA : *Acinetobacter*, *Pseudomonas* de type I et II, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus sp.*, *Coryneform* et *Micrococci* (Watson, 1939 ; Lerke et coll., 1965 ; Unemoto et coll., 1965 ; Laycock et Regier, 1971 ; Babitt et coll., 1972 ; Yamamoto et Ishimoto, 1977 ; Strom et coll., 1979 ; Takagi et coll., 1981 ; Stenberg et coll., 1984 ; Ringo et coll., 1984). En second plan viennent les Entérobactéries : *Proteus*, *Escherichia coli*, dont certains pathogènes : *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, ... (Wood et Baird, 1943 ; Kim et Chang, 1974) et quelques Flavobactéries (Barett et Kwan, 1985).

L'OTMA est réduit en TMA par l'OTMA réductase bactérienne en anaérobiose ou micro-aérobiose. Il peut également être réduit en DMA et entraîne la formation de formol (Mackie et Thomson, 1974 ; Sotelo et coll., 1995). L'OTMA réductase est située sur la membrane des sphéropastes chez *Vibrio parahaemolyticus* (Unemoto et coll., 1965). C'est une molybdoprotéine (Yamamoto et coll., 1986).

Les transporteurs de protons permettant la réduction de l'OTMA sont de natures différentes :

- le NADPH chez *Vibrio parahaemolyticus* (Unemoto et coll., 1965),
- le NADH H⁺ chez *Escherichia coli* (Takagi et coll., 1981),
- un système d'antiport Na⁺-H⁺ chez *Shewanella putrefaciens* (Stenberg et coll., 1984).

Les transporteurs d'électrons pour la réduction de l'OTMA sont des cytochromes de types b et c (Sakagushi et Kawai., 1978 ; Ishimoto et Shimokawa, 1978; Takagi et coll., 1981 ; Stenberg et coll., 1984). Ce transport est activé par un co-facteur présent dans l'extrait de levure : le molybdate (comme pour la nitrate réductase) (Takagi et coll., 1981 ; Silvestro et coll., 1986).

Il y aurait un phénomène chimiosmotique ; un flot d'électrons au travers d'une chaîne respiratoire accompagné d'un transport électrogénique de protons qui génère un potentiel membranaire et entraîne une extrusion de protons. L'OTMA exerce donc une action d'équilibre du potentiel d'oxydoréduction (Castell, 1950).

Le nitrate (NO_3^-), le nitrite (NO_2^-), ou l'oxyde nitreux (N_2O), le thiosulfate et le tétrathionate jouent ce rôle d'accepteur de proton et de donneur d'électrons pour les Entérobactéries, *Micrococcus dénitrifiants* et certains *Pseudomonas...* (Forget et Pichinoty 1965 ; Ye et coll., 1995).

2.3. Les dérivés nucléotidiques

Nous disposons de peu de renseignements sur les bactéries capables de dégrader les nucléotides, mais la base énergétique de toutes les bactéries d'altération rencontrées est l'ATP (Ward et coll., 1986 ; Rossero et coll., 1987). Elles disposent donc toutes des systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des nucléotides (Streitfeld et coll., 1962 ; Smith et coll., 1969). Ceci a été confirmé par les travaux de Van Spreekens (1977) qui a démontré que toutes les souches psychrotrophes et psychrophiles qu'elle avait isolé étaient capables de dégrader les nucléotides (ADN, ATP...). Il en est de même pour *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Serratia marcescens* qui secrètent une désoxyribonucléase (Streitfeld et coll., 1962 ; Smith et coll., 1969).

3. Les bactéries dégradant les lipides

Nous disposons de peu de renseignements. Les *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*), *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Micrococcus* et des Entérobactéries (Oteng-Gyang, 1984 ; Mountney et Gould, 1988) produisent des lipases qui hydrolysent des lipides dont les acides gras sont à chaînes courtes.

E. Les enzymes tissulaires

Les changements enzymatiques *post-mortem*, dus aux enzymes tissulaires et digestives (tractus digestif), aboutissent à la formation d'un grand nombre de molécules de faible poids moléculaire qui, avec les autres composés extractibles de la chair, constituent les premiers substrats de la croissance bactérienne : inosine, ribose, lactate, créatine, urée, ansérine, carbosine, acides aminés libres et l'OTMA ... (Shewan, 1976).

I. Les enzymes dégradant les substances azotées

L'auto-décomposition est le fait de protéases intracellulaires comme les cathepsines (Sainclivier, 1983).

L'activité cathepsique peut être plus ou moins lente pour les poissons à mouvements lents (carpe, gardon, morue), rapide et plus complète pour les poissons à mouvements rapides (maquereau, albacore, bonite, espadon).

Il existe aussi une activité dipeptidasique qui entraîne une augmentation d'acides aminés. L'ansérinase qui hydrolyse l'ansérine en ses constituants : la 1-méthylhistidine et la β alanine ont été isolées du muscle de morue (Sainclivier, 1983).

Une activité protéolytique du tissu musculaire de morue (*Gadus morhua*) et de hareng (*Clupea harengus*) a été démontrée sur de l'hémoglobine, de la caséine et des protéines myofibrillaires (Stoknes et coll., 1993).

Les Gadidés possèdent généralement dans les muscles des enzymes responsables de la réduction de l'OTMA en DMA et formol (Kawabata, 1953 ; Soudan et coll., 1965 ; Castell et coll., 1973 ; Makie et Thomson, 1974 ; Agustsson et Strom, 1981).

Une fois la mort survenue, on observe une baisse rapide de la quantité d'ATP (adénosine triphosphate) (phénomène de *rigor-mortis*). La rigidité cadavérique apparaît très rapidement : en moins de 6h à 0°C alors qu'il faut plusieurs jours à 0°C pour la viande (Cheftel et Cheftel, 1984). Ceci s'explique notamment par les conditions de capture, où l'activité musculaire et l'asphyxie réduisent le stock de glycogène. La rigidité cadavérique résulte du mauvais rendement de la glycogénolyse déclenchée par le Ca^{++} , de l'épuisement de la phosphocréatine, de l'arrêt de la réaction de Lohman (régénération de l'ATP grâce à ADP (adénosine diphosphate) et le Ca^{++}) et de l'activation de la myosine ATPase par le Ca^{++} .

On a alors formation de liaisons entre l'actine et la myosine installant la rigidité cadavérique qui est quant à elle définitivement installée lorsque le taux d'ATP atteint 20% du taux initial (Jouve et coll., 1991). Ce taux ne cessera de diminuer jusqu'à atteindre un taux proche de 0 %.

II. Les enzymes dégradant les lipides

La lipolyse semble, le plus souvent, indépendante de l'altération bactérienne, elle est essentiellement due aux lipases tissulaires du poisson (phospholipases) (Sainclivier, 1983). La lipolyse est dépendante du pH, de la température, des ions Ca^{++} dont on sait qu'ils agissent, au moins partiellement, en éliminant les acides gras sous forme de savons de calcium insolubles.

L'activité lipolytique tissulaire des poissons varie avec les espèces. Toutes contiennent des phospholipides sujets à la lipolyse, mais chez certains Sélaciens les phospholipides sont remarquablement stables. En outre, seuls les esters de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine sont hydrolysés, ceux de la sérine et de l'inositol le sont moins. Les tissus contenant des triglycérides sont, certes, le plus souvent sujets à l'hydrolyse, mais cela semble moins courant que pour la phospholipolyse (Cheftel et Cheftel, 1984).

III. Les enzymes dégradant les glucides

Dans le chalut, le poisson se débat généralement beaucoup ce qui a pour conséquence de réduire les réserves de glycogène (glycolyse) et de rendre la *rigor-mortis* plus précoce (<24h), moins intense et moins longue que pour un poisson pêché à la ligne.

La diminution du pH *post mortem* dans la chair de poisson dépend de la quantité d'acide lactique formé par la dégradation du glycogène, bien qu'il n'y ait pas toujours corrélation entre abaissement du taux de glycogène et production d'acide lactique (Ikeda, 1980).

F. Les enzymes digestives

Le tube digestif contient toutes les enzymes nécessaires à la dégradation des aliments, en conséquence il y règne une activité enzymatique très importante.

Ces enzymes digestives entraînent parfois un phénomène rapide d'éclatement de la partie abdominale et une lyse des muscles adjacents par la pepsine, la cathepsine, la trypsine (Sainclivier, 1983).

G. Oxydation des acides gras

Le rancissement des poissons provient principalement de l'oxydation (β oxydation) des acides gras non saturés, libres. Ils s'oxydent en général plus vite que lorsqu'ils font partie de molécules de triglycérides ou de phospholipides.

Les réactions d'oxydation des lipides entraînent la formation de composés volatils d'odeur désagréable, ce qui influence la qualité organoleptique du poisson.

H. Facteurs influençant l'altération

Au cours des transformations industrielles, la contamination de la chair de poisson va se diversifier, entraînant une formation de flore différente. Les opérations technologiques vont conduire à des modifications des caractéristiques physico-chimiques du produit, ce qui provoquera des phénomènes de sélection et de dominance de certains genres bactériens (qui ont déjà été évoqués).

I. Les facteurs naturels

Sans revenir dans le détail, la flore initiale de contamination dépend de la zone de pêche du poisson, de son alimentation, de la saison de pêche.

Les poissons pêchés dans les eaux non polluées, ne portent que très rarement des bactéries pathogènes pour l'homme, hormis *Clostridium botulinum* et *Vibrio parahaemolyticus*, qui sont des contaminants naturels du poisson (Liston, 1980).

La saison influe sur la nature de la flore : les bactéries ayant une activité protéolytique sont plus abondantes en hiver. Les variations saisonnières de température entraînent des

dénombrements différents entre *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, en plus ou moins grande conformité avec les températures optimales de croissance de chaque espèce (Shewan, 1961).

II. Les manipulations

1. La pêche

La détérioration enzymatique et la pénétration bactérienne sont souvent plus élevées si les poissons pêchés sont en mauvais état, écrasés, tissus déchirés (pêche au chalut).

La vitesse de détérioration dépend aussi du passé *ante mortem* du poisson : il apparaît que la chair s'altère plus vite lorsque le poisson est épuisé.

2. Le traitement après la pêche

Le temps nécessaire pour arriver au port (1 à 15 jours) influence le développement microbien qui peut être accentué par une exposition prolongée au soleil (ceci est souvent le cas dans les pays non industrialisés).

L'éviscération est souvent utilisée pour réduire l'autolyse (liquéfaction de la cavité abdominale) mais aussi éliminer une source de contamination (Shewan, 1962 ; Scott et coll., 1986). Lorsque l'éviscération est effectuée dans de bonnes conditions d'hygiène, il est possible de réduire la charge microbienne d'environ 80 à 90 % (Georgala (1957) cité par Shewan, 1961). Evidemment, si le travail est effectué dans de mauvaises conditions d'hygiène, il est alors possible d'augmenter cette charge.

Castell (1954) (cité par shewan, 1961) a montré que 80 à 90 % de la contamination des filets est issue des plans de travail. Quantitativement, la flore des filets reflète celle des surfaces de travail ; on note une incidence plus grande des bactéries mésophiles, liées à la contamination d'origine humaine (*Coliformes*, *Enterocoques*, *Staphylocoques*). A ce stade, les mésophiles représentent de 1 à 28 % de la flore ; contre 0 à 5 % seulement sur le poisson entier frais (Shewan, 1962).

3. L'eau utilisée

L'eau est utilisée pour de multiples usages : lavage, douchage, nettoyage, conservation (glace)... Elle se doit d'être de bonne qualité microbiologique, ce qui n'est pas toujours le cas, elle peut alors provoquer des contaminations après la pêche.

L'eau pour le lavage influence la flore des poissons : s'ils sont lavés à l'eau de mer, les bactéries dominantes sont les *Pseudomonas*, s'il s'agit d'eau douce ce sont les bactéries du genre *Achromobacter* qui sont dominantes.

Il arrive parfois que la glace utilisée pour conserver le poisson soit fortement contaminée (Shewan, 1961). Dans ce cas, les bactéries de la glace se retrouvent dans un premier temps sur le poisson puis dans la chair (Huss et Asenjo, 1976; Bilinski et coll., 1983).

III. Les conditions de conservation

Les méthodes générales de conservation des poissons visent à empêcher ou retarder les principaux types de détérioration, microbienne ou enzymatique.

1. Le traitement par le froid

Le froid est utilisé pour ralentir ou arrêter totalement les réactions enzymatiques. D'autre part, il a une action sur la croissance des microorganismes. Leur plus ou moins grande résistance au froid dépend des bactéries et de leur état physiologique (les spores résistent plus facilement), de la température et du temps de stockage, de la matière première.

La réfrigération est effectuée généralement à des températures variant de 0 à 2°C. L'activité enzymatique des produits réfrigérés n'est que ralentie, et souvent la croissance des bactéries psychrophiles peut s'effectuer au ralenti. Il s'ensuit une durée de stockage courte, parfois de quelques jours seulement.

La congélation : ce terme est utilisé pour les produits qui sont stockés généralement à des températures inférieures à -10°C. Cette transformation physique de la nature de l'eau réduit la quantité d'eau disponible pour les bactéries. Il y a donc manque d'eau accessible par

les bactéries, augmentation de concentration des sels minéraux. Un tel milieu rend difficile la prolifération des bactéries.

La congélation entraîne également la formation de cristaux de glace de tailles différentes dans les cellules du produit selon la vitesse de congélation. Il peut donc y avoir rupture des membranes cellulaires par la présence de cristaux formés en cas de congélation lente, ce qui provoque l'extrusion du contenu cellulaire. La congélation entraîne également une déshydratation des protéines (Sotelo et coll., 1995). La qualité organoleptique en dépend.

La surgélation est actuellement de plus en plus utilisée. La température de traitement est inférieure à -18°C. (transporté, et conservé au moins à -18°C).

2. La chaleur

Elle est utilisée pour la mise en conserve des poissons.

L'effet de la chaleur sur les bactéries est fonction de la température, du temps de traitement mais également de la contamination initiale.

Plus un poisson est altéré plus les produits de dégradation augmentent au cours de la stérilisation (Sainclivier, 1988).

L'altération des constituants azotés par la chaleur se traduit par une augmentation de la teneur en azote basique volatil (l'OTMA est décomposé en TMA, DMA (diméthylamine) et formol (Horst, 1984)), une diminution de la solubilité des protéines, une modification partielle de la structure des protéines (dénaturation), une destruction de certains aminoacides (cystine, cystéine...) avec libération d'H₂S, de diméthylsulfure et d'acide cystéique (Herbert et coll., 1975).

Les protéines se coagulent et se dénaturent irréversiblement lorsqu'un traitement thermique est appliqué : à 45°C les protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires se dénaturent. Les enzymes, également, sont altérées ou inactivées.

L'altération des lipides par voie thermique conduit à la formation d'hydroperoxydes, époxydes, hydroxydes, cétones, acides gras libres...

L'altération des sucres est à l'origine de modifications de couleur dues à la réaction de Maillard, on a une caramélisation (cuisson excessive) ...

3. Les agents chimiques de conservation

Les agents chimiques de conservation sont des produits bactéricides ou bactériostatiques, actifs à des doses relativement faibles. Ces produits servent à retarder, à empêcher ou à masquer les activités bactériennes ou enzymatiques. Peu sont admis en France.

Le **chlorure de sodium** est, depuis bien longtemps, un des principaux conservateurs utilisés pour le poisson. Le chlorure de sodium a des propriétés qui permettent son emploi en conserverie car il favorise :

- la formation d'ions chlore très toxiques pour les bactéries,
- la réduction de la solubilité de l'oxygène,
- la sensibilisation des bactéries au CO₂,
- la diminution de l'activité de l'eau (Aw) du produit,
- l'augmentation de la pression osmotique entraînant un effet de plasmolyse sur les bactéries,
- la réduction de l'action des enzymes protéolytiques et lipolytiques.

Mais, dans la saumure des bactéries halophiles aérobies, anaérobies facultatives et anaérobies strictes sont capables de se développer sur la chair.

Aux concentrations faibles, le sel peut accélérer la croissance de certaines bactéries (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* et des genres *Micrococcus*, *Sarcina* et quelques *Coryneformes*). La présence de calcium et magnésium dans les sels peut favoriser le développement de certaines de ces bactéries halophiles (Hess, 1942).

Les graisses entraînent la diminution de la pénétration du sel (Govindan, 1969 ; Sainclivier, 1985). Les produits sont de moins en moins salés ce qui favorise leur commercialisation (meilleur goût et saveur) mais restreint leur durée de conservation.

La **fumée** de bois permet à la fois de donner un bon goût à la chair et de conserver le poisson.

La fumée de bois contient un grand nombre de composés volatils. Le formol est un bactéricide efficace que l'on trouve dans la fumée mais il y a aussi des phénols et des crésols ainsi que d'autres composés : acides organiques à chaînes linéaires (C₁ à C₈), alcools primaires ou secondaires, cétones, aldéhydes comme l'acétaldéhyde, cires, résines, isomères

méthyl- et propyl- de gaïacol, catéchol, catéchols méthylés, pyrogallol et son ester méthylé, sont tous groupés sous le nom d'acide pyroligneux (Sainclivier, 1985).

L'action germicide de la fumée de bois varie en fonction de la température de combustion, du type de bois, et de la concentration de la fumée mais également de la qualité de la matière première (poisson).

Le fumage peut se réaliser à froid, ce procédé peut détruire une charge bactérienne assez élevée sur le poisson : pour les églefins et les kippers (harengs ouverts, salés et fumés) le pourcentage de destruction des bactéries est, pour une même densité de fumée d'environ 75 à 100 % à 20°C et 25 à 70 % à 37°C (Shewan, 1961). Le poisson est ensuite séché.

Le fumage à chaud, implique l'utilisation de fours et la chair des poissons atteint 65 à 75°C pendant 30 min et perd 15 à 30 % d'eau. En dehors d'une dénaturation partielle des protéines due à la chaleur et d'une C-nitrosation des phénols (Gilbert et Knowles, 1975 ; Knowles, 1975), l'action chimique intéressante a surtout un effet antioxydant dû aux phénols sur les lipides du poisson ; ils inhibent la phase de propagation de l'auto-oxydation (Sainclivier, 1985). La chaleur produite permet de former une croûte à la surface du produit, et ceci empêche en partie l'entrée des micro-organismes.

Les **nitrites** et **nitrate de sodium** sont interdits en France car ils sont précurseurs de nitrosamines. Ces nitrosamines sont des produits cancérigènes pouvant se former dans la chair des poissons en présence de nitrite (Sen et coll., 1970).

Des travaux ont montré que les nitrites empêchent la réduction de l'OTMA en TMA car ils sont réduits préférentiellement, même s'il y a une multiplication bactérienne. Beaucoup de bactéries à Gram négatif ou positif (*Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter...*) peuvent utiliser des sources inorganiques de N-oxides comme accepteurs d'électron pour leur respiration dans des conditions de microaérobiose ou d'anaérobiose (Kikuchi et Ishimoto, 1980 ; Uden et coll., 1990 ; Kalkowski et Conrad, 1991 ; Zumft, 1993 ; Ye et coll., 1994 ; Ye et coll., 1995).

L'**acide benzoïque** empêche la formation de triméthylamine sur les poissons et maintient le goût et l'odeur des poissons (Fellers et Harvey, 1940). Il n'est pas accepté en France.

L'**acide sorbique** est utilisé dans certains pays européens, pour la stabilisation de la salade de thon stockée au froid. Il est métabolisé comme des acides gras, pour donner du CO₂ et H₂O (Melnick et coll., 1954).

L'**acide propionique** utilisé sur les papiers d'emballage des poissons fumés. Il détruit la membrane cellulaire des bactéries (interdit en France).

L'**acide borique** est utilisé à la surface des poissons salés-séchés en Europe (interdit en France).

4. Les atmosphères modifiées

Elles suscitent actuellement beaucoup d'intérêt. Cette technique de conservation est fondée sur l'élimination d'une part, des bactéries de contamination et d'altération dominées par des bactéries aérobies et d'autre part, la diminution de l'oxydation les lipides des poissons.

Cette technique ne supprime pas la charge bactérienne, elle entraîne un changement de flore : une diminution de la flore psychrotrophe et psychrophile aérobie (Stammen et coll., 1990 ; Huang et coll., 1992).

Après 6 jours de conservation de filets de morues sous atmosphère modifiée à 2°C initialement contaminées par des *Flavobacterium*, *Shewanella putrefaciens*, des *Pseudomonas* et *Moraxella* on trouve majoritairement *Shewanella putrefaciens* (62 %) et des *Pseudomonas* non fluorescents et après 26 jours de conservation on ne trouve plus que des *Lactobacillus sp.* et *Shewanella putrefaciens* (Stenström, 1985). Ceci est également valable pour les poissons fumés conservés sous vide (dominance de Lactobacilles) (Magnusson et Traustadottir, 1982).

Une atmosphère composée de 80% de CO₂ et 20 % d'air entraîne une diminution significative du taux de TMA, du taux d'acides gras libres et du pH en surface (Parkin et coll., 1981 ; Beltran et Moral, 1990) mais cela n'a aucun effet sur le ralentissement de la dégradation de l'ATP ni sur la production d'amines biogènes par *Lactobacillus sp.* (Boyle et coll., 1991; Leisner et coll., 1994 ; Krizek et coll., 1995).

L'oxydation des lipides est moins rapide sous atmosphère modifiée (avec azote) mais la diminution des phospholipides et l'augmentation des acides gras libres sont identiques aux conservations sous air (Koizumi et coll., 1990).

5. Autres méthodes de conservation

Les antibiotiques :

L'emploi des antibiotiques en alimentation est limité car certains inconvénients sont souvent associés à l'utilisation générale de ces produits : allergies, développement de bactéries résistantes aux antibiotiques, développement de levures et de champignons, produits de dégradation mal connus. Ils sont interdits en France.

L'irradiation :

Les radiations peuvent être naturelles (provenant du soleil), ou artificielles (produites par l'électricité, interdit en France). Il est impossible de distinguer deux types de radiations : non-ionisantes et ionisantes.

Les radiations non-ionisantes provoquent des excitations des molécules mais ne produisent aucune ionisation de ces molécules. Les radiations non-ionisantes comprennent les rayonnements ultra-violet, les micro-ondes, les ondes radio et la lumière visible.

Les radiations ionisantes provoquent l'ionisation des molécules qui les absorbent. Ces radiations sont associées à des énergies élevées. Les rayons X, les rayons gamma (γ), les particules alpha (α) et les neutrons sont classés en deux catégories : radiations corpusculaires et radiations électromagnétiques.

IV. L'activité de l'eau (A_w)

L' A_w mesure la disponibilité de l'eau dans un milieu. En abaissant l' A_w ($<0,8$) d'un produit on réduit le taux de croissance bactérien (Sainclivier, 1985).

Au cours de la conservation, l'eau est rendue moins accessible aux micro-organismes (fumage, salage, irradiation...), l'activité de l'eau (A_w) est réduite, l'accès de l'oxygène est plus facile et sa diffusion est améliorée, en conséquence l'oxydation des acides gras progresse plus vite (Sainclivier, 1985).

I. Évolutions biochimiques

I. Le pH

Lorsque le poisson meurt son pH est légèrement alcalin (7,05-7,25) sauf s'il s'épuise pendant la capture. Le pH descend dans l'heure qui suit entre 6,5-6,8 (Soudan et coll., 1965). Cette acidification est liée à la dégradation des sucres, mais la réduction des sources azotées (OTMA) fait revenir le pH à la neutralité, on assiste à une sorte d'équilibre. Ce pH proche de 7 favorise le développement bactérien et augmente l'activité enzymatique. Un pH moyen supérieur à 7,5 indique pour la plupart des espèces (exception : le saumon du Pacifique le pH reste à 6,2) qu'un poisson est prêt à devenir inconsommable (Soudan et coll., 1965). Mais les variations sont telles que son exploitation n'est pas généralisée pour suivre l'altération d'un poisson.

II. Le potentiel d'oxydoréduction

Suite à la mort du poisson le potentiel d'oxydo-réduction passe de +250 mV à -130 mV. Ceci résulte de la raréfaction en oxygène dissous du milieu et de son enrichissement en substances réductrices. La prolifération de bactéries aérobies et l'oxydation des lipides entraînent une baisse encore plus importante du potentiel d'oxydo-réduction (-250 mV) (Sainclivier, 1983). L'altération du poisson avançant, il y a production d'amine tertiaire (TMA) qui entraîne l'augmentation du potentiel d'oxydo-réduction pour revenir à sa position initiale (Castell, 1950).

III. Les substances azotées

1. Les protéines et acides aminés libres

L'hydrolyse des protéines donne naissance à des produits d'odeur putride qui augmentent pendant l'altération du poisson. Parmi ces produits d'hydrolyse on rencontre des molécules sans groupements aminés : l'hydrogène sulfuré (H₂S) (Len, 1987; Hobbs et Hodgkiss, 1982), les disulfides (Guth et coll., 1995), les mercaptans (Herbert et coll., 1975), l'ammoniac. Les produits d'hydrolyse peuvent également contenir des produits aminés : les amines biogènes (Ritchie et Mackie, 1980 ; Karmas, 1981) : histamine, tyramine, putrescine, cadavérine, spermine, spermidine, tryptamine (Hollingworth et coll., 1990).

Sur le plan organoleptique, les composés les plus importants sont les composés sulfurés volatils : sulfure d'hydrogène (H₂S), diméthyl sulfure ((CH₃)₂S), méthyl mercaptan (CH₃SH), produits à partir des acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) présents dans les protéines (Deckert, 1961 ; Shewan, 1976 ; Liston, 1980 ; Len, 1987). Les seuils d'apparition des odeurs sulfurées sont très faibles : 40 ppb pour H₂S, 0,5 ppb pour (CH₃)₂S, et 0,05 ppb pour CH₃SH (Herbert et coll., 1975 ; Shewan, 1977).

D'une façon générale, les amines biogènes sont définies comme des molécules biologiquement actives sur le système nerveux central et sur le système vasculaire. Dans le domaine alimentaire, le terme amines biogènes est surtout utilisé pour désigner les amines non volatiles.

L'ingestion de ces amines peut entraîner des symptômes voisins de ceux d'une intoxication microbienne. Ces amines peuvent également contribuer à la formation de nitrosamines, dans les produits de la salaison par exemple (Gennaro et coll., 1988).

Les amines biogènes ont pour origine les acides aminés (par décarboxylation) provenant de la dégradation des protéines :

- Tryptophane	→	Tryptamine		
- Tyrosine	→	Tyramine		
- Acide glutamique	→	γ-semi-aldéhyde glutamique	→	Ornithine
- Méthionine	→	Ornithine		
- Arginine	→	Citruline	→	Ornithine
- Arginine	→	Agmatine	→	Putrescine → Spermidine → Spermine
- Lysine	→	Cadavérine	→	Putrescine
- Histidine	→	Histamine		

La composition en acides aminés change donc en fonction de l'altération (Klausen et Lund, 1986).

Il existe trois types d'amines biogènes : les amines aliphatiques (putrescine, cadavérine, spermidine et spermine), les amines aromatiques (tryptamine, tyramine) et une amine hétérocyclique (l'histamine).

Les amines biogènes augmentent en fonction de l'altération (Mietz et Karmas, 1977; 1978). Elles traduisent un état de contamination bactérienne avancée (Gouygou et Coll., 1989).

Ces amines peuvent également servir de précurseurs à d'autres amines (quelques exemples) :

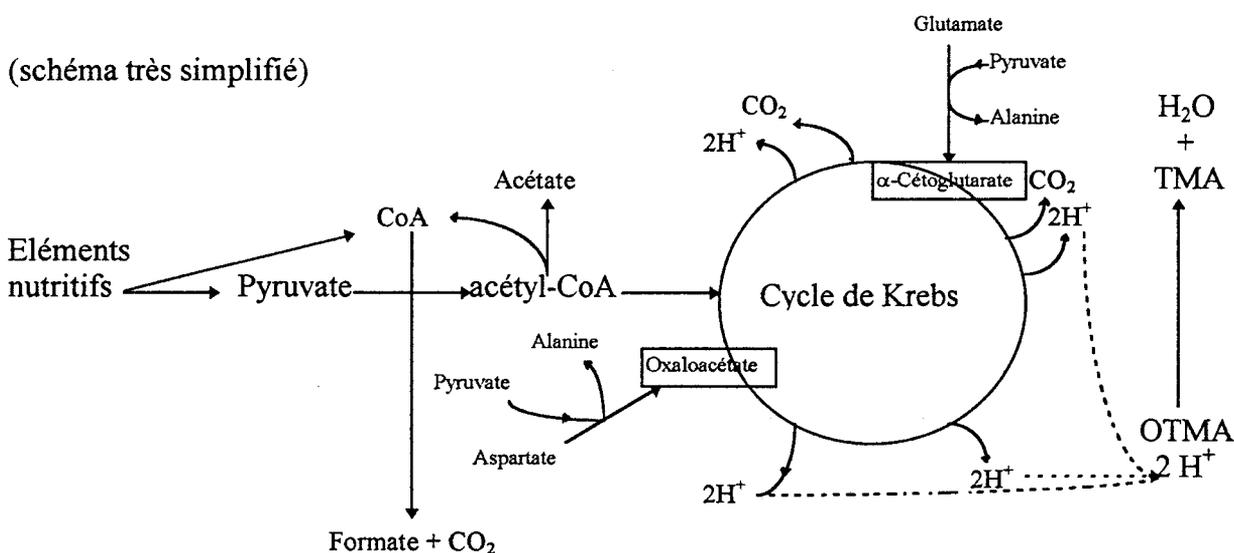
- l'histamine peut donner l'acide imidazol acétique, le 1-4 méthyl imidazol acétique, l'acétyl histamine ou la méthyl histamine,
- la tyramine peut donner l'hodéine, la synéphrine, l'octopine, la méthyloctopamine, la dopamine ou la noradrénaline,
- la putrescine peut donner la pipéridine ou la pyridine.

2. Les triméthylamines

La réduction de l'OTMA en TMA est connue depuis longtemps (Beatty et gibbons, 1937 ; Watson, 1939 ; Hillig et coll., 1958).

Lorsque le poisson meurt, la flore aérobie se développe en surface puis commence à pénétrer dans le muscle en utilisant l'oxygène disponible. La réduction de l'OTMA n'est pas uniforme dans les poissons (Dyer et coll., 1961 cité par Sainclivier, 1983). L'oxygène vient à se raréfier (vers le 6^{ème} jour de conservation sur glace ; Soudan et coll., 1965) et entraîne une sélection bactérienne vers les aérobies-anaérobies facultatives en utilisant comme accepteur naturel de protons l'OTMA (figure 1) par une voie non fermentative (Strom et coll., 1979).

Figure 1. Réduction de l'OTMA (Ringo et coll., 1984).

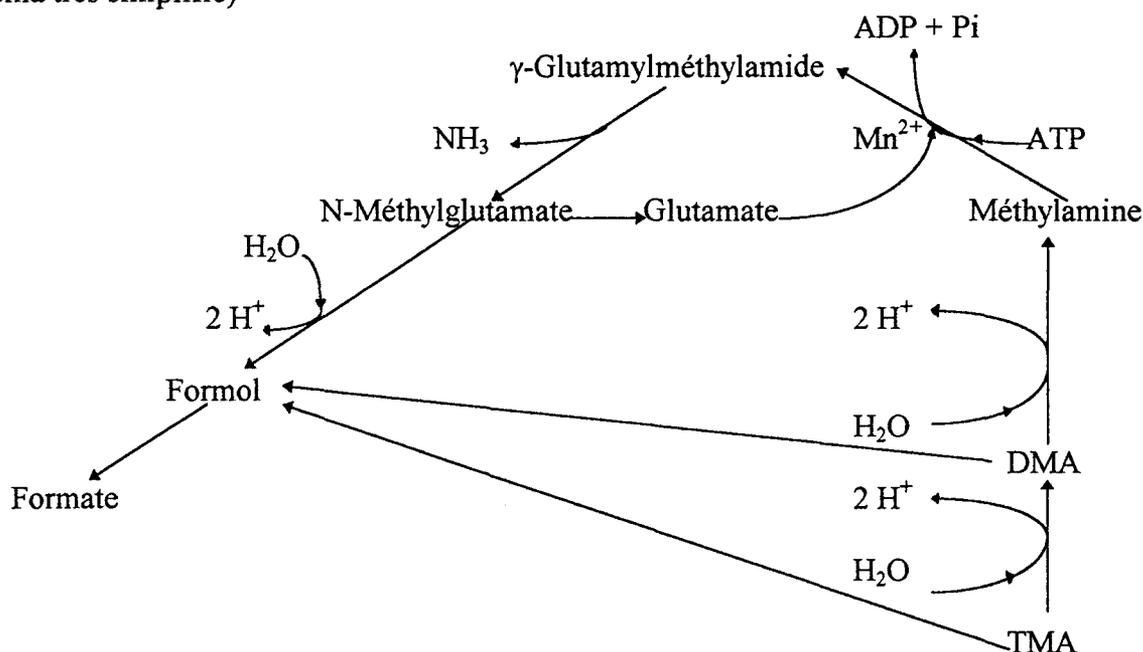


Le dosage de la TMA fournit des éléments pour évaluer l'altération du poisson qui est inconsommable lorsque la concentration atteint 10 à 15 mg pour 100 g de chair (Soudan et coll., 1965; Sainclivier, 1983).

D'autre part la dégradation de la TMA obtenu par réduction de l'OTMA (figure 2) est aussi réalisable par des bactéries de genre *Hyphomicrobium* (Meiberg et Harder, 1978), et *Micrococcus* (Tate et Alexander, 1976). On obtient alors la formation de dioxyde de carbone (CO_2) en passant par la formation de DMA, de méthylamine, de formol et de formate (Soudan et coll., 1965 ; Ritchie et Mackie., 1980 ; Sainclivier, 1983 ; Sotelo et coll., 1995). A partir de ces deux derniers composés, on peut revenir à la sérine par le tétrahydrofolate.

Figure 2. Dégradation de la TMA (Meiberg et Harder, 1978).

(schéma très simplifié)



Le formol produit peut se transformer en formate ou alors réagir avec les groupements NH_2 libre c'est à dire avec des acides aminés, des amines biogènes mais aussi des protéines.

L'ammoniac, constituant normal du poisson, est produit massivement lors de la dernière phase d'altération surtout chez les poissons cartilagineux (Liston, 1980). L'ammoniac augmente très rapidement sous l'effet de l'activité bactérienne (désaminase).

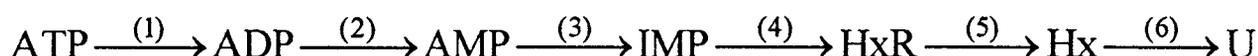
La TMA, la DMA, la méthylamine et l'ammoniac forment la majeure partie de l'azote basique volatil total (ABVT).

L'ABVT est le reflet de l'altération bactérienne, il augmente en fonction de l'altération du poisson (Beatty et Gibbons, 1937 ; Conway, 1962 ; Malle et coll., 1983 ; 1986 ; Abdalla et coll., 1989 ; Perez-Villarreal et Pozo, 1990).

3. Les dérivés nucléotidiques

Les études de dégradation des nucléotides chez le poisson n'ont été réalisées que sur les dérivés de l'ATP. Il y a formation de composés tels que l'inosine, l'hypoxanthine et le ribose.

La dégradation de l'ATP suit le schéma (simplifié) suivant :



ATP :	Adénosine 5'-triphosphate	(1) :	ATP phosphorylase
ADP :	Adénosine 5'-diphosphate	(2) :	AMP phosphorylase
AMP :	Adénosine 5'-monophosphate	(3) :	5' AMP aminohydrolase
IMP :	Inosine 5'-monophosphate	(4) :	5' ribonucléotide phosphorylase
HxR :	Inosine	(5) :	Inosine ribohydrolase
Hx :	Hypoxanthine	(6) :	Xanthine oxydase
U :	Acide urique		

La disparition de l'ATP est en relation directe avec la fraîcheur du poisson (Fujii et coll., 1973 ; Lee et coll., 1992 ; Mulchandani et coll., 1990 ; Luong et coll., 1991).

La disparition de l'ATP est très rapide (Burt, 1977) et la disparition de l'ADP et l'AMP est aussi plus ou moins rapide (24 h). L'IMP a donc une contribution majeure dans la flaveur du poisson frais.

On observe une diminution de l'IMP au profit d'une accumulation d'inosine ou d'hypoxanthine chez les poissons. Cette réaction peut être corrélée à la perte de la flaveur provenant de la dégradation autolytique durant les stades précoces d'altération puis de l'altération microbienne pendant la conservation (Saito et coll., 1959 ; Ehira et Uchiyama, 1974 ; Martin et coll., 1978 ; Mulchandani et coll., 1989 ; Perez-Villarreal et Pozo, 1990 ; Okuma et coll., 1992 ; Lee et coll., 1992).

Une étude menée par Williams et coll. en 1991 sur des poissons tropicaux a montré que certains poissons accumulaient soit de l'inosine, soit de l'hypoxanthine, voire les deux.

IV. Les lipides

Les phospholipides peuvent donner par hydrolyse des phosphates, des acides gras, du glycérol et d'autres composés à base d'azote comme la choline. Lors de l'altération des poissons on observe :

- une diminution des phospholipides et en particulier de la phosphatidyléthanolamine, de la phosphatidylcholine et de la phosphatidylsérine (Vasundhara et Kumudavally, 1989 ; De Koning et Mol, 1990).

- l'augmentation de certains acides gras libres (F.F.A.) (Beltran et Moral, 1990 ; 1991 a et b).

Ceci peut être observé sur de la chair même congelée ou conservée à froid. Le rancissement des huiles et des graisses constitue l'un des aspects de décomposition le plus souvent rencontré (Ikeda, 1980).

La diminution d'acides gras à chaînes polyinsaturées est régulée par le phénomène d'oxydation. Ceci se traduit par une augmentation des valeurs de peroxyde (POV); de malonaldéhyde (MA) évalué par le dosage de l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) (Wood et coll., 1969 ; Wood et Hintz, 1971; Stammen et coll., 1990; Akande et coll., 1991). Les acides gras oxydés peuvent réagir avec les protéines et entraîner leur dénaturation (Sotelo et coll., 1995). De nouvelles techniques utilisant la résistance électrique sont utilisées pour évaluer l'altération des lipides (Sainclivier, 1983).

V. Les glucides

Un poisson qui fatigue lors de la capture consomme très vite sa réserve de glycogène (Soudan et coll., 1965), la carpe et le maquereau perdent ainsi en quelques heures plus de 50% de leur réserve en glycogène. Les sucres ne sont pas utilisés pour évaluer la fraîcheur d'un poisson car ils sont métabolisés trop rapidement.

VI. Caractéristiques organoleptiques

Lors de la dégradation d'un poisson, le muscle devient plus tendre, il a une odeur plus marquée (rance) qui traduit parfaitement l'autolyse (Mountney et Gould, 1988) et qui influence assez fortement l'évaluation organoleptique. L'activité due à la contamination bactérienne viendra poursuivre et amplifier ce phénomène.

Les caractéristiques organoleptiques permettent une évaluation subjective de l'altération par détection d'odeurs, appréciation de l'apparence, de la texture et du goût de la chair.

La qualité organoleptique d'un poisson a été définie par des barèmes de cotation : le barème Français va de l'indice 1 : poisson frais, à l'indice 6 : poisson altéré (tableau 13 p. 50).

Se sont les travaux de Soudan et coll. (1957) qui ont permis d'établir ce barème.

13 caractères sont pris en compte et la moyenne arithmétique des 13 notes indique l'indice d'altération.

Pour un poisson frais entiers ou éviscérés, l'examen à l'état cru porte sur les caractères I à VIII pour les caractères externes et IX à XI pour les caractères internes du tableau 13.

Pour un poisson étêtés et éviscérés, l'examen à l'état cru porte sur les caractères I, II, VII à XI et à l'état cuit les caractères XII et XIII.

L'appréciation des poissons en tranches ou en filets est plus difficile : à l'état cru l'examen porte sur les caractères II, VII, IX et X et après cuisson les caractères XII et XIII.

Tableau 13. Barème Français de cotation.

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	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	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	Couleur de la chair avoisinante	X	même teinte que le reste de la chair coté 1			rose	rouge	brune coté 5	
Adhérence à la chair			XI	la colonne se brise au lieu de se détacher coté 1		nettement adhérente	non adhérente coté 4		colonne se détachant facilement 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	
	SAVEUR		XIII	spécifique	spécifique renforcée	spécifique atténuée	papier mâché	douceâtre un peu amère	amère, sulfurée ou ammoniacale	nauséuse	

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

A. Échantillonnage du poisson

Le but de cet échantillonnage est d'obtenir un prélèvement représentatif de plusieurs populations de poissons de mer froide ou tempérée provenant de pêche industrielle (chalut). Ces échantillons prélevés de façon aléatoire permettront ainsi de réaliser les suivis de l'altération microbiologique et biochimique.

On utilise des lots (de 45 poissons maximum) de merlan (*Merlangus merlangus*), de tacaud (*Gadus luscus*), de carrelet (*Pleuronectes platessa*), de rascasse ou Sébaste chèvre (*Helicolenus dactylopterus*), de hareng (*Clupea harengus*) entier et de morue (*Gadus morhua*) éviscérée.

Ces espèces marines ont été choisies en fonction de leurs divergences biochimiques (chapitre I) : le merlan, la morue et le tacaud sont des poissons dits maigres et la rascasse est un poisson plus gras (taux de lipide dosé 3,6 %) ; et de leurs divergences physiologiques : le merlan et le tacaud ont une peau beaucoup moins épaisse que celle de la rascasse.

Afin de réaliser les différentes manipulations et suivis d'altération, les lots (populations) de poisson ont été choisis les plus frais possibles avec des individus de taille suffisante (masse de chair). Si la population n'est pas suffisamment fraîche ou si quelques poissons sont de taille trop petite pour réaliser l'ensemble des manipulations, la population n'est pas retenue (ceci nous évite de choisir arbitrairement des poissons parmi une population).

Ayant choisi une population on réalise un prélèvement aléatoire d'au moins 45 poissons. Ils sont alors placés dans les conditions habituelles de conservation : mis en vrac dans une caisse et conservés à 0°C sous glace fondante. Ce type de conservation entraîne un gradient de contamination des poissons par la fonte de la glace : les poissons du dessus sont plus ou moins lessivés et ceux du dessous sont plus contaminés. Afin d'avoir une évaluation objective et générale de l'altération de chaque lot de poissons, nous prélevons quotidiennement trois poissons : un juste sous la glace un autre au fond de la caisse et un au milieu. La position des poissons ne sera pas prise en considération dans les différentes

analyses car, nous ne nous intéressons pas au phénomène particulier de la contamination par la glace qui a déjà fait l'objet d'études (§ 3. p. 37).

B. Microbiologie

A la suite de l'étude bibliographique, les travaux se sont orientés dans un premier temps vers la recherche des conditions optimales des dénombrements de la flore totale, de la flore à Gram négatif (majoritairement constituée de *Pseudomonas*) et de la flore H₂S (majoritairement constitué de *Shewanella putrefaciens*). Puis dans un second temps les recherches se sont portées sur les capacités métaboliques de ces flores et de certaines souches bactériennes référencées (réduction de l'OTMA, dégradation d'acides aminés).

I. Prise d'essais et traitement des échantillons

L'échantillon de chair est réalisé à partir des filets prélevés stérilement en évitant de percer la cavité abdominale ainsi que tout contact avec la surface de la peau. Les filets sont broyés au mixeur (Warring). Cet échantillonnage évite de prendre en considération le gradient de contamination des poissons. 10 g de broyat sont placés dans un sac "Bag Filter" stérile avec 90 ml de peptone-sel (Oxoid) stérile (norme NF V08-010, mars 1996). L'ensemble est placé dans un broyeur homogénéiseur Stomacher pendant 1 à 2 min et revivifié pendant 30 min à température ambiante (norme ISO 7218, mai 1996). L'ensemencement est réalisé à partir de cette solution mère.

Les filets homogénéisés vont également servir pour les analyses biochimiques.

II. Souches bactériennes

Nous utilisons des souches référencées. Elles ont été choisies car :

- six d'entre elles sont caractéristiques de la chair de poisson : *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flavobacterium branchiophilum*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Alteromonas communis*.

- trois sont des Entérobactéries qui peuvent éventuellement se trouver dans le poisson par contamination exogène : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*.

- deux proviennent des eaux de mer : *Micrococcus sedentarius* et *Pseudomonas nautica*.

Chaque souche est mise en suspension dans du peptone sel stérile pour se placer dans les conditions les plus proches de la revivification de la flore totale du poisson avant chaque ensemencement.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	CIP	74.30	H ₂ S ⁺	
<i>Alteromonas communis</i>	CIP	74.1	H ₂ S ⁻	
<i>Escherichia coli</i>	CIP	54.8	H ₂ S ⁻	
<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	CIP	103527	H ₂ S ⁻	
<i>Micrococcus sedentarius</i>	CIP	81.72	H ₂ S ⁻	
<i>Proteus mirabilis</i>	CIP	103548	H ₂ S ⁺	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CIP	69.13	H ₂ S ⁻	
<i>Pseudomonas nautica</i>	CIP	74.11	H ₂ S ⁻	
<i>Serratia marcescens</i>	CIP	103551	H ₂ S ⁻	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	CIP	80.40	H ₂ S ⁺	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CIP	71.2	H ₂ S ⁺	

(CIP : Collection de l'Institut Pasteur Paris)

III. Recherche de la flore totale

La recherche de la flore totale se fait à partir de trois milieux (Oxoid) :

- Plate Count Agar (PCA), de pH 7,0 ± 0,2. Ce milieu est recommandé pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie (norme NF V08-51 Dec 1992).
- Tryptone Soja Agar (TSA = TSA 0,5% p/v de NaCl), de pH 7,3 ± 0,2. Ce milieu est utilisé pour le dénombrement de la flore aérobie totale par Liston (1980).
- Lingby au fer ou gélose au fer (milieu H₂S), de pH 7,4 ± 0,2. Ce milieu permet de dénombrer la flore aérobie totale mais également la flore H₂S.

Les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 min pour les stériliser.

IV. Recherche de la flore à Gram négatif

Le dénombrement de la flore à Gram négatif est réalisé à partir des milieux PCA et TSA, supplémentés de 2 mg/L de cristal violet (cv). Les milieux sont alors respectivement appelés PCA cv et TSA cv.

Ils sont autoclavés à 120°C pendant 20 min pour les stériliser.

V. Recherche de la flore H₂S

La recherche de la flore H₂S sera effectuée à partir de 3 milieux qui possèdent des composés permettant la formation d'un précipité noir (FeS) lorsque les bactéries sont capables d'utiliser une source organique ou une source inorganique de soufre :

- le milieu H₂S (Lingby au fer),
- les milieux PCA et TSA supplémentés en thiosulfate de sodium (0,3 g/L), en citrate de fer (0,3g/L), et après autoclavage en L-cystéine (0,6 g/L). Ces composés permettent la formation de colonies noires (H₂S). Ces milieux seront respectivement appelés PCA-H₂S et TSA-H₂S.

VI. Recherche des besoins en NaCl des flores

Aux différents milieux qui ont été cités (PCA, TSA, H₂S, PCA cv, TSA cv, PCA-H₂S et TSA-H₂S) il peut être ajouté 5, 10, 15, 20, 25, 30 et 35 g/L de NaCl, ces milieux sont alors respectivement appelés :

- PCA 0 à 3,5 % de NaCl,
- TSA 0,5 à 3,5 % de NaCl,
- PCA cv 0 à 3,5 % de NaCl,
- TSA cv 0,5 à 3,5 % de NaCl,
- PCA-H₂S 0 % à 3,5 % de NaCl,
- TSA-H₂S 0,5 % à 3,5 % de NaCl,
- H₂S 0,5 % à 3,5 % de NaCl.

VII. Etude comparative du mode de culture

1. Nature de l'ensemencement

Deux types d'ensemencement sont testés :

- en masse (M) (norme ISO 4833 juil. 1991) en ajoutant dans chaque boîte de Pétri 1 ml d'une suspension bactérienne ou d'une solution de revivification de poisson avant de couler le milieu gélosé (45°C).

- en masse recouvert d'une couche supplémentaire de milieu après ensemencement (M+C),

- en surface (S) de la boîte de Pétri déjà coulée selon la méthode Spiral (norme NF V08-100 oct. 1987) : l'appareil dépose la suspension bactérienne ou la solution de revivification de poisson par l'intermédiaire d'un stylet qui se déplace du centre de la boîte vers sa périphérie pendant la rotation de celle-ci.

- en surface (Spiral) recouvert d'une couche supplémentaire de milieu après ensemencement (S + C).

Ceci est réalisé sur le milieu H₂S car il permet le développement de la flore H₂S⁺ et celui de la flore totale.

Remarque : la méthode conventionnelle d'ensemencement en surface (par étalement) n'a pas été utilisée pour des raisons pratiques (moins rapides et plus de dilutions que la méthode Spiral).

2. Températures de développement

Nous recherchons la température optimale de développement de la flore H₂S et celle de la flore totale de contamination du poisson conservé sous glace à 0°C.

Les températures optimales de développement des différentes flores ont été évaluées sur le milieu H₂S.

Nous avons testé trois températures :

- 20°C recommandé par Georgala (1957) et Van Den Broek et coll. (1984) pour l'évaluation de la flore psychrotrophe et psychrophile du poisson,

- 30°C recommandé par la norme NF V08-51 (Dec, 1992) pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie,

- 25°C recommandé par Gram et coll. (1987) pour l'évaluation de la flore H₂S⁺.

Un poisson (tacaud : *Gadus luscus*), altéré (ABVT = 60, TMA = 40) sert à dénombrer des colonies H₂S et la flore totale et, la souche *Shewanella putrefaciens* sert de témoins H₂S⁺ sur ce milieu.

VIII. Recherche de la flore réductrice de l'OTMA

Toutes les souches bactériennes ont été utilisées. Les recherches se sont orientées vers une méthode de détermination utilisant un milieu de culture et non une méthode de conductance.

1. Méthode qualitative

Deux milieux sont utilisés:

- Le milieu dérivé de Gram et coll. (1987) est composé de 20 g de peptone, de 3 g d'extrait de viande de boeuf, de 3 g d'extrait de levure, de 4 g de NaCl, de 4 g de KH_2PO_4 , de 5,75 g de K_2HPO_4 , de 0,5 g de MgSO_4 , de 0,8 g de résazurine, de 4 g d'agar, q.s.p. 1 L d'eau déminéralisée, le pH est ajusté à $6,8 \pm 0,2$, ajouter l'OTMA, $2\text{H}_2\text{O}$ 0,5% après autoclavage et refroidissement à 45°C.

- Le milieu de Debevère et Voëts 1974 est composé de 5 g de peptone, de 1 g d'OTMA, de 0,2 M de NaCl, de 0,01 g de rouge de phénol, de 15 g d'agar, q.s.p. 1 L d'eau déminéralisée, le pH est ajusté à $6,9 \pm 0,2$.

Les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 min pour les stériliser.

Ces deux milieux sont placés dans des tubes qui, après, ensemencement par piqûre centrale, sont recouverts d'huile de paraffine stérile. Ils sont ensuite incubés à 25°C pendant 24, 48, 72 h et 7 jours selon le délai de la réponse et ceci quelle que soit l'analyse réalisée.

2. Méthode quantitative

Deux milieux sont utilisés :

- Le milieu Sea-fish : il est produit à partir d'un hydrolysât ménagé de la chair de poisson et fourni par la CTPP (coopérative de transformation des produits de la pêche). Le milieu est composé de 125 g de Sea-fish (protéines (N \times 6,25) : 90 à 95 %, humidité : 2,5 à 3%, matières grasses libres : 0,5%, cendres : 2 %), q.s.p. 1 L d'eau déminéralisée, le pH est ajusté à $6,8 \pm 0,2$. Le milieu est ensuite centrifugé 5 min à 1250 g, et filtré sur membrane (0,45 μm) pour le stériliser.

- Le Bouillon coeur-cerveau (Oxoid) dont le pH est ajusté à $6,8 \pm 0,2$. Il est autoclavé à 120°C pendant 20 min pour le stériliser.

A ces milieux, placés dans des tubes (3 ml), il sera ajouté 1 ml d'une solution filtrée ($0,2 \mu\text{m}$) d'OTMA à 25 g/L.

Ces tubes après ensemencement par 1 ml d'une suspension bactérienne dans du peptone-sel recouvert par 1 ml d'huile de paraffine stérile (condition d'anaérobiose) seront incubés à différentes températures (0, 8, 20, 25, 30°C) pendant 18, 24, 48, 72 h et 7 jours pour évaluer la capacité des souches à réduire l'OTMA.

Une fois optimisés les paramètres de température, de temps d'incubation et de milieu, nous ferons des tests sur des solutions de revivification de poisson.

IX. Recherche de flores capables de produire des amines biogènes

En se basant sur les capacités des bactéries à dégrader les muscles du poisson, nous espérons mettre au point un milieu de culture gélosé contenant différents acides aminés capables de produire, par décarboxylation, des amines biogènes (Edmunds et Eitenmiller, 1975 ; Niven et coll., 1981 ; Ryser et coll., 1984).

La lysine, l'histidine, l'ornithine déjà connus et exploités dans certains milieux (Pasteur ou Oxoid) sont utilisés.

Les essais ont été réalisés à partir du milieu Moller (Pasteur). Après autoclavage de ce milieu, il faut ajouter par filtration une solution à 5 g/L de l'acide aminé considéré.

9 ml du milieu sont répartis par tube stérile qui sont ensemencés par piqûre centrale. 1ml d'huile de paraffine stérile est ajouté pour réaliser les conditions d'anaérobiose ou de microaérobiose.

Ce milieu pourra également être gélosé à 15 g/L d'agar et coulé en boîte de Pétri.

L'incubation se fait à 37°C pendant au moins 24 h.

Deux souches sont utilisées : *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia marcescens* qui donnent des réponses opposées vis à vis des trois acides aminés (Pasteur) que l'on va ajouter dans les milieux.

X. Identification de souches

Chaque colonie H₂S retenue pour identification est suspendue dans du peptone-sel (Oxoid) puis isolée sur le milieu retenu pour le développement de la flore totale.

Chaque colonie provenant d'isolement sera cultivée dans le bouillon coeur-cervelle (Oxoid).

Différents paramètres sont utilisés pour la caractérisation des souches :

- la coloration Gram + ou - et la forme des bactéries sous microscope optique,
- la mobilité est déterminée par piqûre centrale de la gélose Mannitol-Mobilité (Pasteur),
- la présence de cytochrome oxydase est détectée par des disques (Biomérieux) imprégnés de diméthyl-p-phénylène diamine,
- la présence de catalase est mise en évidence par un dégagement de bulles d'oxygène dans une solution H₂O₂ à 3 %,
- le métabolisme du glucose est étudié à partir du milieu MEVAG (Pasteur),
- le caractère OTMA⁺ est déterminé grâce au milieu Gram et coll., (1987) (§ 1. p.56),
- la caractérisation par galerie API 20NE a été réalisée sur les souches ne possédant pas les caractéristiques du genre *Shewanella* afin de les identifier.

C. Évaluation Organoleptique

Elle est réalisée par l'évaluation de l'indice de fraîcheur (I.F.) suivant le barème Français (tableau 13 p. 50). L'examen n'est effectué que sur les caractères I à VIII du barème.

D. Biochimie

Les dosages d'ABVT et de TMA servent de référence pour suivre l'évolution de l'altération biochimique du poisson. L'altération ne sera pas déterminée par le pH, l'activité de l'eau, le potentiel d'oxydoréduction ou par résistance électrique.

Suite à l'étude bibliographique les études se sont portées : dans un premier temps sur les dosages par C.L.H.P. des amines biogènes et des dérivés de dégradation de l'ATP, dans un deuxième temps sur l'étude de la détection et action sur les groupements aminés du formol, dans un troisième temps vers la compréhension d'une voie de dégradation de l'OTMA.

En raison de la variabilité de la composition des lipides et de la fugacité des glucides dans le poisson, ils n'ont pas été étudiés.

I. Dosage des amines volatiles

Remarque : le dosage de ces amines se réalise par adjonction d'une base forte qui entraîne un changement d'état des amines qui deviennent alors volatiles.

1. Méthode d'entraînement à la vapeur

Le dosage de l'ABVT est réalisé suivant la méthode de Billon et coll. (1979) avec un appareil de distillation de type Kjeldahl.

Le dosage de la TMA est réalisé suivant la méthode de Malle et Tao (1987) avec un appareil de distillation de type Kjeldahl.

L'évaluation du rapport P proposé par Malle et Poumeyrol (1989) permet de mieux apprécier l'altération d'un poisson. Il prend en compte la proportion de TMA produite en fonction de l'ABVT ($P = (TMA / ABVT) \times 100$).

2. Méthode de microdiffusion

Cette méthode est la méthode de Conway (1962). Elle permet, par des cellules de Conway le dosage de l'ABVT, de la TMA ou de l'OTMA.

Cette technique de dosage est utilisée pour évaluer la capacité de différentes souches bactériennes à produire de la TMA à partir d'un milieu liquide optimisé. On ajoute alors pour 2ml de ce milieu (préalablement ensemencé et mis sous incubation) 2 ml d'acide trichloroacétique à 10 % et on réalise le dosage de la TMA selon la méthode de Conway.

Soit n le volume (en ml) d'acide chlorhydrique 0,01 M ajouté pour neutraliser l'indicateur coloré (rouge) de la production de TMA, la quantité de TMA produite est égale à $n \times 27,67$ mg d'azote pour 100 ml de culture.

Pour les espèces que l'on étudie (§ A. p. 51) il est généralement admis que lorsqu'un poisson est altéré son taux d'ABVT dépasse 30 mg d'azote / 100 g de chair et le rapport P dépasse 30%.

II. Dosage des amines biogènes

La méthode que nous utilisons est dérivée de celle de Smith et Davis (1985) adaptée pour le poisson (Malle, 1992 ; Malle et coll., 1996).

Les amines biogènes sont extraites de la chair de poisson par précipitation des protéines à l'acide perchlorique. Elles sont dérivées par le chlorure de dansyl et extraites en une phase organique. Elles sont ensuite analysées par CLHP (chromatographie liquide à haute performance).

1. Solutions

La solution de chlorure de dansyl (C.D.) (Sigma) est utilisée à 750 mg/100 ml d'acétone et conservée à -20°C à l'abri de la lumière.

Les solutions standard (Sigma) de putrescine dichlorhydrate (put), de cadavérine dichlorhydrate (cad), d'histamine dichlorhydrate (his), de spermidine trichlorhydrate (spd), de spermine tétrachlorhydrate (spm), et de 1,3 diaminopropane dichlorhydrate (diam), sont utilisées à 80 mg/100 ml d'eau distillée et conservées à 5°C.

Le 1-3 diaminopropane (Tabor et Tabor, 1973) est utilisé comme étalon interne.

La solution de L-proline (pro) (Sigma) est utilisée à 100 mg/ml d'eau distillée et conservée à 5°C.

2. Méthode

Extraction :

5 g de chair de poisson est broyée par un ultraturrax à 20.000 t/min en présence de 10ml d'acide perchlorique 0,2 M et 100 µl de la solution de 1-3 diaminopropane. Le broyat est ensuite centrifugé à 2500 g pendant 20 min à 2°C. Cette opération est répétée une deuxième fois avec le culot de chair et les deux surnageants sont mélangés.

Dérivation :

Dans un tube à bouchage hermétique on introduit :

- 300 µl du surnageant d'extraction ou 300 µl d'une solution d'amine standard (100µl de chaque solution d'amine diluée dans 20 ml d'acide perchlorique 0,2 M),
- 100 µl de la solution de 1-3 diaminopropane (étalon interne),
- 600 µl de Na₂CO₃ saturé (pour neutraliser l'acide : pH > 9),
- 1,2 ml de la solution de chlorure de dansyl.

Le mélange est agité et porté à 60°C pendant 1h à l'obscurité.

Après avoir laissé refroidir le tube, on ajoute 300 µl de la solution de L-proline (neutralisation de l'excès de chlorure de dansyl). On agite et on laisse le tube 30 min à température ambiante et à l'obscurité.

Récupération :

La solution est déphasée après l'ajout de 1,5 ml de toluène et agitation vigoureuse. Les dérivés d'amines biogènes sont récupérés dans la phase organique.

Après décantation, la phase organique récupérée est évaporée à froid sous flux d'azote.

Le résidu sec est repris par 900 µl d'acétonitrile et filtré à 0,2 µm avant d'être injecté en C.L.H.P.

3. Matériel

La C.L.H.P. est réalisée sur colonne KROMASIL C₁₈ 5 µm, 100 Å (25 cm x 4,6 mm) en phase reverse thermostatée à 25°C, équipée d'une précolonne BROWNLEE C₁₈ 5 µm (30 x 4,6 mm). Le gradient de chromatographie est établi par l'intermédiaire de deux pompes LC-6A (Shimadzu) à un débit de 1 ml/min, les amines dérivées sont visualisées à 254 nm par l'intermédiaire d'un détecteur SPD-6A (Shimadzu) couplé à un intégrateur C-R3A (Shimadzu). Les injections sont réalisées à l'aide d'un injecteur automatique SIL-6B (Shimadzu).

4. Gradient

Nous utilisons le gradient d'élution (tableau 14) mis au point par Malle (1992)

Tableau 14. Étapes du gradient d'élution.

Temps (min)	Pourcentage des solutions	
	Eau	Acétonitrile
0	40 %	60 %
6	25 %	75 %
8	25 %	75 %
13	5 %	95 %
20	5 %	95 %
20,01	40 %	60 %
30	40 %	60 %

5. Calcul du taux de perte

La surface des différentes amines doit, dans un premier temps, être corrigée. Le 1-3 diaminopropane ajouté dès le début des manipulations rencontre les mêmes problèmes d'extraction, de dérivation, de récupération et d'analyse que les amines biogènes du poisson. Il peut donc servir à évaluer les pertes occasionnées par les manipulations :

$$\text{Taux de perte} = (\text{surface théorique} / \text{surface observée})$$

III. Dosage de dérivés nucléotidiques

On cherche à mettre au point un protocole de dosage des composés de dégradation de l'ATP par C.L.H.P., avec si possible le même matériel que celui utilisé pour le dosage des amines biogènes.

Une petite étude bibliographique nous a permis de mettre sur pied un protocole que nous allons tester.

Le principe de dosage des nucléotides par C.L.H.P. est simple : il faut précipiter les protéines par un acide, puis neutraliser l'acide, avant de réaliser l'analyse.

1. Méthode

10 g de chair de poisson sont broyés en présence de 50 ml d'acide perchlorique (HClO_4) 0,6 M dans un ultraturrax à 0°C. La solution est centrifugée à 1250 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est amené à pH 6,5-6,8 par addition de KOH 2 M (neutralise l'acide). La solution est placée à 4°C pendant 30 min (précipitation de l' HClO_4) et après filtration sur papier Whatman n°1 pour retenir les cristaux d'acide, on filtre à 0,2 μm avant injection (20 μl) en CLHP.

C'est à partir de ce protocole mis sur pied et dérivé de ceux proposés par Williams et coll. (1991) et Scott et coll. (1992) que nous allons réaliser les essais.

2. Gradient

Dans un premier temps nous avons utilisé un tampon phosphate (0,06 M de K_2HPO_4 et 0,04 M de KH_2PO_4) contenant 50 ml/L de méthanol à un débit de 1 ml/min.

3. Dosage par le Fresh-Tester (Transia)

Nous réalisons des comparaisons de résultats obtenus par la méthode retenue en C.L.H.P. avec seul test commercialisé pour l'évaluation de la fraîcheur d'un poisson suivant la dégradation de l'ATP (Chap. I § 3. p.47).

Principe de dosage :

A partir d'un broyat (dans un mortier) de 0,2 à 0,5 g de muscle dorsal exempt de peau et de 5 ml de réactif F(II) fourni, on trempe la bandelette-test dans l'extrait. Il faut alors couvrir la bandelette avec un film et la placer 10 min. à l'obscurité et à température ambiante. Après comparaisons des couleurs des deux membranes aux étalons de l'abaque (carte colorimétrique), on évalue l'altération du poisson par le rapport K %.

$$K = (HxR + Hx / ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx) \times 100.$$

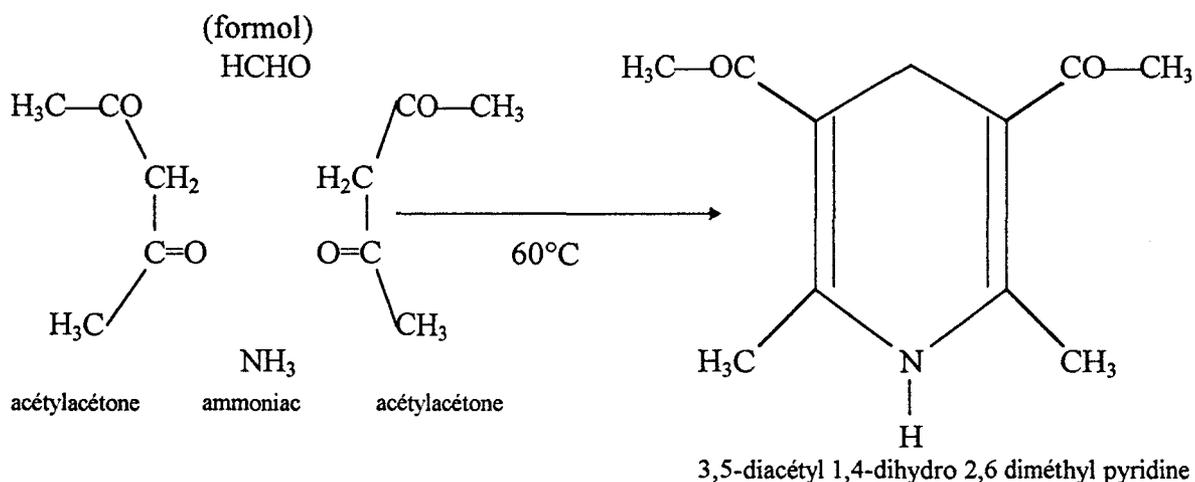
(ATP : Adénosine 5'-triphosphate ; ADP : Adénosine 5'-diphosphate ; AMP : Adénosine 5'-monophosphate ; IMP : Inosine 5'-monophosphate ; HxR : Inosine ; Hx : Hypoxanthine)

IV. Dosage du formol

Nous cherchons à doser facilement le formol qui se forme pendant l'altération du poisson (figure 2 p. 46). Nous allons utiliser une méthode couramment utilisée en industrie sucrière pour l'évaluation du formol.

L'acétylacétone, le formol et l'ammoniac réagissent pour former par cyclisation (figure 3) le 3,5-diacétyl 1,4-dihydro 2,6 diméthyl pyridine détectable à 410 nm. (On ne peut doser le formol iminé).

Figure 3. Principe de la réaction de Hantzsch



1. Méthode

La méthode est dérivée de celle proposée par l'A.O.A.C. (1984).

A 20 g de chair de poisson on ajoute 40 ml d'eau distillée, on broie à l'ultraturrax (24.000 tr/min) à froid (-20°C), on centrifuge 10 min à 2500 g

Dans un tube à bouchage hermétique on introduit 2 ml de solution à doser et 2 ml de réactif de Hantzsch. Le réactif de Hantzsch est composé de 14,5 g d'acétate d'ammonium, de 0,2 ml d'acétylacétone, de 0,3 ml d'acide acétique à 100%, q.s.p. 100 ml d'eau déminéralisée, et conservé à 2°C et à l'abri de la lumière. Le mélange est porté 15 min à 60°C au bain marie puis ramené à température ambiante et mesuré à 410 nm.

2. Étalonage

Préparer une solution à 400 µg/ml de formol (1 ml d'une solution de formol à 40 % q.s.p. 1 L), ajouter de 50 à 5000 µl de cette solution à 100 ml d'eau distillée pour réaliser les étalons de 0,2 à 20 µg/ml.

V. Dosage de groupements aminés libres

Le but est de réaliser un dosage de ces groupements par l'intermédiaire d'un dosage du formol. Nous pourrions ainsi suivre l'évolution des groupements aminés libres pendant l'altération des poissons et donc l'évolution des composés azotés. En effet, les protéines catabolisées peuvent donner des groupements aminés libres et la dégradation de la TMA peut donner du formol qui peut réagir avec ces groupements aminés libres (Owusu-Ausah et Haltin, 1987).

1. Solutions

Nous avons préparé des solutions d'acides aminés (histidine, lysine, arginine, tryptophane, glutamine), d'amines biogènes (tyramine, histamine, putrescine, cadavérine, spermine, spermidine) et d'amine volatile (méthylamine) à des concentrations de 10^{-5} à 10^{-3} M.

Nous avons préparé des solutions de formol variant de 10^{-5} à 10^{-3} M.

2. Méthode

On réalise des mélanges d'un acide aminé ou d'une amine avec le formol en proportion inverse du nombre de groupements NH_2 de chaque acide aminé ou amine. Ceci dans le but de voir si la réaction d'imination se fait rapidement et de manière identique suivant l'acide aminé ou l'amine.

Pour évaluer la quantité de composés aminés libres dans du poisson, nous allons utiliser le protocole suivant :

- l'échantillon de poisson est préparé de la même façon que pour le dosage du formol. En revanche, il faut ajouter aux 2 ml de surnageant de poisson 20 μl d'une solution de formol à 800 mg/l (2 ml d'une solution de formol à 40 % q.s.p. 1 L) que l'on mélangera. Puis on reprend ces 20 μl pour obtenir un volume final de 2 ml pour réaliser le dosage du formol restant (non iminé).

- le dosage est le même que pour le formol (§ 1. p. 65). Mais cette fois-ci on évalue les pertes (en fonction de la quantité de formol présent dans les solutions mères) et non plus la quantité de formol produit.

Il faut réaliser le dosage relativement rapidement car le surnageant de poisson contient des enzymes qui peuvent dégrader les acides aminés et amines libres.

VI. Voie de dégradation de l'OTMA

Des informations concernant la dégradation de l'OTMA ont été présentées dans le premier chapitre (§ 2. p. 45), elles peuvent être résumées à deux figures qui représentent d'une part (figure 1 p. 45) la réduction de l'OTMA en anaérobiose en utilisant le cycle de Krebs (Ringo et coll., 1984) et d'autre part (figure 2. p. 46) la dégradation de la TMA (Meiberg et Harder, 1978). Nous cherchons à relier ces deux cycles afin de mieux comprendre la réduction des oxydes d'amines tertiaires par les bactéries d'altération du poisson.

1. Souches bactériennes

Afin de compléter ce cycle de dégradation de l'OTMA nous envisageons différentes manipulations à partir de quatre souches (§ II p. 52) : *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis*, *Alteromonas communis*.

2. Milieu de culture

Nous utilisons un milieu minimum afin de vérifier la capacité des souches à réduire l'OTMA et la dégradation de la TMA en méthylamine et en formol. Le milieu est composé de 5 g de glucose, 5 g de NaCl, 5 g de K₂HPO₄, 2 g de KH₂PO₄, 2 g NH₄H₂PO₄, 0,2 g de MgSO₄, 7H₂O, 0,02 g de MnSO₄, 4H₂O, 0,005 g de FeCl₃, q.s.p. 1 L d'eau déminéralisée. Le pH est ajusté à 6,8 ± 0,2. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 min.

3. Solutions

Des solutions, d'OTMA, de TMA, de méthylamine, de glycoColle, de glutamate, de KNO₃, de DL alanine, de β alanine, de phosphorylcholine, de phosphatidylcholine, de choline sont préparées à 6,5 g pour 100 ml.

Des solutions de bétaïne, de glycérophosphorylcholine, de phosphatidyléthanolamine sont préparées à 100 mg pour 100 ml.

Une solution de formol est préparée à 800 µg/ml.

Les solutions sont stérilisées sur filtre (0,2 µm) et conservées au réfrigérateur à 5°C.

4. Méthodes

Pour démontrer le cycle de dégradation de l'OTMA, on ajoute à 9 ml de milieu minimum par tube :

N° tube	OTMA	TMA	DMA	Méthylamine	KNO ₃	Glutamate	Glycocolle	formol
1								
2	0,5 ml							
3		0,5 ml						
4			0,5 ml					
5				0,5 ml				
6					0,5 ml			
7						0,5 ml		
8							0,5 ml	
9								100 µl
10	0,5 ml	0,5 ml						
11	0,5 ml		0,5 ml					
12	0,5 ml			0,5 ml				
13	0,5 ml				0,5 ml			
14	0,5 ml					0,5 ml		
15	0,5 ml						0,5 ml	
16	0,5 ml							100 µl
17		0,5 ml				0,5 ml		
18			0,5 ml			0,5 ml		
19				0,5 ml		0,5 ml		
20							0,5 ml	100 µl
21	0,5 ml	0,5 ml				0,5 ml		
22	0,5 ml		0,5 ml			0,5 ml		
23	0,5 ml			0,5 ml		0,5 ml		
24	0,5 ml						0,5 ml	100 µl

On ajoute à 9 ml de milieu minimum par tube pour démontrer la dégradation des "oxydes d'amines tertiaires" :

N° tube

- 25 - 0,5 ml de bétaïne,
- 26 - 0,5 ml de DL alanine,
- 27 - 0,5 ml de β alanine,
- 28 - 0,5 ml de choline,
- 29 - 0,5 ml de glycérophosphorylcholine
- 30 - 0,5 ml de phosphorylcholine,
- 31 - 0,5 ml de phosphatidylcholine,
- 32 - 0,5 ml de phosphatidyléthanolamine.

Ajouter à ces tubes 100 µl d'une solution de peptone-sel (Oxoid) contenant 10^6 - 10^7 bactéries par ml.

Pour s'assurer des conditions d'anaérobiose ou de microaérobiose, on ajoute 1 ml d'huile de paraffine dans chaque tube avant incubation à 25°C pendant au moins 24 h.

Sur chaque tube, il sera réalisé un dosage de la TMA (Conway, 1962) un dosage de méthylamine (C.L.H.P.) et un dosage du formol produit.

E. Statistiques

Nous utiliserons l'outil statistique pour guider nos choix dans l'optimisation de nos démarches et la réalisation de modèles mathématiques.

Les statistiques seront utilisées aussi bien pour les études microbiologiques que biochimiques.

Les principales démarches de sélection de milieux, du mode de culture, et de modélisation de courbes, seront réalisées par le programme STAT-ITCF version 5.0.

Nous utilisons différents tests pour interpréter nos résultats :

- le test de Student (test-t) permet la comparaison des moyennes (deux variables aléatoires) de deux échantillons indépendants de distribution normale. Il permet d'affirmer à un risque d'erreur de 5 %, ou 1 %, ou 0,1 % une différence entre les échantillons.

- l'analyse de variance (ANOVA) permet la comparaison de plusieurs moyennes d'échantillons (au moins deux) sous l'influence de différents facteurs. Il faut pour cela que l'on ait une distribution normale de ces variables aléatoires échantillonnées (résultats indépendants), une homogénéité des variances (si ce n'est pas le cas on réalise une transformation ex. : $\log x$). Le test de Fisher (test-F) permet de faire le test d'hypothèse nulle et ainsi d'affirmer au risque d'erreur de 5 %, ou 1 %, ou 0,1 % (probabilité), si les moyennes sont dans leur ensemble différentes.

Pour l'analyse de variance nous utilisons les termes de :

- facteur contrôlé ; ensemble des traitements (ex. : mode de culture, température de culture, milieu de culture, espèce de poisson, concentration en sel ...),

- niveau contrôlé ; ensemble des modalités d'un facteur (ex. 4 modes de culture, 3 espèces de poisson, 2 milieux de culture ...),

- niveau ordonné ; la relation entre les niveaux d'un facteur (ex. 0,5 % entre les concentrations en sel, 24 h entre chaque prélèvement).

L'analyse de variance permet à partir d'un ensemble de résultats de distribution normale de regarder l'influence d'un ou de plusieurs facteurs intervenant dans les manipulations (effets identiques ou non).

Une fois les niveaux (I, J) des facteurs contrôlés définis, le choix des observations devra se faire selon les règles habituelles de la randomisation : n unités expérimentales sur lesquelles nous pourrons obtenir les résultats y_{ij} .

Nous pourrons ainsi calculer à partir des résultats :

- $S_{yy} = \sum_{i=1}^{I-1} \sum_{j=1}^{J-1} (y_{ij} - \bar{y})^2$: variation centrée des observations,

- $SM = \sum_{i=1}^{I-1} \sum_{j=1}^{J-1} (\bar{y}_i - \bar{y})^2$: variation contrôlée,

- $SR = \sum_{i=1}^{I-1} \sum_{j=1}^{J-1} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$: variation résiduelle non contrôlée,

- avec la relation des variations : Totale = Modèle + Résiduelle

$$S_{yy} = SM + SR$$

On peut résumer cette décomposition dans un tableau d'analyse de variance suivant :

Origine de la variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carrés moyens	test-F $F_{I-1, n-I}$
Totale	S_{yy}	$n - 1$		
Modèle	SM	$I - 1$	$SM / (I - 1)$	$[SM / (I - 1)] / s^2$
Résiduelle	SR	$n - I$	$SR / (n - I) = s^2$	

Si le modèle statistique comporte plusieurs facteurs il suffit d'écrire le modèle statistique (M) correspondant à la situation expérimentale.

Par exemple, s'il y a deux facteurs [A avec i niveaux (résultats notés a) et B avec j niveaux (résultats notés b)] avec r répétitions on a :

Modèle : $y_{ijr} = \mu + a_i + b_j + c_{ij} + \epsilon_{ijr}$

Somme des carrés : $S_{yy} = SA + SB + SAB + SR$

Degrés de liberté : $IJR - 1 = I - 1 + J - 1 + (I - 1) \times (J - 1) + IJ \times (R - 1)$.

Pour le calcul des sommes de carrés associées aux différentes variations, nous avons des formules analogues aux précédentes (p. 70) mais en fonction des i, j niveaux et r répétitions.

Avec ces résultats les différents test-F calculés permettent de faire les tests d'hypothèse nulle (H) correspondant à la loi de Fisher sur les coefficients du modèle :

$$\begin{aligned}H_A &: "a_i = 0" \text{ contre l'alternative A : } "a_i \neq 0" \\H_B &: "b_j = 0" \text{ contre l'alternative A : } "b_j \neq 0" \\H_{AB} &: "c_{ij} = 0" \text{ contre l'alternative A : } "c_{ij} \neq 0"\end{aligned}$$

Le test-F permet d'évaluer la probabilité des comparaisons comme suit :

- probabilité inférieure à 0,001, on a une différence significative à 99,9 % entre les facteurs,
- probabilité de 0,001 à 0,010, on a une différence significative à 99 % entre les facteurs,
- probabilité de 0,0100 à 0,0500, on a une différence significative à 95 % entre les facteurs,
- probabilité supérieure à 0,0500, on n'a pas de différence significative entre les facteurs.

Si l'analyse de variance indique des différences significatives pour un facteur ayant des niveaux ordonnés, on peut se demander si ces différences ne peuvent pas s'expliquer simplement par une tendance linéaire (effet linéaire : $y = ax + b$) ou voire de manière plus complexe par une tendance quadratique (effet quadratique : $y = ax^2 + bx + c$).

Si la tendance est linéaire, l'effet quadratique n'est pas significatif. Si la tendance est quadratique, l'écart entre l'effet global (facteur) et la prise en compte des deux autres effets (linéaire et quadratique) n'est pas significatif.

Afin de réaliser des prédictions à partir de nos résultats aléatoires, nous cherchons à les modéliser. Dans un premier temps, nous réalisons une observation du nuage de points obtenu par nos résultats afin de choisir le type de modèle théorique (linéaire, croissance sigmoïde, exponentiel...). Dans un deuxième temps, la qualité de l'ajustement du modèle à nos résultats se fera par comparaisons des variances résiduelles ($\Sigma^2/d.d.l. =$ somme des carrés résiduelle / degré de liberté) : plus la variance résiduelle d'un modèle estimé est petite, plus il est proche de l'évolution de nos résultats (pour des populations ceci se traduit par la réalisation d'un test-F).

Pour une même série d'expérience réalisée sur différents lots de poissons, différents modèles de type sigmoïde peuvent être retenus.

Ces modélisations permettent une évaluation générale de nos expérimentations.

Les modèles théoriques utilisés sont :

- soit linéaire : utilisé pour l'évaluation des quantités d'amines et de nucléotides récupérés

$$Y = \alpha x + \beta, \text{ dont les paramètres estimés respectifs sont } a \text{ et } b,$$

- soit de type sigmoïde : utilisé pour l'évolution des dénombrements et des différentes activités des flores :

- le modèle logistique d'équation : $Y = \alpha / [1 + \beta \times \exp(-\gamma x)]$, dont les paramètres estimés respectifs sont a, b et c,

- le modèle de Gompertz d'équation : $Y = \alpha \times \exp[\beta \times \exp(-\gamma x)]$, dont les paramètres estimés respectifs sont a, b et c,

- le modèle monomoléculaire d'équation : $Y = \alpha - \beta \times \exp(-\gamma x)$, dont les paramètres estimés respectifs sont a, b et c,

- soit de type exponentiel : utilisé pour un rapport d'activités bactériennes:

- le modèle d'équation : $Y = \alpha \exp(-\beta x)$, dont les paramètres estimés respectifs sont a et b.

Les démarches statistiques sont inspirées du livre de Biométrie de Tomassone et coll., (1993).

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

A. Etudes microbiologiques

I. Détermination du mode de culture

1. Nature de l'ensemencement

A partir des différents modes de culture et du milieu H₂S présentés dans le chapitre II (§ V et VII p. 53-54), des dénombrements (tableau 15) ont été réalisés après incubation à 25°C à partir de suspensions bactériennes contenant :

- soit *Shewanella putrefaciens* qui est la souche bactérienne témoin (H₂S⁺) sur le milieu H₂S,
- soit les bactéries d'un tacaud altéré (ABVT > 30 mg d'azote / 100 g de chair).

Les colonies H₂S se colorent en noir par précipitation du sulfure ferreux (FeS). Le dénombrement de l'ensemble des unités formant colonie (ufc) correspond à la flore totale.

Tableau 15. Dénombrements réalisés sur milieu H₂S suivant différents modes d'ensemencement.

x ± σ	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Tacaud	
	10 ⁶ ufc/g	Flore totale 10 ⁶ ufc/g	Flore H ₂ S 10 ⁴ ufc/g
nombre de mesures = 35			
Masse	5,87 ± 1,19	4,87 ± 0,86	3,17 ± 2,22
Masse + couche	3,67 ± 1,42	4,61 ± 0,82	2,40 ± 1,64
Spiral	11,9 ± 1,65	7,39 ± 1,45	3,51 ± 2,11
Spiral + couche	7,29 ± 1,11	6,88 ± 1,19	3,34 ± 1,63

Une analyse de variance (tableau 16) a été réalisée sur l'ensemble des dénombrements en fonction de deux facteurs : le mode d'ensemencement (quatre niveaux) et le type de flore (trois niveaux). Elle a permis de montrer des différences significatives entre les modes

d'ensemencement : la méthode Spiral permet d'obtenir les meilleurs dénombrements (tableau 15) et l'ensemencement en masse les moins bons quelle que soit la flore étudiée.

Tableau 16. Analyse de variance des dénombrements des flores totale et H₂S obtenus sur le milieu H₂S.

Variable	d.d.l.	Carrés moyens	test-F	Probabilité
Totale	419	8253563		
Ensemencement	3	25611434	60,41	< à 10 ⁻⁴
t				
Flore	2	1539276416	3630,98	< à 10 ⁻⁴
Interaction	6	21644672	51,06	< à 10 ⁻⁴
Résiduelle	408	423928,4		

d.d.l. : degré de liberté ; test-F : test de Fisher

L'analyse de variance nous montre également des différences significatives entre les types de flore : la flore H₂S ne représente pas 1 % de la flore totale dans cet exemple et d'autre part, les dénombrements de la souche sont indépendants de ceux réalisés avec le poisson.

Ces résultats ne sont pas surprenants, en effet, *Shewanella putrefaciens* est une bactérie aérobique qui représente la majeure partie de la flore H₂S (Gram et coll., 1987 ; Jorgensen et Huss, 1989). La flore d'altération du poisson est considérée comme étant généralement aérobique (Skovgaard, 1979).

L'ensemencement en masse (NF ISO 4833) réalisé pour le dénombrement de la flore aérobique mésophile totale est moins bien adapté pour l'évaluation des flores du poisson. Nous réaliserons donc dans nos prochaines expérimentations un ensemencement par la **méthode Spiral** (NF V08-100).

Des expériences complémentaires sont réalisées sur deux lots de poisson (rascasse entière et morue éviscérée) conservés sous glace à 0°C. Selon échantillonnage présenté chapitre II (§ A. p. 51), des ensemencements ont été réalisés en masse et au Spiral avec le milieu sélectif pour le dénombrement optimal des flores totale et H₂S (§ 3.1. p. 103) en ajoutant 2g/l d'OTMA (donneur d'oxygène § c. p. 117).

Nous avons obtenu les mêmes résultats : il y a 2 à 10 fois plus de bactéries dénombrées par la méthode Spiral. Il semble donc que cette différence ne soit pas due aux conditions micro-aérobies de la culture en masse mais plutôt à un stress thermique et/ou des problèmes liés aux dilutions à réaliser lors de l'ensemencement en masse.

2. Température d'incubation

Nous avons réalisé des dénombrements à différentes températures (20, 25 et 30°C chap. II § 2. p. 55) sur milieu H₂S à partir des mêmes suspensions bactériennes utilisées lors de l'étude du mode d'ensemencement (§ 1. p. 73). Les moyennes et écarts-types de ces dénombrements sont présentés dans le tableau 17 après 72 h d'incubation.

Tableau 17. Dénombrements réalisés sur milieux H₂S suivant différentes températures d'incubation.

$x \pm \sigma$ (n = 35)	<i>Shewanella</i> <i>putrefaciens</i>	Tacaud	
	10 ⁷ ufc/ml	Flore totale 10 ⁵ ufc/g	Flore H ₂ S ufc/g
20°C	2,38 ± 0,29	423,77 ± 54,27	4761 ± 1554
25°C	2,40 ± 0,27	54,97 ± 11,12	9407 ± 5557
30°C	2,37 ± 0,40	4,91 ± 2,19	3253 ± 1009

Une analyse de variance (tableau 18 p. 76) a été réalisée sur l'ensemble des résultats en fonction de deux facteurs : la température d'incubation (trois niveaux) et le type de flore (trois niveaux). Elle a permis de montrer des différences significatives entre les températures d'incubation : la flore H₂S et *Shewanella putrefaciens* sont mieux dénombrées à 25°C en revanche, la flore totale est mieux dénombrée à 20°C (tableau 17).

Ces résultats montrent également qu'il y a bien une relation entre la souche *Shewanella putrefaciens* et la flore H₂S car la température optimale de développement est identique pour ces bactéries.

Il y a comme pour le mode d'ensemencement des différences significatives entre les types de flore : il y a une faible représentation de la flore H₂S dans la flore totale et les dénombrements de la souche sont indépendants de ceux réalisés avec le poisson.

Tableau 18. Analyse de variance des dénombrements des flores totales et H₂S obtenus sur le milieu H₂S

Variable	d.d.l.	Carrés moyens	test-F	Probabilité
Totale	314	13033083		
Ensemencement	2	1100684544	288,61	< à 10 ⁻⁴
Flore	2	117782016	30,88	< à 10 ⁻⁴
Interaction	4	122111808	32,02	< à 10 ⁻⁴
Résiduelle	306	3813750,75		

d.d.l. : degré de liberté ; test-F : test de Fisher

Pour la suite de nos expérimentations, les milieux de culture seront placés à **25°C pour le dénombrement de la flore H₂S**, et à **20°C pour le dénombrement de la flore totale** et non plus à 30°C (norme NF V08-51).

3. Durée d'incubation

Les dénombrements réalisés pour l'évaluation de la température optimale des flores totales et H₂S (§ 2.) à 72 h ont été de nouveau réalisés à 96 h. La législation (NF V08-51) mentionne un temps de lecture compris entre 3 et 5 jours.

Les dénombrements obtenus à 96 h sont identiques à ceux de **72 h**, il est donc inutile d'augmenter la durée d'incubation.

On peut remarquer que les colonies à 96 h ont un diamètre plus important que celles à 72 h, ce qui peut engendrer des erreurs supplémentaires de lecture (dénombrements inférieurs). D'autre part, une décoloration des colonies noires peut apparaître.

II. Recherche d'un milieu pour le dénombrement de la flore totale

Le but de ces travaux est de déterminer un milieu de culture optimal pour le dénombrement de la flore totale quelle que soit l'espèce de poisson marin étudiée.

1. A partir des milieux conventionnels

Les dénombrements de la flore totale ne se font généralement que sur le milieu PCA (NF V08-51). Le milieu TSA peut également être utilisé à cet effet (Liston, 1980).

A partir de lots de merlans, de rascasses et de tacauds provenant de pêche industrielle (chap. II § A. p. 51), nous avons comparé les dénombrements de flore totale obtenus par les mêmes échantillons sur les milieux PCA et TSA supplémentés en NaCl (0 à 3,5 % (p/v)).

Quotidiennement pendant 15 jours un prélèvement stérile de la chair de trois poissons par lot a été réalisé pour l'évaluation de la flore totale.

1.1. Analyse statistique

Nous avons réalisé une analyse de variance (tableau 19 p. 78) avec les dénombrements obtenus en fonction de différents facteurs (F) :

- l'espèce de poisson (3 niveaux),
- le milieu de culture (2 niveaux),
- la concentration en sel (7 niveaux ordonnés, de 0,5 à 3,5 %)
- l'évolution de l'altération (15 niveaux ordonnés, 15 jours),

Il faut toutefois noter que nous allons étudier les dénombrements (logarithme en base 10 : log) et il y a confusion d'effet entre l'espèce et la flore bactérienne. En effet, nous avons vu dans le chapitre I que les dénombrements des flores initiales de contamination dépendent principalement de l'environnement (zone de pêche), de l'alimentation, du mode de pêche et des manipulations réalisées sur le poisson. Chaque lot de poisson a obligatoirement sa propre charge bactérienne et sa propre flore (Ces remarques sont également valables pour l'étude de la flore à Gram négatif et de la flore H₂S). La divergence entre espèces se traduira surtout par l'effet altération : l'évolution des dénombrements peut être divergente entre les espèces.

Tableau 19. Analyse de variance des dénombrements de la flore totale à 20°C obtenus à partir de merlans, rascasses et tacauds sur les différents milieux PCA et TSA pendant 15 jours d'altération.

Variable	Σ des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	test-F	Probabilité
Totale	2332,00	1889	1,23		
Espèce = F1	130,10	2	65,05	485,34	< à 10^{-4}
Milieu = F2	9,99	1	9,99	74,57	< à 10^{-4}
[NaCl] = F3	15,90	6	2,65	19,77	< à 10^{-4}
effet linéaire	9,97	1	9,97	76,69	< à 10^{-4}
effet quadratique	5,66	1	5,66	43,53	< à 10^{-4}
écart	0,27	4	0,07	0,52	> 0,050
Altération = F4	1809,29	14	129,23	964,24	< à 10^{-4}
effet linéaire	1759,00	1	1759,00	13530,77	< à 10^{-4}
effet quadratique	27,53	1	27,53	211,77	< à 10^{-4}
écart	22,76	12	1,90	14,59	< à 10^{-4}
F1 × F2	1,75	2	0,87	6,52	0,0017
F1 × F3	2,01	12	0,17	1,25	0,2446
F1 × F4	174,20	28	6,22	46,42	< à 10^{-4}
effet linéaire	37,72	2	18,86	145,08	< à 10^{-4}
effet quadratique	5,75	2	2,88	22,15	< à 10^{-4}
écart	130,73	24	5,45	41,92	< à 10^{-4}
F2 × F3	0,57	6	0,09	0,71	0,6458
F2 × F4	2,64	14	0,19	1,41	0,1409
F3 × F4	2,58	84	0,03	0,23	> 0,9382
F1 × F2 × F3	0,74	12	0,06	0,46	0,9382
F1 × F2 × F4	4,93	28	0,18	1,31	0,1263
F1 × F3 × F4	4,58	168	0,03	0,20	> 0,9382
F2 × F3 × F4	1,04	84	0,01	0,09	> 0,9382
F1 × F2 × F3 × F4	2,80	168	0,02	0,12	> 0,9382
Résiduelle	168,88	1260	0,13		

d.d.l. : degré de liberté ; test-F : test de Fisher

Cette étude montre :

(1) Des différences significatives suivant l'espèce : on observe des moyennes de $4,49 \pm 0,34$ log ufc/g, $5,06 \pm 0,22$ log ufc/g et $4,52 \pm 0,32$ log ufc/g respectivement pour le merlan, la rascasse et le tacaud (tableau 20 p. 80). Les charges bactériennes étant initialement différentes suivant l'espèce il est normal de retrouver ce résultat.

(2) Des différences significatives suivant le milieu : on observe en moyenne sur PCA $4,62 \pm 0,30$ log ufc/g et sur TSA $4,76 \pm 0,30$ log ufc/g. Le milieu TSA permet d'obtenir le plus grand nombre de bactéries. Il y a peut être un effet du pH du milieu sur les dénombrements.

(3) Des différences significatives suivant la concentration en sel : les dénombrements ne sont pas identiques suivant la concentration en sel. Ce facteur décomposé en différents effets montre une tendance quadratique. On a une relation quadratique d'équation :

$$Y = 4,6929 - 0,0364x - 0,0160(x^2 - 4)$$

La dérivée $-0,0364 - 0,0320x$ est nulle pour $x = -1,1375$ soit pour 1,43 % (p/v) en NaCl (= $0,5$ (% de NaCl) $\times (-1,1375) + 2$)).

La concentration en sel (NaCl) optimale pour le développement de la flore totale est donc estimée à 1,43 % (p/v) quel que soit le milieu (PCA ou TSA).

Comme les dénombrements les plus importants sont obtenus sur TSA nous avons calculé l'équation de la courbe polynomiale des dénombrements moyens en fonction des concentrations en sel :

$$Y = -0,013x^2 + 0,072x + 4,7243 \text{ la dérivée est nulle pour } x = 2,76923 \times 0,5 = 1,38 \text{ \% de sel}$$

La concentration en sel optimale pour le développement de la flore totale sur TSA est de 1,38 % (p/v) quels que soient l'espèce de poisson de mer et le nombre de jours d'altération.

Ceci confirme les propositions de certains auteurs d'ajouter 1 % NaCl pour faciliter le dénombrement de la flore totale (Liston, 1980 ; Leclerc et Mossel, 1989). La flore totale aérobique de la chair de poisson de mer est à classer parmi les halophiles modérées.

(4) Des différences significatives suivant les jours d'altération : le dénombrement bactérien augmente au cours de l'altération et de façon non linéaire et non quadratique. L'écart entre l'effet global (facteur jours) et la prise en compte des deux effets est significatif, Il existe donc des variations importantes entre les cinétiques des dénombrements en fonction de l'altération des espèces.

Les modèles retenus seraient de type Gompertz (tableau 21 p.81). Ce modèle ne donne pas les meilleures variances résiduelles pour chaque espèce (même s'il y a peu de différence) mais il permet de comparer les cinétiques. La comparaison du modèle regroupant les trois espèces (complet) et ceux de chaque espèce (test- $F_{(6, 36)} = 6,7646$) montre une différence significative à 99,9 %. On ne peut donc regrouper l'ensemble des modèles en un seul.

On peut donc s'attendre à des cinétiques d'évolution de la flore totale différentes suivant les espèces.

(5) Des différences significatives suivant l'interaction espèce et milieu : les dénombrements ne sont pas identiques entre les espèces suivant les milieux.

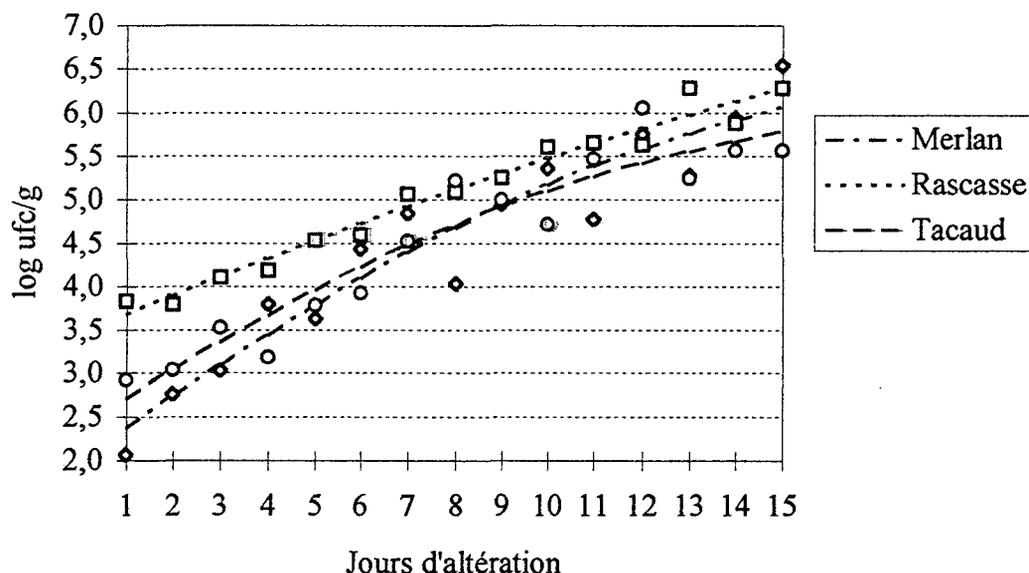
On a (tableau 20) des dénombrements moyens systématiquement plus importants sur TSA même si la charge bactérienne est différente suivant les espèces.

Tableau 20. Dénombrements moyens ($\bar{x} \pm \sigma$) obtenus en fonction de l'interaction espèce et milieu.

log ufc/g	Merlan	Rascasse	Tacaud
PCA	4,39 ± 0,34	5,03 ± 0,22	4,43 ± 0,33
TSA	4,58 ± 0,34	5,09 ± 0,22	4,62 ± 0,32
Moyenne	4,49 ± 0,34	5,06 ± 0,22	4,52 ± 0,32

(6) Des différences significatives suivant l'interaction espèce et altération : l'évolution des dénombrements en fonction des jours d'altération n'est pas identique entre les espèces (figure 4). Les poissons ne s'altèrent pas de la même façon et à la même vitesse.

Figure 4. Modélisations des dénombrements de la flore totale des trois espèces étudiées en fonction des jours d'altération.



L'interaction espèce et altération ne se décompose pas en effet linéaire ni en effet quadratique. Ceci signifie que si la charge bactérienne est différente suivant l'espèce, les tendances (évolution) le sont aussi. Ceci confirme les résultats obtenus au paragraphe (4) page 78 à partir des modélisations réalisées (tableau 21 p. 81) afin de pouvoir observer les cinétiques des évolutions de la flore totale en fonction des jours d'altération.

On constate également qu'il n'y a pas de phase de latence.

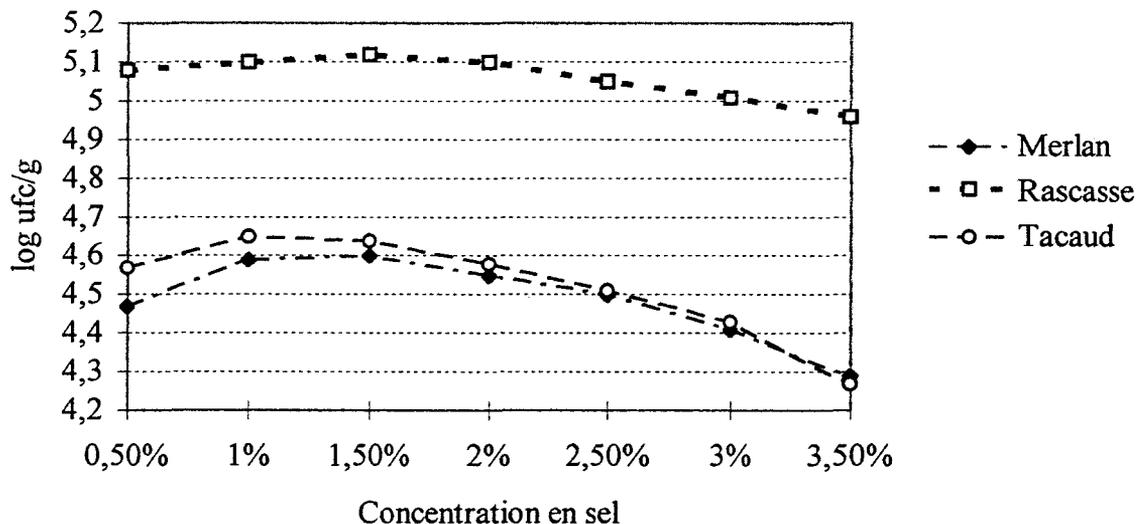
Tableau 21. Estimation a,b,c des différents paramètres du modèle de Gompertz retenu pour l'évaluation de la flore totale en fonction des jours d'altération.

Espèce	a	b	c	Σ^2	d.d.l.
Merlan	7,0896	0,1738	0,1382	1,8846	12
Rascasse	8,8644	0,0625	0,0666	0,2958	12
Tacaud	6,5216	0,1428	0,1412	1,4622	12
Complet	7,1780	0,1190	0,1174	7,7494	42

d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle

(7) On peut également noter qu'il n'y a pas de différence significative entre l'interaction espèce et concentration en sel : l'évolution des dénombrements moyens en fonction de la concentration en sel est sensiblement la même pour les trois espèces (figure 5).

Figure 5. Modélisations des dénombrements moyens de la flore totale pour les trois espèces étudiées en fonction de la concentration en sel.



Chez le merlan la concentration optimale pour le développement de la flore totale est de 1,35 % (p/v) en NaCl, chez la rascasse de 1,30 % (p/v) et chez le tacaud de 1,57 % (p/v) (pourcentages estimés suivant des courbes polynomiales théoriques $y = \alpha + \beta x + \gamma x^2$).

(8) On constate également que l'interaction entre les différents effets ne montre pas de différence significative. On prend donc bien en considération les facteurs les plus importants pour cette étude.

Nous venons donc de montrer que le dénombrement de la flore totale d'espèces marines ayant des charges bactériennes différentes (effet espèce) est optimal sur milieu TSA (effet milieu) ayant une concentration en sel (NaCl) optimale de 1,38 % (p/v) (effet sel) même si les cinétiques des évolutions de la flore totale sont différentes suivant les espèces conservées dans les mêmes conditions (effet altération).

1.2. Seuil de dénombrement

A partir de deux des trois espèces citées dans le paragraphe précédent (rascasse et tacaud) nous avons réalisé différents dosages (ABVT, TMA) et évaluation de fraîcheur (I.F.) quotidiennement sur chaque échantillon de poisson (tableau 22 p. 83).

Le premier objectif est d'essayer de déterminer la cinétique de l'évolution de la flore totale (logarithme) obtenus sur TSA 1,5 % (concentration la plus proche de la concentration optimale 1,38 %) en fonction de ces dosages ou évaluation.

Ceci nous permettra dans un deuxième temps de pouvoir évaluer la qualité d'un poisson par un dénombrement de la flore totale. Nous nous intéresserons plus particulièrement à un dénombrement "seuil" permettant de classer les poissons inconsommables au même titre qu'un ABVT > 30 mg d'azote /100g de chair ou P > 30 % ou I.F. > 3.

Les résultats du tableau 22 montrent des divergences entre les seuils de rejet suivant l'I.F., le dosage de l'ABVT ou le rapport P pour une même espèce. Il apparaît clairement qu'il faudra prendre en considération dans les premières analyses l'ensemble de ces paramètres.

On remarque également qu'avec un poisson altéré (grisé) quels que soient l'indice (I.F.>3) ou dosages (ABVT>30 mg d'azote/100 g de chair et P>30 %) possède un dénombrement de la flore totale supérieur à 100.000 ufc/g ($5 = \log 10^5$).

Tableau 22. Evaluation de l'altération des lots de rascasses et de tacauds.
(moyennes regroupant par I.F. de 1 à 4 résultats)

I.F.	Rascasse				Tcaud			
	TSA 1,5 %	ABVT	TMA	P	TSA 1,5 %	ABVT	TMA	P
1,5					3,01	15,79	0,40	2,53
1,6					2,96	13,61	0,50	3,67
1,7					3,12	14,70	0,40	2,72
1,8	3,84	13,19	0,84	6,32				
1,9	4,11	14,11	1,18	8,36				
2					3,79	13,50	1,68	12,44
2,1	3,91	14,05	1,12	7,90	3,02	14,41	1,56	10,81
2,2	3,85	13,95	1,35	9,61				
2,3	4,54	12,35	1,01	8,15				
2,4	4,22	13,36	1,85	13,88	3,17	15,70	1,43	9,07
2,5	4,79	15,79	4,20	26,54	4,19	14,40	1,85	12,85
2,6	4,49	13,44	7,22	53,72	3,15	16,30	2,35	14,45
2,7	4,70	14,22	2,91	20,52	3,72	16,72	2,28	13,61
2,8	5,19	15,29	2,52	16,48	4,25	17,51	2,32	13,25
2,9	5,03	15,12	2,86	18,92	4,11	28,56	2,20	7,70
3	5,15	14,78	3,70	25,03	4,61	18,90	5,96	29,51
3,1	5,15	23,35	10,58	45,26	4,41	18,40	4,37	23,90
3,2	5,16	16,80	6,05	36,01	5,35	24,44	6,72	27,50
3,3	5,17	24,25	9,45	38,95	5,53	25,38	8,49	33,39
3,4	5,52	30,06	13,50	44,01				
3,5	5,84	32,83	15,56	46,70	5,16	20,66	6,20	30,01
3,6	5,60	19,60	6,20	31,63	5,20	27,79	8,99	32,30
3,7	5,62	35,62	21,42	56,83				
3,8					5,07	31,60	12,71	40,19
3,9	5,92	38,64	17,98	46,53	5,79	31,08	10,08	32,29
4					5,49	52,92	25,20	47,62
4,1					6,51	31,92	11,76	36,84
4,2	5,67	35,95	16,13	44,87				
4,3	6,24	49,73	23,02	46,29	6,08	38,22	17,05	43,58
4,4					5,36	36,96	15,12	40,91
4,5	6,21	55,82	32,51	57,81	5,50	50,82	22,68	44,55
4,6								
4,7	5,88	66,86	36,62	54,77	5,68	38,22	14,70	38,44
4,8					5,96	41,16	17,39	42,32
4,9	6,32	81,98	52,92	64,55				
5	6,45	66,28	46,62	70,36	5,89	49,14	20,16	40,96

Si I.F. > 3 , ABVT > 30 mg d'azote pour 100 g de chair et P > 30 %, le poisson n'est plus consommable (grisé); TSA 1,5 % : log des dénombrements obtenus sur TSA 1,5 %

Nous avons donc estimé pour l'ABVT, P, et l'I.F., différents modèles afin d'établir avec précision un "seuil" de rejet (tableau 23).

Tableau 23. Estimation a, b, c des différents paramètres des modèles retenus pour l'évolution de la flore totale en fonction de l'ABVT, P et de l'I.F.

Dosage ou indice	Espèce	a	b	c	Σ^2	d.d.l.	Modèle	Seuil théorique
ABVT								
	Rascasse	6,2433	4,9868	0,0716	6,1660	42	monomoléculaire	458.410
	Tacaud	5,7716	8,3077	0,1673	11,5095	42	logistique	295.875
P								
	Rascasse	7,2475	3,6459	0,0174	7,0407	42	monomoléculaire	121.414
	Tacaud	6,2646	1,5368	0,0645	10,8918	42	logistique	133.881
I.F.								
	Rascasse	6,8302	3,2698	0,7490	3,1560	42	logistique	119.039
	Tacaud	6,7145	5,6921	0,8033	10,6763	42	logistique	27.727
	Complet	6,7601	4,0211	0,7559	21,7067	87	logistique	59.263
	Borne sup	7,6177	5,9250	1,0607				1.301.134
	Borne inf	5,9024	2,1173	0,4511				6.534

d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle ; Seuil théorique en ufc/g de chair ; Borne sup et Borne inf. intervalle de confiance approché à 95%.

On constate que les modélisations pour chaque espèce en fonction de l'ABVT ou P ne sont pas les mêmes. On ne peut donc pas réaliser un modèle commun (complet) fiable. D'autre part les sommes des carrés résiduelles des modèles obtenus en fonction de l'ABVT ou P sont plus fortes que celles des modèles obtenus en fonction de l'I.F. Les modèles obtenus en fonction de l'ABVT et P sont donc moins précis.

Les modélisations réalisées pour les deux espèces en fonction de l'I.F. appartiennent au même modèle théorique, on peut donc évaluer un seul modèle pour les deux espèces. Mais il est préférable de réaliser un modèle pour chaque espèce car la comparaison avec le modèle complet montre une différence significative à 99,9 % (test- $F_{(3,84)} = 15,9397$).

Suivant ces modélisations en fonction de l'I.F. Il convient d'être prudent sur le dénombrement de la flore totale d'un poisson altéré, nous avons une fourchette très large. En

faisant référence à la législation, un poisson est consommable si son dénombrement est inférieur à 100.000 ufc/g et il est rejeté à 1.000.000 ufc/g (10 fois la norme). On se retrouve donc dans le même intervalle, les variations que nous obtenons dépendent de la variabilité expérimentale.

2. A partir des milieux "H₂S"

Nous avons travaillé quotidiennement sur un nouveau lot de tacauds conservés entiers sous glace à 0°C. Des dénombrements de la flore aérobique totale ont été réalisés sur les milieux PCA-H₂S (0 à 3,5 %), TSA-H₂S (0,5 à 3,5 %), H₂S (0,5 à 3,5 %) (chap. II § VI. p. 54) après ensemencement par la méthode Spiral. L'incubation de cette flore totale a été réalisée à 25°C pendant 72 h. (Oxoid).

Nous avons réalisé une analyse de variance (tableau 24) avec les dénombrements (logarithme) obtenus en fonction de différents facteurs :

- le milieu de culture (3 niveaux),
- la concentration en sel (7 niveaux ordonnés, de 0,5 à 3,5 %)
- l'évolution de l'altération (15 niveaux ordonnés, 15 jours).

Tableau 24. Analyse de variance des dénombrements de la flore totale à 25°C obtenus à partir de tacauds sur milieux PCA-H₂S, TSA-H₂S et H₂S pendant 15 jours d'altération.

Variable	Σ des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	test-F	Probabilité
Totale	677,17	902	0,75		
Milieu = F1	0,10	2	0,05	0,37	0,6975
[NaCl] = F2	1,01	6	0,17	1,20	0,3056
Altération = F3	586,47	14	41,89	297,25	< à 10 ⁻⁴
effet linéaire	421,16	1	421,16	3008,29	< à 10 ⁻⁴
effet quadratique	46,03	1	46,03	328,79	< à 10 ⁻⁴
écart	119,28	12	9,94	71,00	< à 10 ⁻⁴
F1 × F2	0,15	12	0,01	0,09	0,9900
F1 × F3	0,95	28	0,03	0,24	0,9900
F2 × F3	2,81	84	0,03	0,24	> 0,9900
F1 × F2 × F3	2,81	168	0,02	0,12	> 0,9900
Résiduelle	82,87	588	0,14		

d.d.l. : degré de liberté ; test-F : test de Fisher

Cette étude nous montre uniquement des différences significatives suivant l'altération : les dénombrements augmentent au court de l'altération de façon non linéaire et non quadratique. Mais l'écart entre le facteur jours d'altération et la prise en compte des effets

linéaire et quadratique est significatif. La recherche de l'équation de l'évolution de la flore totale en fonction des jours d'altération mène au modèle de type monomoléculaire :

$$Y = 5,2022 - 3,2829 \times \exp(-0,2765 \times J), \text{ avec } \Sigma^2 = 1,5702 \text{ et un d.d.l.} = 12.$$

Le modèle estimé n'est pas d'une très grande précision mais il nous indique qu'il n'y a pas de phase de latence.

On constate également que l'interaction entre les différents effets ne montre pas de différence significative. On prend donc bien en considération les facteurs les plus importants pour cette étude.

Ces milieux "H₂S" permettent des dénombrements similaires de la flore totale quelle que soit la concentration en sel. L'effet milieu ne montre pas de différences significatives, le pH du milieu ne semble donc pas influencer les dénombrements. On peut donc choisir *a priori* n'importe quel milieu avec n'importe quelle concentration en sel. Mais les travaux ne se sont pas bornés aux dénombrements de la flore totale sur ce type de milieu. L'étude s'est également portée sur le dénombrement la flore H₂S. Nous nous baserons sur cette flore et l'interaction qu'elle peut avoir avec la flore totale pour choisir le milieu optimal (§ IV. p. 100).

Les résultats du paragraphe IV (p. 100) ont permis de retenir le milieu PCA-H₂S 1,5%. Comme nous avons réalisé simultanément un dénombrement de la flore totale sur milieu TSA 1,5 % à 20°C, nous avons comparé les dénombrements obtenus sur PCA-H₂S 1,5% à 25°C et TSA 1,5% à 20°C.

3. Comparaison des conditions de culture de la flore totale

3.1. Analyse statistique

Cette comparaison permettra de déterminer si l'évaluation des flores totale et H₂S doit se faire sur un ou deux milieux de culture (PCA-H₂S 1,5 % à 25°C et TSA 1,5 % à 20°C).

Nous avons réalisé une analyse de variance (tableau 25 p. 87) avec les dénombrements (logarithme) obtenus en fonction de différents facteurs :

- les conditions de culture (2 niveaux),
- l'évolution de l'altération (15 niveaux ordonnés, 15 jours).

Tableau 25. Analyse de variance des dénombrements de la flore totale de tacauds obtenus sur milieux PCA-H₂S 1,5 % (25°C) et TSA 1,5 % (20°C) pendant 15 jours d'altération.

Variable	Σ des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	test-F	Probabilité
Totale	61,44	85	0,72		
Conditions de culture = F1	0,00	1	0,00	0,01	0,9262
Altération = F2	54,79	14	3,91	33,83	< à 10 ⁻⁴
effet linéaire	38,84	1	38,84	323,68	< à 10 ⁻⁴
effet quadratique	3,42	1	3,42	28,51	< à 10 ⁻⁴
écart	12,53	12	1,04	8,70	< 0,010
F1 × F2	0,17	14	0,01	0,10	0,9900
Résiduelle	6,48	56	0,12		

d.d.l. : degré de liberté ; test-F : test de Fisher

Cette étude nous montre uniquement des différences significatives suivant l'altération : les dénombrements augmentent au cours de l'altération de façon non linéaire et non quadratique. Mais l'écart entre le facteur jours d'altération et la prise en compte des effets linéaire et quadratique est significatif. La recherche de l'équation de l'évolution de la flore totale en fonction des jours d'altération mène au modèle de type monomoléculaire :

$$Y = 5,2617 - 3,0838 \times \exp(-0,2617 \times \text{Jour}), \text{ avec } \Sigma^2 = 1,7286 \text{ et un d.d.l.} = 12.$$

Le modèle estimé n'est pas d'une très grande précision mais il montre qu'il n'y a pas de phase de latence.

Cette analyse de variance ne montre pas de différence significative entre les conditions de culture : ces milieux (à 1,5 % (p/v) de NaCl) permettent un dénombrement similaire de la flore. On a, en moyenne, quels que soient les jours d'altération un dénombrement à 25°C sur PCA-H₂S 1,5 % de $4,58 \pm 0,27 \log \text{ ufc/g}$ et à 20°C sur TSA 1,5 % $4,59 \pm 0,28 \log \text{ ufc/g}$.

On constate également que l'interaction entre les différents effets ne montre pas de différence significative. On prend donc bien en considération les facteurs les plus importants pour cette étude.

Le milieu retenu pour le dénombrement de la flore totale de poisson de mer est donc le milieu qui permet pour des raisons pratiques de dénombrer simultanément la flore H₂S :

PCA-H₂S 1,5 % incubé à 25°C avec un ensemencement par la méthode Spiral.

L'ensemble des résultats obtenus sur la flore totale apporte des renseignements sur ses besoins nutritifs. Nous avons démontré que la flore totale dénombrée à partir de poisson de mer se développait mieux en aérobiose (§ 1. p. 73) à 20°C (§ 2. p. 75) et sur le milieu TSA additionné de 1,38 % de sel (§ 1. p. 77). Les derniers travaux montrent qu'elle se développe aussi bien à 25°C sur différents milieux (testés) additionnés de thiosulfate, de citrate de fer, de cystéine et de chlorure de sodium (§ 3. p. 86). On peut également remarquer que le dénombrement de la flore totale de poisson de mer dépend plus de la composition du milieu de culture que de son pH.

3.2. Seuil de dénombrement

a) Comparaison PCA-H₂S et TSA

A partir de l'espèce citée dans les paragraphes précédents (tacaud) nous avons réalisé différents dosages (ABVT, TMA) et évaluations (I.F.) quotidiennement sur chaque échantillon de poisson (tableau 22 p. 83). L'objectif est de comparer le "seuil" de dénombrement que l'on peut définir afin de le comparer à celui établi (§ 1.2. p. 82). Cette étude est réalisée à partir des dénombrements (logarithme) obtenus sur TSA 1,5 % et PCA-H₂S 1,5 % (concentration la plus proche de la concentration optimale 1,38 %).

Nous avons donc estimé les paramètres d'équation des différents modèles établis à partir des dénombrements en fonction de l'ABVT, P et I.F. (tableau 26 p. 89).

On remarque encore une fois (§ 1.2. p. 82) que les modèles estimés les plus fiables sont obtenus en fonction de l'I.F. (sommes des carrés résiduelles les plus faibles).

Les modèles réalisés en fonction de l'ABVT ont des intervalles approchés qui contiennent 0, ceci peut s'expliquer par un manque de précision des paramètres. Il aurait été souhaitable d'avoir plus d'observations pour les altérations très avancées (valeur de l'asymptote imprécise).

Les "intervalles approchés" des différents paramètres des modèles estimés en fonction de l'I.F. permettent de considérer qu'un poisson inconsommable a un dénombrement de la flore totale dépassant 200.000 ufc/g, mais il faut compléter l'étude sur d'autres espèces.

Tableau 26. Estimation a, b, c des différents paramètres des modèles retenus pour l'évaluation de la flore totale de tacaud sur TSA 1,5 % et PCA-H₂S 1,5 % en fonction de l'ABVT, P et I.F.

Dosage ou indice	Milieu	a	b	c	Σ^2	d.d.l.	Modèle	Seuil théorique
ABVT								
	PCA-H₂S 1,5 %	5,2222	13,2926	0,1271	13,3119	40	monomoléculaire	84.855
	borne sup.	5,5679	33,6150	0,2225				
	borne inf.	4,8765	-7,0299	0,0318				
	TSA 1,5 %	5,1492	25,9486	0,1670	13,3453	40	monomoléculaire	94.645
	borne sup.	5,4410	70,0203	0,2725				
	borne inf.	4,8574	-18,1232	0,0616				
P								
	PCA-H₂S 1,5 %	5,5692	2,8249	0,0380	8,1673	40	monomoléculaire	46.317
	borne sup.	6,2549	3,5084	0,0617				505.592
	borne inf.	4,8835	2,1414	0,0143				3.084
	TSA 1,5 %	5,3805	2,7603	0,0469	8,3580	40	monomoléculaire	50.648
	borne sup.	5,8826	3,3507	0,0728				320.143
	borne inf.	4,8783	2,1699	0,0211				5.322
I.F.								
	PCA-H₂S 1,5 %	5,4258	8,1451	1,4139	4,5186	40	logistique	71.914
	borne sup.	5,6504	14,2932	1,8052				205.465
	borne inf.	5,2011	1,9969	1,0226				57.409
	TSA 1,5 %	5,4100	6,2291	1,2737	4,3593	40	Gompertz	72.516
	borne sup.	5,6360	11,5805	1,6121				210.705
	borne inf.	5,1840	0,8776	0,9353				3.864

d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle ; Seuil théorique en ufc/g de chair ; borne sup. et borne inf. : intervalle de confiance approché à 95%

b) Comparaison avec d'autres espèces et modes de conservation

Afin de pouvoir évaluer l'influence de l'espèce, des périodes de pêche et des modes de conservation sur ce "seuil" de dénombrement PCA-H₂S 1,5%. Nous avons travaillé sur du tacaud pêché au printemps conservé entier sous glace (tacaud des paragraphes précédents) et de la rascasse et de la morue pêchée en hiver et conservée respectivement entière et éviscérée sous glace à 0°C.

Des modèles d'équation des ces dénombrements (log) de la flore totale obtenus sur PCA-H₂S 1,5% en fonction de l'ABVT, P et I.F (tableau 27 p. 90) ont été réalisés.

Tableau 27. Estimation a, b, c des différents paramètres des modèles retenus pour l'évaluation de la flore totale de tacaud, rascasse et morue sur PCA-H₂S 1,5 % en fonction de l'ABVT, P et I.F.

Dosage ou indice	Espèce	a	b	c	Σ^2	d.d.l.	Modèle	Seuil théorique
ABVT								
	tacaud	5,2222	13,2926	0,1271	13,3119	40	monomoléculaire	84.855
	morue	6,3309	4,0525	0,1347	6,5811	42	logistique	812.581
	rascasse	5,6059	0,9630	0,0700	6,8887	33	logistique	103.408
P								
	tacaud	5,5692	2,8249	0,0380	8,1673	40	monomoléculaire	46.317
	morue	6,6744	0,9629	0,0434	7,9716	42	logistique	194.617
	rascasse	5,7183	0,6531	0,0375	6,6841	33	logistique	52.234
I.F.								
	tacaud	5,4258	8,1451	1,4139	4,5186	40	logistique	71.914
	borne sup.	5,6504	14,2932	1,8052				205.465
	borne inf.	5,2011	1,9969	1,0226				57.409
	morue	8,6351	3,0828	0,4807	7,1197	42	logistique	98.776
	borne sup.	12,1720	3,8649	0,7786				7,24 10 ⁸
	borne inf.	5,0982	2,3007	0,1827				154
	rascasse	5,8989	7,6352	0,6935	4,6488	33	monomoléculaire	88.208
	borne sup.	6,6453	13,8175	1,2718				8,91 10 ⁶
	borne inf.	5,1525	1,4530	0,1152				13.307

d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle ; Seuil théorique en ufc/g de chair ; borne sup. et borne inf. : intervalle de confiance approché à 95%.

Cette étude en fonction de l'espèce, des saisons de pêche et des modes de conservation utilisés nous révèle :

- les modèles les plus précis sont souvent obtenus avec l'I.F (sommes des carrés résiduelles les plus petites). Il semble donc que l'I.F. permet de mieux suivre l'altération en fonction du dénombrement de la flore totale. Les dosages de l'ABVT et de la TMA (nécessaire pour l'évaluation du rapport P) sont moins fiables que l'évaluation de l'I.F.

- les espèces étudiées dans ces conditions de conservation, de pêche et de saisons ne peuvent être regroupées en un seul modèle. L'évaluation de l'altération dépend donc bien de ces facteurs.

Il apparait donc que l'utilisation du milieu PCA-H₂S 1,5 % permette un dénombrement correct de la flore totale incubée à 25°C et ensemencée par la méthode Spiral. On peut considérer suivant la figure 6 qu'un poisson inconsommable possède un dénombrement de la flore totale supérieur à 100.000 ufc/g.

III. Recherche d'un milieu pour le dénombrement de la flore à Gram négatif

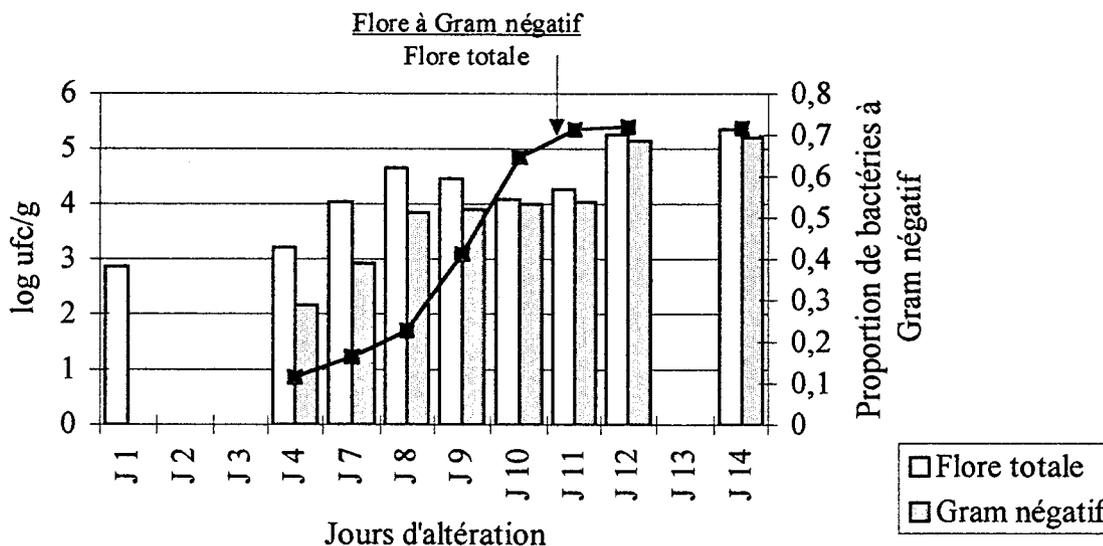
La flore à Gram négatif est, nous l'avons vu dans le premier chapitre, une flore importante de l'altération. Au vu des résultats obtenus avec la flore totale nous avons voulu connaître le développement de la flore à Gram négatif vis à vis de différents milieux et concentrations en sel.

Les bactéries à Gram négatif sont facilement détectables par addition dans les milieux de culture de cristal violet (§ IV. p. 53).

1. Comportement de la flore à Gram négatif

Afin d'apprécier le comportement de la flore à Gram négatif sur le milieu PCAcv incubé à 20°C en fonction du développement de la flore totale (dénombrée sur PCA à 20°C), nos premiers essais ont été réalisés sur du merlan (merlan utilisé pour la flore totale : § 1. p. 77) pendant une altération de 14 jours sous glace à 0°C (figure 7).

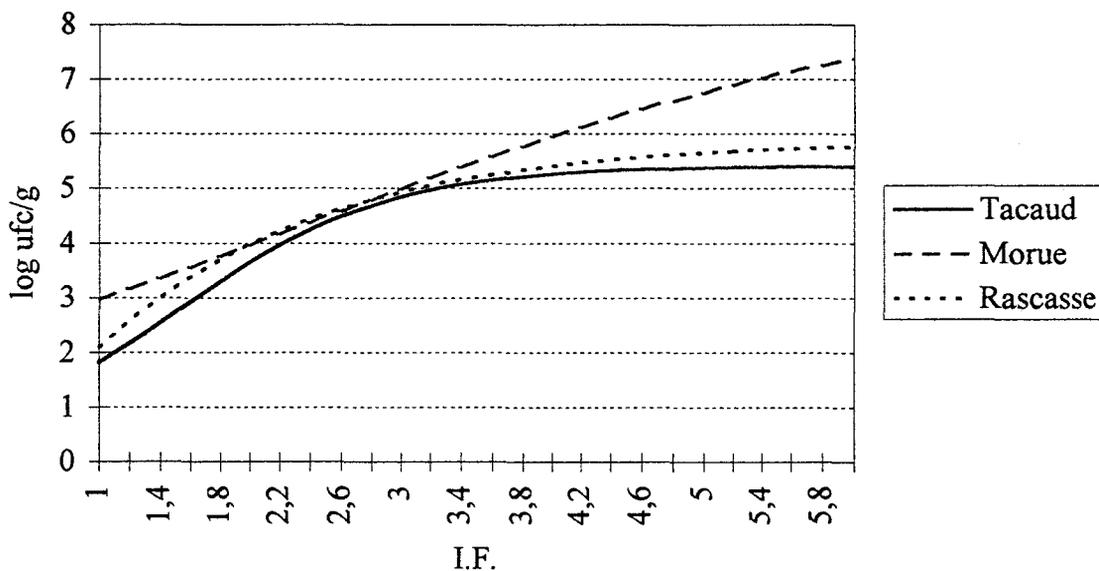
Figure 7. Représentation de la flore à Gram négatif en fonction du développement de la flore totale sur PCA à partir de merlan.



- suivant l'ensemble des modèles estimés en fonction de l'I.F. on constate qu'un poisson altéré possède un dénombrement de la flore totale supérieur à 100.000 ufc/g mais il faut être prudent au vu des "intervalles approchés" qui sont importants.

La figure 6 nous permet de montrer que les cinétiques des évolutions de la flore totale pour les espèces étudiées ne sont pas exactement identiques au niveau 3 d'indice de fraîcheur mais se confondent. On observe donc de faibles différences entre les espèces lorsque le poisson devient inconsommable et on peut donc confirmer que le dénombrement de la flore totale dépasse 100.000 ufc/g (ceci confirme l'observation des résultats bruts du tableau 22 (p. 83).

Figure 6. Modélisations des dénombrements de la flore totale des trois espèces étudiées (tacaud, rascasse et morue) en fonction de l'I.F.



Cette figure nous montre également que l'on observe pas de phase de latence dans le développement de la flore totale et ceci même si l'on prend en considération les bornes des paramètres des différents modèles. Des résultats similaires ont été observés par Soudan et coll., 1965, Liston, 1980 et Rachidi et coll., 1995 ou la flore totale a une phase de latence inexistante ou très réduite (inférieure 1 jour de conservation).

On constate également que les cinétiques des évolutions de la flore totale de chaque espèce tendent vers des asymptotes théoriques différentes. Il semble que ces asymptotes (paramètre estimé "a" pour les différents modèles) soient très variables d'autant que les travaux de Soudan et coll., 1965, Liston, 1980 et Rachidi et coll., 1995 montrent le même phénomène (mais avec des asymptotes beaucoup plus élevées : jusque 10^8 - 10^9 ufc/g).

La flore à Gram négatif représente sur ce milieu moins de 10 % de la flore en début d'altération et plus de 70 % de la flore totale (Rapport) en fin d'altération. Ces résultats confirment ceux obtenus par Hobbs et Hodgkiss (1982) et Shewan (1971). Cette flore à Gram négatif est donc une flore très importante dans l'évaluation de l'altération de la chair de poisson.

2. Recherche d'un milieu de culture

On réalise à partir des lots de rascasses et tacauds utilisés pour la flore totale (§ 1. p. 77) des dénombrements sur les milieux PCAcv de 0 à 3,5 % de NaCl (p/v) et TSAcv de 0,5 à 3,5 % de NaCl (p/v) ensemencés par la méthode Spiral et incubés à 20°C en fonction de l'altération (15 jours)

Nous avons voulu dans un premier temps vérifier que la flore qui se développe sur ces milieux ne soit que des bactéries à Gram négatif . Sur chaque boîte nous avons donc prélevé 10 colonies au hasard pour réaliser un test de coloration de Gram (1260 colorations).

Nous n'avons jamais trouvé de bactéries à Gram positif. Le cristal violet ne permet donc que le développement de bactéries à Gram négatif qui ont un aspect bleuté. Nous pouvons donc chercher à interpréter les dénombrements obtenus.

2.1. Analyse statistique

Nous avons réalisé une analyse de variance (tableau 28 p. 94) des dénombrements obtenus en fonction de différents facteurs :

- l'espèce de poisson (2 niveaux),
- le milieu de culture (2 niveaux),
- la concentration en sel (7 niveaux ordonnés),
- l'évolution de l'altération (15 niveaux ordonnés).

Tableau 28. Analyse de variance des dénombrements de la flore à Gram négatif obtenus à partir de lots de rascasses et tacauds sur milieux PCAcv et TSAcv à 20°C pendant 15 jours d'altération.

Variable	Σ des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	test-F	Probabilité
Totale	958,13	1084	0,88		
Espèce = F1	140,20	1	140,20	1197,63	< à 10^{-4}
Milieu = F2	11,33	1	11,33	96,78	< à 10^{-4}
[NaCl] = F3	3,90	6	0,65	5,55	< à 10^{-4}
effet linéaire	0,75	1	0,75	6,25	< à 0,025
effet quadratique	3	1	3	25	< à 10^{-4}
écart	0,15	4	0,04	0,31	> 0,500
Altération = F4	610,23	12	50,85	434,68	< à 10^{-4}
effet linéaire	576,86	1	576,86	4807,17	< à 10^{-4}
effet quadratique	9,68	1	9,68	80,67	< à 10^{-4}
écart	23,69	10	2,34	19,74	< à 10^{-4}
F1 × F2	1,55	1	1,55	13,27	0,0004
F1 × F3	15,13	6	2,52	21,54	< à 10^{-4}
F1 × F4	74,39	12	6,20	52,96	< à 10^{-4}
effet linéaire	28,36	1	28,36	236,33	< à 10^{-4}
effet quadratique	1,18	1	1,18	9,83	< 0,0004
écart	44,85	10	4,49	37,42	< à 10^{-4}
F2 × F3	0,30	6	0,05	0,43	0,8601
F2 × F4	2,68	12	0,22	1,91	0,0306
F3 × F4	2,31	72	0,03	0,27	> 0,9575
F1 × F2 × F3	0,44	6	0,07	0,62	0,7166
F1 × F2 × F4	1,56	12	0,13	1,11	0,3458
F1 × F3 × F4	6,10	72	0,08	0,72	0,9575
F2 × F3 × F4	1,55	72	0,02	0,18	> 0,9575
F1 × F2 × F3 × F4	2,06	72	0,03	0,24	> 0,9575
Résiduelle	84,41	721	0,12		

d.d.l. : degré de liberté ; test-F : test de Fisher

Cette étude montre :

(1) Des différences significatives suivant les espèces : les dénombrements ne sont pas identiques suivant les espèces. On dénombre en moyenne pour la rascasse $4,60 \pm 0,21$ log ufc/g et pour le tacaud $3,88 \pm 0,33$ log ufc/g (tableau 29 p. 96). Les charges bactériennes étant initialement différentes suivant l'espèce il est normal de retrouver ce résultat.

(2) Des différences significatives suivant le milieu : les dénombrements ne sont pas identiques suivant les milieux. On dénombre en moyenne sur PCAcv $4,14 \pm 0,30$ log ufc/g et sur TSA $4,34 \pm 0,26$ log ufc/g. Le plus grand nombre de bactéries à Gram négatif est obtenu sur le milieu TSAcv.

(3) Des différences significatives suivant la concentration en sel : les dénombrements ne sont pas identiques suivant la concentration en sel. Le facteur sel se décompose en tendance quadratique. On a donc une relation quadratique d'équation :

$$Y = 4,2414 - 0,0132x - 0,0154 (x^2 - 4)$$

La dérivée $- 0,0132 - 0,0308x$ est nulle pour $x = -0,4286$ soit pour 1,79 % (p/v) de NaCl ($= 0,5 (\%) \times (-0,4286) + 2$).

La concentration en sel (NaCl) permettant de dénombrer le plus grand nombre de bactéries à Gam négatif quel que soit l'espèce de poisson est donc estimé à 1,79 % (p/v).

L'ensemble des résultats des dénombrements de la flore à Gram négatif marine montre que son développement est favorisé lorsqu'on rajoute du NaCl. Ceci confirme certains résultats montrant l'importance du sel dans les milieux de culture pour le dénombrement de cette flore (Hobbs et Hodgkiss, 1982 ; Horie et coll., 1972; Okuzumi et coll., 1973). En effet les groupes III, IV III/IV-H des *Pseudomonas* (contenant notamment *Shewanella putrefaciens*), *Alteromonas*, *Moraxella*, *Vibrio* (Lerke et coll., 1965 ; Van Spreekens, 1977), représentent la majeure partie de la flore à Gram négatif. Ces bactéries sont dites halophiles (Horie et coll. (1972).

(4) Des différences significatives suivant les jours d'altération : les dénombrements bactériens augmentent au cours de l'altération de façon non linéaire et non quadratique, l'écart entre l'effet global (le facteur) et la prise en compte des deux effets est significatif. Il existe donc des variations entre les cinétiques des évolutions de la flore à Gram négatif en fonction de l'altération des espèces. Il est préférable de ne pas utiliser un modèle commun aux deux espèces (tableau 30 p. 97) car la comparaison avec les modèles de chaque espèce montre une différence significative à 99,9 % (test- $F_{(3,20)} = 17,2143$).

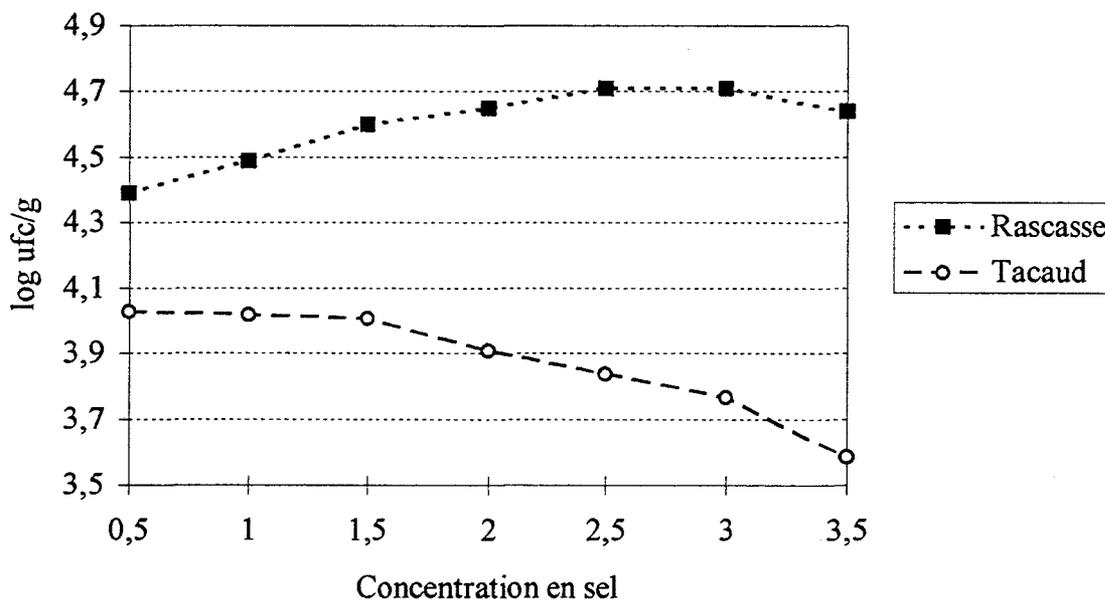
(5) Des différences significatives suivant l'interaction espèces et milieux : les dénombrements ne sont pas identiques suivant les espèces et les milieux. Les dénombrements (tableau 29 p. 96) sont systématiquement plus importants sur TSAcv même si la charge bactérienne est différente suivant l'espèce.

Tableau 29. Dénombrements moyens ($x \pm \sigma$) obtenus entre l'interaction espèces et milieu.

log ufc/g	Rascasse	Tacaud
PCAcv	$4,46 \pm 0,23$	$3,82 \pm 0,36$
TSAcv	$4,74 \pm 0,20$	$3,95 \pm 0,30$
Moyenne	$4,60 \pm 0,21$	$3,88 \pm 0,33$

(6) Des différences significatives suivant l'interaction espèce et concentration en sel : l'évolution des dénombrements en fonction de la concentration en sel n'est pas la même suivant les espèces (figure 8).

Figure 8. Modélisations des dénombrements moyens de la flore à Gram négatif pour les deux espèces étudiées suivant la concentration en sel des milieux.



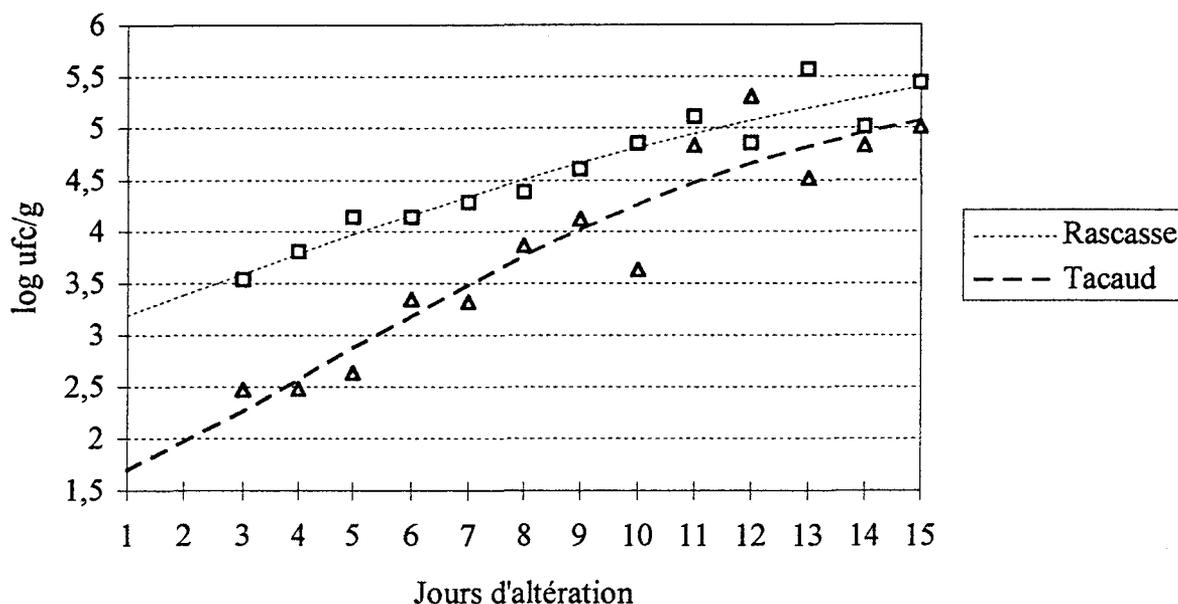
Ces besoins en NaCl de la flore à Gram négatif sont probablement dus aux charges bactériennes qui sont de nature différente entre ces espèces. Ceci montre que même si le mode de conservation est identique, il est difficile d'obtenir une flore homogène sur des espèces pêchées à des endroits différents.

On obtient une concentration optimale en sel (NaCl (p/v)) pour le dénombrement de la flore à Gram négatif pour :

- la rascasse de **2,71 %** avec l'équation estimée $y = 4,5986 + 0,0464x - 0,0164(x^2-4)$,
- le tacaud de **0,63 %** avec l'équation estimée $y = 3,8814 - 0,0711x - 0,0130(x^2-4)$.

(7) Des différences significatives suivant l'interaction espèce et altération : l'évolution des dénombrements en fonction des jours d'altération n'est pas la même suivant les espèces (figure 9).

Figure 9. Modélisations des dénombrements de la flore à Gram négatif des deux espèces étudiées en fonction des jours d'altération.



L'interaction espèce et altération ne se décompose pas en effets linéaire et quadratique. Ceci signifie que pour une charge bactérienne différente suivant l'espèce, les tendances (évolutions) le sont aussi. Ceci confirme les résultats du paragraphe (4) (p.95) obtenus avec les équations du tableau 30. On remarque que l'on observe pas de phase de latence.

Tableau 30. Estimation a,b,c des différents paramètres du modèle Logistique retenu pour l'évaluation de la flore à Gram négatif en fonction des jours d'altération.

Espèce	a	b	c	Σ^2	d.d.l.
Rascasse	6,2065	1,0784	0,1316	0,3490	10
Tacaud	5,6005	2,8541	0,2211	1,2317	10
Complet	5,9055	1,7099	0,1734	5,6623	23

d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle

(8) On constate également que l'interaction entre les différents effets ne montre pas de différence significative. On prend donc bien en considération les facteurs les plus importants pour cette étude.

Nous venons donc de montrer que le dénombrement de la flore à Gram négatif d'espèces ayant des charges bactériennes différentes (effet espèce) est maximal sur milieu TSAcv (effet milieu) ayant une concentration en sel (NaCl) moyenne de 1,79 % (p/v) (effet sel) même si l'évolution de l'altération est différente suivant les espèces conservées dans les mêmes conditions (effet altération).

2.2. Seuil de dénombrement

Nous avons dans un premier temps réalisé le rapport flore à Gram négatif sur flore totale (en fonction des milieux et concentrations en sel respectivement retenus). Ceci nous a permis de connaître l'évolution de cette proportion en fonction de l'altération.

Il n'y a qu'une "légère" augmentation de la proportion de flore à Gram négatif sur les deux espèces testées (tacaud et rascasse). Mais la proportion de bactéries à Gram négatif est variable entre espèce et suivant l'évolution de l'altération : chez la rascasse elle est comprise entre 15 et 60 % et chez le tacaud elle est inférieure à 30 % de la flore totale.

Le rapport [flore à Gram négatif / flore totale] ne peut constituer un critère de référence microbiologique de l'altération.

Ce rapport montre que la flore à Gram négatif n'est plus systématiquement majoritaire dans ces conditions de culture. Il faut être prudent sur cette conclusion, car le cristal violet pourrait avoir un effet inhibiteur sur le développement des bactéries à Gram négatif.

Dans un deuxième temps nous avons réalisé la modélisation des dénombrements de la flore à Gram négatif en fonction de l'ABVT, P et I.F. comme pour la flore totale (tableau 31 p. 99).

Cette étude, sur ces espèces, nous révèle :

- comme pour la flore totale, il est impossible de réaliser un seul modèle d'évolution de la flore à Gram négatif commun aux deux espèces en fonction de l'ABVT et de P.

- par contre, pour l'I.F. le modèle commun aux deux espèces est réalisable mais la comparaison de ce modèle à ceux de chaque espèce montre une différence significative à 99,9% (test- $F_{(3,84)} = 52,6507$). On ne peut donc pas utiliser un modèle commun en fonction de l'I.F. Cette conclusion confirme un des résultats de l'analyse de variance (§ 2.1. p. 93).

- toutefois, il faut être prudent sur le nombre de bactéries à Gram négatif "seuil" observé lorsqu'un poisson n'est plus consommable. Les poissons ne sont plus consommables lorsque le dénombrement des bactéries à Gram négatif est supérieur à 45.000 ufc/g.

Tableau 31. Estimation a, b, c des différents paramètres des modèles retenus pour l'évaluation de la flore à Gram négatif de tacaud et de rascasse sur TSAcv en fonction de l'ABVT, P et I.F.

Dosage ou indice	Espèce	a	b	c	Σ^2	d.d.l.	Modèle	Seuil théorique
ABVT								
	tacaud	5,1426	4,2407	0,1072	12,5564	36	logistique	24.828
	rascasse	5,4612	7,7039	0,1170	5,8180	42	monomoléculaire	170.168
P								
	tacaud	5,6202	1,7480	0,0521	15,6291	36	logistique	12.405
	rascasse	5,8281	2,7793	0,0294	6,0528	42	monomoléculaire	47.599
I.F.								
	tacaud	5,8379	10,6907	0,9099	8,2680	36	logistique	2.749
	borne sup.	7,1931	23,0575	1,4749				
	borne inf.	4,4828	-1,6763	0,3448				
	rascasse	5,7993	4,3839	0,9568	4,2845	42	logistique	44.172
	borne sup.	6,2654	7,5162	1,3485				344.392
	borne inf.	5,3331	1,2517	0,5651				21.715
	complet	6,8198	2,9993	0,4981	33,3052	81	logistique	11.919

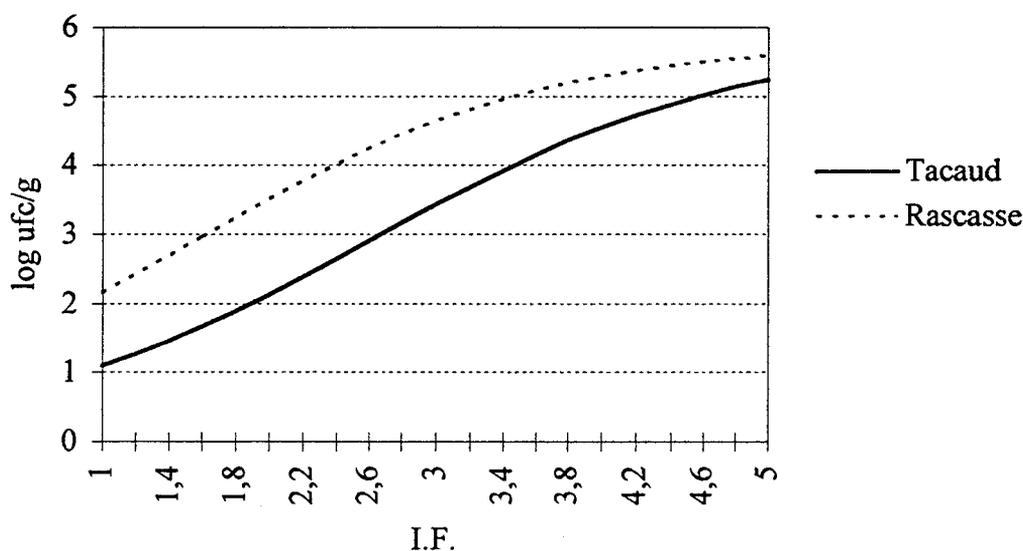
d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle ; Seuil théorique en ufc/g de chair ; borne sup. et borne inf. : intervalle de confiance approché à 95%.

Remarque : on peut constater que le degré de liberté des modélisations réalisées avec le lot de tacaud n'est pas comme pour la flore totale de 42. Ce n'est pas dû à des dénombrements qui n'ont pas été réalisés ou manquants, ils sont simplement inférieurs au seuil de la méthode (On ne peut considérer que ces dénombrements soient nuls).

La représentation (figure 10 p. 100) de l'évolution de la flore à Gram négatif en fonction de l'I.F. permet de confirmer qu'un poisson altéré possède une charge supérieure à 45.000 ufc/g.



Figure 10. Modélisations des dénombrements de la flore à Gram négatif des deux espèces étudiées (tacaud et rascasse) en fonction de l'I.F.



Cette représentation nous montre que l'on n'observe pas de phase de latence dans l'évolution de la flore à Gram négatif et ceci même si l'on prend en considération les bornes des paramètres des différents modèles. Cette conclusion rejoint celle de la flore totale (§ b p. 89). Il apparaît également que les asymptotes (tableau 31 p. 90) sont élevées par rapport à celles de la flore totale (tableau 27 p. 90). Il faut donc être prudent sur l'interprétation de telles valeurs.

IV. Optimisation d'un milieu pour le dénombrement de la flore H₂S

1. Etude de la culture de *Shewanella putrefaciens*

La bibliographie nous ayant démontré l'importance de cette bactérie dans la flore H₂S, une étude des milieux permettant son développement est devenue indispensable.

Dans un premier temps, une comparaison du développement de *Shewanella putrefaciens* sur les milieux PCA et TSA supplémentés en chlorure de sodium (0 à 3,5% (p/v)) a été réalisée. On constate (tableau 32 p. 101) que le développement de *Shewanella putrefaciens* est maximal pour une concentration de 0,5 % en sel sur le milieu TSA, et de 2 % sur PCA.

Tableau 32. Dénombrement (log ufc/ml) de *Shewanella putrefaciens* sur les milieux PCA et TSA.

NaCl (p/v)	0 %	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %
PCA	0	4,2	3,8	4,6	5,3	5	3,3	3,3
TSA		6,9	5,1	4,9	3,8	4,7	3,3	3,6
moyenne de 10 dénombrements								

Cette bactérie semble dépendante du milieu et de la concentration en sel. D'après Ringo et coll. (1984) et Stenberg et coll. (1984), *Shewanella putrefaciens* a besoin de sel pour son développement mais aussi de différents éléments comme de la cystéine, du glutamate ou du molybdate (présents dans ces milieux à des concentrations variables). Ceci peut expliquer les variations de réponse entre les milieux.

Shewanella putrefaciens ne se développe pas sur PCA (sans sel). C'est le milieu de référence de dénombrement de la flore aérobie totale mésophile (NF V08-51), il ne dénombre donc pas toute la flore d'altération. D'autre part *Shewanella putrefaciens* est halophile faible au vu des résultats.

2. Recherche de la flore H₂S à partir de la flore à Gram négatif

La flore H₂S étant principalement constituée de *Shewanella putrefaciens* (Gram et coll., 1987 ; Jorgensen et Huss, 1989) donc de bactéries à Gram négatif, nous avons voulu tester le pourcentage de bactéries à Gram négatif productrices d'H₂S.

Nos essais sont réalisés en même temps que l'étude de la flore à Gram négatif sur le tcaud (§ III. p. 92). A partir des différents milieux PCAcv (0 à 3,5 % (p/v) de NaCl) et TSAcv (0,5 à 3,5 % (p/v) de NaCl), nous avons prélevé 30 colonies prises au hasard par boîte de Pétri et nous les avons transférées sur milieu H₂S.

Les résultats (tableau 33 p. 102) de l'expérimentation nous permettent d'observer une évolution moyenne, en fonction des jours d'altération, du pourcentage de bactéries productrices d'H₂S par rapport à la flore à Gram négatif.

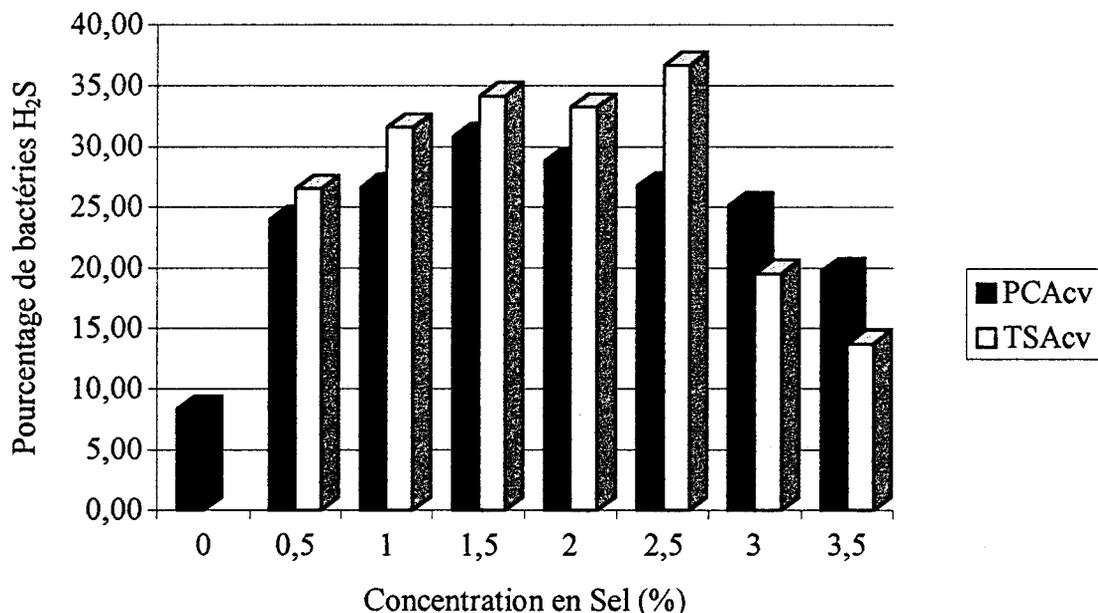
On passe de moins de 5 % en début d'altération à plus de 35 % de la flore à Gram négatif dans certain cas en fin d'altération. Il apparait donc une nouvelle fois que cette flore est très importante.

Tableau 33. Evolution de la flore H₂S (%) en fonction du milieu de développement de la flore à Gram négatif provenant de la rascasse.

Jours d'altération	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
PCAcv	4,16	16,5	17,1	28,6	19,9	36,3	24,6	33,3	20,8	27,2	29,7
TSAcv	4,4	14,4	19,2	16,9	32,5	24,9	34,4	29,4	38,1	32,8	37,6

On peut observer que l'on a, comme pour la flore totale ou à Gram négatif, des réponses variables suivant les concentrations en sel (figure 11). Les meilleures proportions ont été obtenues à partir du milieu optimal pour le dénombrement de la flore à Gram négatif : TSAcv.

Figure 11. Evolution du pourcentage des bactéries H₂S récupérées sur les milieux PCAcv et TSAcv supplémentés en sel.



La concentration optimale théorique en sel pour ce milieu TSAcv est de 1,69 %. Cette concentration a été établie suivant la courbe polynomiale estimée d'équation $y = -1,2868x^2 + 8,5814x + 19,76$ où la concentration en sel est égale à $x \times 0,5$ (courbe obtenue à partir des pourcentages). Alors que sur PCA la concentration optimale est de 2,45 % ($y = -1,2655x^2 +$

12,386x +0,2905). Ces concentrations sont à rapprocher de celles obtenues sur les milieux PCA et TSA (§ 1.4.1. p. 100). Qu'en est-il quand on change la composition du milieu ?

3. Recherche d'un milieu de culture

Cette étude a été réalisée selon la même démarche que pour la flore totale.

Nous avons travaillé quotidiennement sur le même lot de tacauds conservés entiers sous glace à 0°C utilisés pour la détermination de la flore totale (§ 2. p. 85). Les ensemencements sont réalisés sur les milieux PCA-H₂S (0 à 3,5 % (p/v) de NaCl), TSA-H₂S (0,5 à 3,5 % (p/v) de NaCl), H₂S (0,5 à 3,5 % (p/v) de NaCl) par la méthode Spirale. L'incubation de cette flore H₂S (coloration noire) a été réalisée à 25°C, température optimale de développement de la flore H₂S (§ 2. p. 75).

3.1. Analyse statistique

A partir des dénombrements (log ufc/g). nous avons réalisé une analyse de variance (tableau 34) en fonction de différents facteurs :

- le milieu de culture (3 niveaux),
- la concentration en sel (7 niveaux ordonnés),
- l'évolution de l'altération (15 niveaux ordonnés).

Tableau 34. Analyse de variance des dénombrements de la flore H₂S à 25°C obtenus à partir de tacaud sur milieux PCA-H₂S, TSA-H₂S et H₂S pendant 15 jours d'altération.

Variable	Σ des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	test-F	Probabilité
Totale	678,61	733	0,93		
Milieu = F1	6,06	2	3,03	12,78	< à 10 ⁻⁴
[NaCl] = F2	16,24	6	2,71	11,40	< à 10 ⁻⁴
effet linéaire	9,99	1	9,99	41,63	< à 10 ⁻⁴
effet quadratique	5,47	1	5,47	22,79	< à 10 ⁻⁴
écart	0,78	4	0,20	0,81	> 0,500
Altération = F3	505,58	11	45,96	193,72	< à 10 ⁻⁴
effet linéaire	362,93	1	362,93	1512,20	< à 10 ⁻⁴
effet quadratique	0,13	1	0,13	0,54	> 0,500
écart	142,52	9	15,84	65,98	< à 10 ⁻⁴
F1 × F2	3,64	12	0,30	1,28	0,2275
F1 × F3	8,08	22	0,37	1,55	0,0542
F2 × F3	10,36	66	0,16	0,66	0,9804
F1 × F2 × F3	14,31	132	0,11	0,46	0,9900
Résiduelle	114,36	482	0,24		

d.d.l. : degré de liberté ; test-F : test de Fisher

Cette étude nous montre :

(1) Des différences significatives suivant le milieu : on a en moyenne sur PCA-H₂S (3,61 ± 0,34 log ufc/g) un meilleur dénombrement que sur TSA-H₂S (3,42 ± 0,43 log ufc/g) et H₂S (3,43 ± 0,39 log ufc/g).

(2) Des différences significatives suivant la concentration en sel : les dénombrements ne sont pas identiques suivant la concentration en sel. Le facteur sel se décompose en un effet quadratique. On a donc une relation quadratique d'équation :

$$Y = 3,5870 - 0,0675x - 0,0289(x^2 - 4)$$

La dérivée $-0,0675 - 0,0578x$ est nulle pour $x = -1,1678$ soit pour 1,42 % (p/v) de NaCl ($0,5 \times (-1,1678) + 2$).

La concentration en sel (NaCl) permettant de dénombrier le plus grand nombre de bactéries H₂S est donc estimée à 1,42 % (p/v) quel que soit le milieu. Elle est semblable à la concentration optimale pour le dénombrement de la flore totale quel que soit le milieu (1,43%).

Comme les plus grands nombres de bactéries H₂S sont obtenus sur PCA-H₂S nous avons évalué l'équation de la courbe polynomiale des dénombrements moyens en fonction des concentrations en sel : $Y = -0,0265x^2 + 0,1785x + 3,4286$ la dérivée est nulle pour $x = 3,3679 \times 0,5 = 1,68$ % de sel

La concentration en sel sur PCA-H₂S permettant de dénombrier le plus grand nombre de bactéries H₂S est de 1,68 % (p/v) quels que soient l'espèce et les jours d'altération. La flore H₂S est donc halophile faible.

(4) Des différences significatives suivant les jours d'altération : les dénombrements bactériens augmentent au cours de l'altération. Le facteur jour se décompose en un effet linéaire dont l'équation estimée est : $Y = 1,5754 + 0,2008 \times J$. Mais l'écart entre l'effet globale (facteur) et la prise en compte des deux effets est significatif, il existe donc une grande imprécision dans ce modèle linéaire.

(5) On constate également que l'interaction entre les différents effets ne montre pas de différence significative. On prend donc bien en considération les facteurs les plus importants pour cette étude.

Nous venons donc de montrer que le plus grand nombre de bactéries H₂S est obtenu sur milieu PCA-H₂S (effet milieu) ayant une concentration en sel (NaCl) optimale de 1,68 % (p/v) (effet sel).

Comme le dénombrement de la flore totale (§ 2. p. 85) a été réalisé sur ces milieux, une étude incorporant un facteur supplémentaire qui est le type de flore (flore totale ou H₂S) a été faite. L'objectif de cette étude est d'établir un milieu optimal pour le dénombrement des deux flores. Cette incorporation de la flore totale dans l'analyse n'est pas gênante : nous avons montré que la flore totale était correctement dénombrée sur tous les milieux dits : "H₂S". Nous avons réalisé une analyse de variance (tableau 35) avec les dénombrements obtenus.

Tableau 35. Analyse de variance des dénombrements des flores totale et H₂S sur les milieux PCA-H₂S, TSA-H₂S et H₂S à 25°C obtenus sur du tacaoud pendant 15 jours d'altération.

Variable	Σ des carrés	d.d.l.	Carrés moyens	test-F	Probabilité
Totale	1585,28	1466	1,08		
Milieu = F1	4,09	2	2,04	12,00	< à 10 ⁻⁴
[NaCl] = F2	10,40	6	1,73	10,17	< à 10 ⁻⁴
effet linéaire	5,73	1	5,73	33,71	< à 10 ⁻⁴
effet quadratique	4,03	1	4,03	23,71	< à 10 ⁻⁴
écart	0,64	4	0,16	0,94	> 0,500
Flore = F3	694,79	1	694,79	4079,43	< à 10 ⁻⁴
Altération = F4	597,06	11	54,28	318,69	< à 10 ⁻⁴
effet linéaire	401,66	1	401,66	2362,71	< à 10 ⁻⁴
effet quadratique	1,39	1	1,39	8,18	< à 10 ⁻⁴
écart	194,01	10	19,40	114,12	< à 10 ⁻⁴
F1 × F2	1,87	12	0,16	0,92	0,5300
F1 × F3	2,67	2	1,33	7,83	0,0005
F1 × F4	4,15	22	0,19	1,11	0,3310
F2 × F3	7,18	6	1,20	7,03	< à 10 ⁻⁴
F2 × F4	6,54	66	0,10	0,58	0,9900
F3 × F4	64,34	11	5,85	34,34	< à 10 ⁻⁴
F1 × F2 × F3	1,48	12	0,12	0,73	0,7283
F1 × F2 × F4	8,84	132	0,07	0,39	> 0,9900
F1 × F3 × F4	4,36	22	0,20	1,16	0,2721
F2 × F3 × F4	6,45	66	0,10	0,57	0,9900
F1 × F2 × F3 × F4	7,05	132	0,05	0,31	> 0,9900
Résiduelle	164,01	963	0,17		

d.d.l. : degré de liberté ; test-F : test de Fisher

Cette étude nous montre :

(1) Des différences significatives suivant les milieux : les dénombrements ne sont pas identiques suivant les milieux. On a en moyenne sur PCA-H₂S $4,23 \pm 0,31$ Log ufc/g, sur TSA-H₂S $4,11 \pm 0,34$ log ufc/g et sur H₂S $4,13 \pm 0,34$ log ufc/g (tableau 36 p. 107). Le milieu **PCA-H₂S** permet les dénombrements les plus importants quelle que soit la flore.

(2) Des différences significatives suivant la concentration en sel : les dénombrements ne sont pas identiques suivant la concentration en sel. Le facteur sel se décompose en un effet quadratique. On a donc une relation quadratique d'équation estimée :

$$Y = 4,1557 - 0,0311x - 0,0151(x^2 - 4)$$

La dérivée $-0,0311 - 0,0302x$ est nulle pour $x = -1,0298$ soit pour 1,49 % (p/v) de NaCl ($= 0,5 (\%) \times (-1,0298) + 2$).

La concentration en sel (NaCl) permettant les dénombrements les plus importants est donc estimée à 1,49 % (p/v) quels que soient le milieu (PCA-H₂S TSA-H₂S et H₂S) et la flore (totale ou H₂S⁺).

Comme les dénombrements les plus importants sont obtenus sur PCA-H₂S, nous avons calculé l'équation de la courbe polynomiale des dénombrements moyens quel que soit la flore en fonction des concentrations en sel : $Y = -0,0165x^2 + 0,1142x + 4,1043$ la dérivée est nulle pour $x = 3,3679 \times 0,5 = 1,73$ % de sel

La concentration en sel (NaCl) permettant les dénombrements les plus importants sur **PCA-H₂S** est de 1,73 % (p/v) quels que soient la flore marine et les jours d'altération.

Reichelt et Baumann (1974) ont démontré que les besoins en NaCl des bactéries marines étaient compris entre 1,16 à 1,75 %. Nous retrouvons exactement le même besoin en NaCl. Ceci montre que la flore de contamination environnementale marine est la flore majoritaire d'altération et/ou de contamination des poissons d'origine marine.

(3) Des différences significatives suivant la flore : les dénombrements ne sont pas identiques. Nous dénombrons en moyenne pour la flore totale $4,83 \pm 0,27$ log ufc/g et pour la flore H₂S $3,48 \pm 0,38$ log ufc/g (tableau 36 p. 107).

(4) Des différences significatives suivant les jours d'altération : les dénombrements ne sont pas identiques suivant les jours d'altération (résultats attendus suivant les études menées

précédemment). Le facteur jour ne se décompose pas en effet linéaire et en effet quadratique, l'écart entre l'effet globale (facteur) et la prise en compte des deux effets est significatif. Il existe donc une grande imprécision dans le modèle que l'on peut estimer somme étant de type logistique : $Y = 9,7939 / [1 + 2,4792 \times \exp(-0,0630 \times \text{Jour})]$, avec $\Sigma^2 = 1,5364$ pour un d.d.l.= 9.

(5) Des différences significatives suivant l'interaction milieu et flore : les dénombrements des flores sont différents suivant le milieu. On dénombre (tableau 36), en moyenne mieux la flore H₂S sur PCA-H₂S, par contre la flore totale est indifférente au milieu. Ce sont les mêmes conclusions que dans les paragraphes précédents (§ 3. p. 86 et 3. p.103).

Tableau 36. Dénombrements moyens ($\bar{x} \pm \sigma$) obtenus par interaction entre le milieu et la flore.

log ufc/g	PCA-H ₂ S	TSA-H ₂ S	H ₂ S	Moyennes
Flore totale	4,85 ± 0,27	4,82 ± 0,27	4,84 ± 0,27	4,83 ± 0,27
Flore H ₂ S	3,61 ± 0,34	3,40 ± 0,40	3,43 ± 0,39	3,48 ± 0,38
Moyennes	4,23 ± 0,31	4,11 ± 0,34	4,13 ± 0,34	

(6) Des différences significatives entre l'interaction de la concentration en sel et de la flore : les dénombrements de la flore ne se comportent pas de la même façon suivant les concentrations en sel. Nous avons déjà démontré (§ 3. p. 86) que la flore totale est indifférente aux concentrations en sel sur ces milieux et que la flore H₂S se développe mieux (§ 1. p. 100) à une concentration en sel de 1,42 % quel que soit le milieu.

(7) Des différences significatives suivant l'interaction flore et altération : l'évolution de l'altération n'est pas la même suivant le type de flore. Nous avons démontré que la flore totale suit un modèle logistique (§ 2. p. 85) alors que la flore H₂S suit un modèle linéaire (cf tableau 34 p. 103) en fonction des jours d'altération.

(8) On constate également que l'interaction entre les différents effets ne montre pas de différence significative. On prend donc bien en considération les facteurs les plus importants pour cette étude.

Afin de concilier les deux dénombrements flore totale et flore H₂S, on réalisera les ensemencements sur milieu PCA-H₂S avec une concentration en sel (NaCl) de 1,73 % (p/v) (1,5 %). Après ensemencement par la méthode Spiral la culture se fera à 25°C pendant 72 h.

3.2. Seuil de dénombrement

Dans un premier temps le rapport flore H₂S sur flore totale (dénombrés sur PCA-H₂S 1,5 %) a été réalisé pour évaluer l'évolution de cette proportion en fonction de l'altération sur trois espèces : le tacaud, la morue et la rascasse (§ 3. p. 86).

Il y a une légère augmentation de la proportion de flore H₂S sur les trois espèces testées. Mais les proportions de bactéries H₂S sont très variables : elles sont inférieures à 30% de la flore totale (généralement de 5 à 15 %). **Le rapport [flore H₂S / flore totale] ne peut constituer un critère de référence microbiologique de l'altération.**

Afin de pouvoir évaluer l'influence de l'espèce, des périodes de pêche et des modes de conservation sur le dénombrement "seuil" de la flore H₂S sur PCA-H₂S 1,5%, nous avons travaillé : sur du tacaud pêché au printemps et conservé entier sous glace à 0°C, de la rascasse et de la morue pêchée en hiver et conservée respectivement entière et éviscérée sous glace à 0°C.

Nous avons une nouvelle fois estimé des modèles d'équation des dénombrements de la flore H₂S obtenus sur PCA-H₂S 1,5% à partir de trois espèces pêchées et conservées différemment en fonction de l'ABVT, P et I.F. (tableau 37 p. 109).

L'étude en fonction des différents facteurs (espèces, saisons de pêche et modes de conservations utilisés) nous révèle que :

- l'IF permet d'obtenir les modèles les plus précis (sommes des carrés résiduelles les plus petites). Il semble donc que l'I.F. permet de mieux évaluer l'altération en fonction du dénombrement de la flore H₂S (variance la plus petite). Les dosages d'ABVT et de TMA (nécessaire pour l'évaluation du rapport P) sont moins fiables que l'évaluation de l'I.F.

- les espèces étudiées dans ces conditions ne peuvent être regroupées en un seul modèle. L'évaluation de l'altération dépend donc bien de ces facteurs.

- on peut considérer qu'un poisson inconsommable a un dénombrement de la flore H₂S supérieur à 10.000 ufc/g. Mais il faut être prudent au vu des "intervalles approchés" qui sont importants.

Tableau 37. Estimation a, b, c des différents paramètres des modèles retenus pour l'évaluation de la flore H₂S de tacaud, de rascasse et de morue sur PCA-H₂S 1,5 % en fonction de l'ABVT, P et I.F.

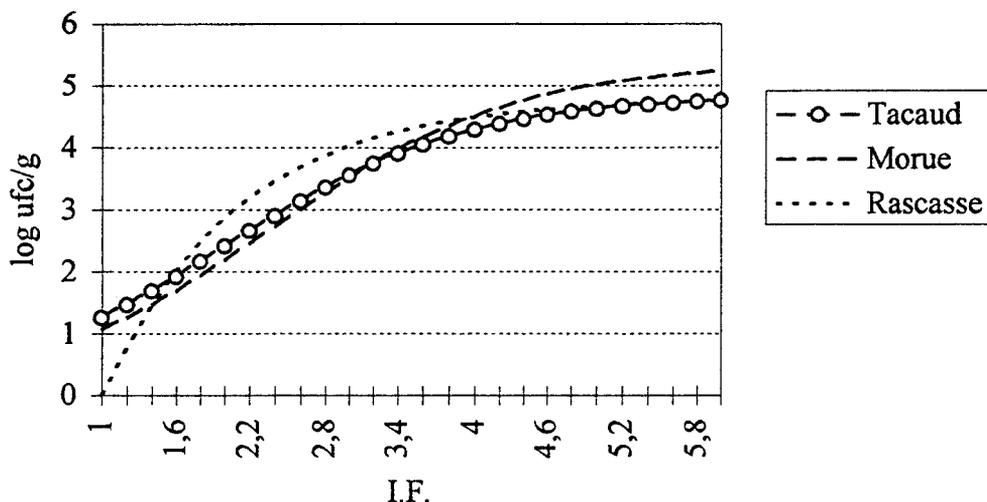
Dosage ou indice	Espèce	a	b	c	Σ^2	d.d.l.	Modèle	Seuil théorique
ABVT								
	tacaud	5,5830	1,7952	0,0375	16,5261	36	logistique	3.367
	rascasse	4,5707	5,4749	0,0902	7,4419	33	monomoléculaire	16.031
	morue	4,7063	20,1518	0,2022	12,5194	42	logistique	31.337
P								
	tacaud	9,6501	0,0163	0,0110	17,7045	36	Gompertz	2.116
	rascasse	4,6980	1,1058	0,0490	7,2297	33	logistique	5.567
	morue	4,8415	2,1770	0,0721	12,1954	42	logistique	7.451
I.F.								
	tacaud	4,8459	7,9219	1,0322	9,8139	36	logistique	3.700
	borne sup.	5,8806	23,8808	2,0512				
	borne inf.	3,8111	-8,0371	0,0131				
	rascasse	4,8088	12,1551	0,9202	5,2796	33	monomoléculaire	10.963
	borne sup.	5,3008	23,8104	1,5118				111.043
	borne inf.	4,3167	0,4997	0,3286				13.497
	morue	5,3784	11,0566	1,0125	12.1664	42	logistique	3.272
	borne sup.	6,3503	19,1187	1,4457				120.332
	borne inf.	4,4064	2,9945	0,5792				25.491

d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle ; Seuil théorique en ufc/g de chair ; borne sup. et borne inf. : intervalle de confiance approché à 95%.

Remarque : on peut constater que le degré de liberté des modélisations réalisées avec le lot de tacaud n'est pas comme pour la flore totale de 42. Ce n'est pas dû à des dénombrements qui n'ont pas été réalisés ou manquants, ils sont simplement inférieurs au seuil de la méthode (On ne peut considérer que ces dénombrements soient nuls).

La figure 12 (p. 110) nous permet de montrer que les cinétiques des évolutions de la flore H₂S pour les espèces étudiées ne sont pas identiques au niveau 3 d'indice de fraîcheur mais se confondent. On observe donc de faibles différences entre les espèces lorsque le poisson devient inconsommable : le dénombrement de la flore H₂S dépasse 10.000 ufc/g.

Figure 12. Modélisations des dénombrements de la flore H₂S des trois espèces étudiées en fonction de l'I.F.



Cette représentation des résultats permet de constater que l'on n'observe pas de phase de latence du développement de la flore H₂S et ceci même si l'on prend en considération les bornes des paramètres des différents modèles. **Nous n'avons donc pas de phase de latence pour la flore totale, pour la flore à Gram négatif et pour la flore H₂S lorsque que le poisson est pêché de façon industrielle.** On peut également constater que les cinétiques de la flore H₂S des différentes espèces ne sont pas les mêmes (comme pour les flores totale et à Gram négatif). Mais il faut être prudent sur l'interprétation de tels résultats car à partir de certains échantillons (en voie de putréfaction) qui ont servi pour des tests préalables, une flore H₂S supérieure à 10⁶.ufc/g a déjà été dénombrée.

4. Etude de la flore H₂S

A partir du suivi d'altération du lot de tacauds pêchés au printemps et conservés sous glace à 0°C. Nous avons isolé des colonies H₂S⁺ (noires) à partir des boîtes de dénombrement du milieu PCA-H₂S correspondant aux échantillons de tacauds des 5^{ème}, 10^{ème} et 15^{ème} jours d'altération.

Treize souches ont été prélevées parmi les colonies productrices d'H₂S sur les boîtes de PCA-H₂S au cinquième jour d'altération ; 53 au dixième jour; 52 au quinzième jour, soit 118 souches isolées au total. Nous avons réalisé différents tests d'identification (Chap. II § X. p.58) afin d'évaluer le type de flore (tableau 38 p. 111).

Tableau 38. Caractérisation des colonies H₂S isolées de la flore de tacaud ensemencées sur milieu PCA-H₂S.

Jours d'altération	5 ^{ème}	10 ^{ème}	15 ^{ème}	Total
Nombre de colonies testées	13	53	52	118
Gram	13 -	53 -	52 -	118 -
Morphologie	13 bacilles	53 bacilles	52 bacilles	118 bacilles
Mobilité	13 +	53 +	52 +	118 +
Catalase	13 +	51 + 2 -	52 +	116 + 2 -
Oxydase	13 +	50 + 3 -	52 +	115 + 3 -
Réduction OTMA				
24 h	2	30	33	65
48 h	7	23	19	49
72 h	4			4
Métabolisme du Glucose				
oxydatif	4	45	32	81
fermentatif	4	6	0	10
inerte	5	2	20	27
Nombre de <i>Shewanella</i>	9	44	52	105
% de <i>Shewanella</i>	69	83	100	89

Après examen, 105 souches se révèlent être des bacilles à coloration Gram négatif, possédant une catalase et une cytochrome oxydase. 78 d'entre elles présentent un métabolisme oxydatif sur milieu MEVAG, les 27 autres sont inertes. Toutes les souches réduisent l'OTMA.

89% de ces colonies peuvent être rattachées au genre *Shewanella* représenté dans le poisson par *Shewanella putrefaciens*. Cette proportion augmente au cours de l'altération : en effet, au 5ème jour la proportion de *Shewanella putrefaciens* n'est que de 69% pour atteindre le dernier jour 100%. *Shewanella putrefaciens* ne constitue la totalité des flores H₂S⁺ que pour un stade avancé de l'altération (15ème jour). Cette remarque apporte un complément d'information aux travaux de Gram et coll. (1987) et Jorgensen et Huss (1989) qui considéraient que la flore H₂S n'était constituée que de *Shewanella putrefaciens* (après 12 jours d'altération).

Les 14 souches productrices d' H₂S mais ne possédant pas les caractéristiques du genre *Shewanella* ont été identifiées sur galerie API 20NE (tableau 39 p. 112).

Tableau 39. Identification des 14 souches sur galerie API 20NE.

nombre de souche	Coloration Gram	Mobilité	Catalase	Oxydase	OTMA	Glucose	Identification
10	-	+	+	+	+	ferm.	9 <i>Vibrio damsela</i> 1 ?
2	-	+	+	-	+	oxy.	2 <i>Aeromonas salmonicida</i>
1	-	+	-	+	+	oxy.	1 <i>Shewanella putrefaciens</i>
1	-	+	-	-	+	oxy.	1 ?

ferm. : caractère fermentatif du glucose sur MEVAG.

oxy. : caractère oxydatif du glucose sur MEVAG.

Après examen, neuf souches ont été identifiées comme *Vibrio damsela*, 2 souches comme *Aeromonas salmonicida*, 1 souche comme *Shewanella putrefaciens*, 2 souches n'ont pu être identifiées.

Les résultats sont assez concordants avec l'identification faite auparavant sur les caractères étudiés par la macrogalerie, mais le diagnostic proposé par les galeries API 20NE est néanmoins discutable, le niveau d'identification pour chaque souche restant faible.

On peut donc affirmer que *Shewanella putrefaciens* représente en moyenne (105+1) 90 % de la flore H₂S sur PCA-H₂S.

Une remarque nous est apparue importante : toutes les souches H₂S testées sont capables de réduire l'OTMA. Ceci confirme les conclusions des travaux de Gram et coll. (1987) qui considèrent qu'il y a une relation étroite entre bactérie H₂S⁺ et OTMA⁺.

V. Recherche de la flore réductrice de l'OTMA

Cette étude doit permettre d'évaluer la capacité de certaines flores bactériennes du poisson à réduire l'OTMA. Pour ce faire, il faudra d'abord optimiser les méthodes permettant la détection (qualitative et quantitative) de la TMA produite et, ensuite, de corréler les résultats obtenus entre les différentes méthodes.

Différentes techniques de dosage ont été élaborées :

- Un test microbiologique qualitatif à partir du milieu de Gram et coll. (1987) modifié et du milieu de Debevère et Voëts (1974).

- Une technique quantitative utilisant un milieu spécifique qui permet un dosage chimique de la TMA par la méthode de Conway (1962).

Il convient d'abord d'opérer dans les conditions optimales pour chacune des méthodes considérées avant de passer à une application.

1. Capacité de certaines souches bactériennes à réduire l'OTMA

La réduction de l'OTMA a été testée sur 11 souches référencées CIP par les deux méthodes (qualitative et quantitative).

1.1. Méthode qualitative

a) Tests des milieux de culture

Nous avons voulu dans un premier temps vérifier la fiabilité des milieux de culture proposés sans OTMA afin de vérifier l'absence de faux positifs. Les milieux : Gram modifié et Debevère, sans OTMA sont ensemencés avec les différentes souches (tableau 40) et incubés à 25°C.

Tableau 40. Tests témoins sans OTMA des deux milieux de référence.

	Gram modifié		Debevère
	réponse	pH	
<i>Alteromonas communis</i>	Positif	6,8	Négatif
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Positif	6,7	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	Positif	6,7	Négatif
<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	Négatif	6,7	Négatif
<i>Micrococcus sedentarius</i>	Négatif	6,8	Négatif
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Neutre	6,9	Négatif
<i>Pseudomonas nautica</i>	Positif	6,7	Négatif
<i>Proteus mirabilis</i>	Positif	6,8	Négatif
<i>Serratia marcescens</i>	Positif	6,7	Négatif
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Positif	6,8	Négatif
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Positif	6,6	Négatif

Positif : OTMA⁺; Négatif : acidification du milieu

On constate la présence de faux positifs dans le milieu Gram modifié. Le milieu ne contenant pas d'OTMA il n'y a aucune raison pour que la rézasurine indique la présence de TMA (pH basique) formé par les bactéries. Il n'y a donc pas de correspondance entre le pH et la coloration de ces faux positifs. Il semble y avoir un problème d'indicateur (la rézasurine) d'autant que les mêmes tests réalisés sur le milieu Gram non modifié donne exactement les mêmes résultats. On ne constate aucun problème avec le milieu Debevère : les réponses sont négatives en raison d'une acidification du milieu.

Afin de vérifier s'il y avait bien un problème d'indicateur, nous avons à partir des milieux Debevère et Gram modifié, sans ajout d'OTMA, ajouté de la soude ($E_0 = -2,698$) ou de l'acide chlorhydrique ($E_0 = 1,359$) afin de faire varier le potentiel d'oxydo-réduction et le pH.

Nous n'avons observé aucun problème en ce qui concerne le milieu de Debevère : si le pH est acide le rouge de phénol devient jaune (négatif) et si le pH est basique l'indicateur est rouge pourpre (positif). Par contre pour le milieu Gram modifié, les réponses sont toujours positives (jaune) aussi bien à pH acide qu'à pH basique, l'indicateur utilisé dans ces conditions ne donne pas satisfaction. Les mêmes tests ont été réalisés sur le milieu Gram non modifié, nous avons obtenu les mêmes réponses. Les problèmes ne viennent donc pas des modifications apportées mais de l'indicateur qui doit réagir avec certains composants du milieu.

b) Recherches d'autres indicateurs

Les résultats étant intéressants avec le milieu de Debevère utilisant le rouge de phénol, nous avons essayé cet indicateur (tableau 41) dans le milieu Gram modifié sans OTMA ainsi que le rouge neutre.

Après quelques essais sur la concentration optimale du rouge de phénol et du rouge neutre (0,01 à 0,08 g/L) à ajouter dans le milieu Gram modifié, nous avons retenu une concentration de 0,02 g/L qui permet d'obtenir une variation de coloration adaptée.

Tableau 41. Tests témoins sur le milieu Gram avec le rouge neutre comme indicateur

	Gram avec le rouge de phénol (pH 6,7)		Gram avec le rouge neutre (pH 6,8)	
	réponse	pH	réponse	pH
<i>Alteromonas communis</i>	Neutre	6,7	Neutre	6,8
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Neutre	6,7	Positif	6,8
<i>Escherichia coli</i>	Neutre	6,5	Positif	6,7
<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	Neutre	6,6	Neutre	6,8
<i>Micrococcus sedentarius</i>	Neutre	6,5	Neutre	6,7
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Neutre	6,8	Neutre	6,9
<i>Pseudomonas nautica</i>	Neutre	6,6	Neutre	6,8
<i>Proteus mirabilis</i>	Négatif	6,6	Positif	6,6
<i>Serratia marcescens</i>	Négatif	6,6	Neutre	6,7
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Neutre	6,7	Neutre	6,9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Négatif	6,5	Positif	6,6

Positif : OTMA⁺; Négatif : acidification du milieu; Neutre : aucun changement

On constate que le rouge neutre donne, comme la résazurine, des faux positifs. Le rouge de phénol semble être un très bon indicateur. Toutefois il faut noter une discordance entre les réponses négatives et le pH, il semble y avoir un phénomène de potentiel d'oxido-réduction.

c) Exploitation de la méthode qualitative

Les onze souches ont été inoculées dans le milieu Gram retenu au paragraphe précédent (Gram modifié avec 0,02 g/l de rouge de phénol), le milieu de Debevère, mais également avec le milieu Gram d'origine afin de réaliser une critique constructive (tableau 42).

Tableau 42. Détermination des souches capables de réduire l'OTMA sur trois milieux

Milieux	Debevère	Gram retenu pH 6,9		Gram pH 6,8	
		réponse	pH	réponse	pH
<i>Alteromonas communis</i> H ₂ S ⁻	Négatif	Neutre	6,8	Neutre	6,7
<i>Aeromonas hydrophila</i> H ₂ S ⁺	Positif	Positif	7,7	Positif	7,6
<i>Escherichia coli</i> H ₂ S ⁻	Positif	Positif	7,7	Positif	7,4
<i>Flavobacterium branchiophilum</i> H ₂ S ⁻	Négatif	Neutre	6,8	Neutre	6,6
<i>Micrococcus sedentarius</i> H ₂ S ⁻	Positif	Positif	6,7	Positif	6,6
<i>Pseudomonas fluorescens</i> H ₂ S ⁻	Négatif	Neutre	6,9	Neutre	6,8
<i>Pseudomonas nautica</i> H ₂ S ⁻	Négatif	Neutre	6,8	Neutre	6,7
<i>Proteus mirabilis</i> H ₂ S ⁺	Positif	Positif	7,5	Positif	7,5
<i>Serratia marcescens</i> H ₂ S ⁻	Positif	Positif	7,6	Positif	7,5
<i>Shewanella putrefaciens</i> H ₂ S ⁺	Positif	Positif	7,5	Positif	7,2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> H ₂ S ⁺	Positif	Positif	7,6	Positif	7,6

Positif : OTMA⁺; Négatif : acidification du milieu; Neutre : aucun changement

Les milieux donnent des réponses similaires suivant les souches.

On remarque que toutes les souches productrices d'H₂S sont capables de réduire l'OTMA quel que soit le milieu, ce qui va dans le sens des suggestions faites par Gram et coll. (1987) et Jorgensen et Huss (1989). Mais *Micrococcus sedentarius*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens* qui sont des bactéries H₂S⁻, sont OTMA⁺. La réduction de l'OTMA n'est donc pas en relation avec la production d'H₂S, d'autant que cette réduction est connue et démontrée chez *Escherichia coli* (Ishimoto et Shimokawa, 1978 ; Takagi et coll., 1981 ; Silvestro et coll., 1986).

Afin de vérifier la fiabilité des expériences réalisées sur les milieux Gram, nous avons mesuré le pH du milieu après inoculation. Le tableau 42. montre une discordance de la réponse et du pH pour *Micrococcus sedentarius* qui serait OTMA⁺ selon la coloration mais avec un pH acide (négatif). Ce changement de coloration pourrait s'expliquer par un phénomène d'équilibre de potentiel d'oxydo-réduction.

Pour vérifier cette supposition il faut couler en boîtes de Pétri le milieu Gram modifié afin d'observer une diffusion de la coloration preuve d'un phénomène rédox. Nous avons donc gélosé ce milieu à 12 g/l d'agar et après l'avoir coulé en boîtes de Pétri pour réaliser les ensemencements des souches nous l'avons incubé à 25°C en anaérobiose et en aérobiose.

On observe des réponses similaires entre les conditions d'aérobiose et d'anaérobiose et une diffusion de la coloration et non une coloration des colonies. Cette diffusion rend impossible la distinction entre les colonies OTMA⁻ et OTMA⁺. On observe bien un phénomène d'équilibre de potentiel d'oxydo-réduction (figure 1 p. 45) qui est induit par l'OTMA et qui a été démontré par Castell (1950).

Il semble évident que de tels tests ne sont pas fiables et ne peuvent être utilisés pour déterminer la flore capable de réduire l'OTMA.

1.2. Méthode quantitative

a) Sur le milieu de culture Sea-fish

Dans un premier temps nous avons voulu évaluer la réduction de l'OTMA (méthode de Conway) sur un milieu le plus proche de la composition du poisson. Nous avons donc utilisé le milieu Sea-fish provenant d'une hydrolyse ménagée de déchets de poisson. Afin de vérifier l'absence de TMA et une activité de réduction de l'OTMA dans ce milieu (non ensemencé), ce qui fausserait les résultats, nous avons réalisé un dosage de TMA (tableau 43) sur ce milieu en fonction du temps de conservation (18 et 24 h) et de la température (0, 8, 20, 25 et 30°C).

Tableau 43. Dosage de la TMA (mg d'azote pour 100 ml de culture) dans le milieu Sea-fish

moyenne de 2 mesures par essai	18 h	24 h
0°C	8,16	10,2
8°C	8,6	13,8
20°C	11,1	13,8
25°C	6,9	9,7
30°C	9,3	13,8

On observe la présence systématique de TMA dans le milieu Sea-fish à des concentrations variables. De plus, on observe une évolution des réponses au cours du temps : ce qui laisse supposer une activité enzymatique résiduelle de la chair du poisson dans le milieu qui a pourtant subi une hydrolyse ou alors d'autres amines tertiaires provenant de l'hydrolyse sont dosées par cette méthode. La deuxième supposition est confirmée dans le paragraphe 1. p. 182.

L'utilisation d'un autre milieu a donc été envisagée afin de parer aux inconvénients du milieu sea-fish qui aurait pu fausser les dosages.

b) Essai d'un autre milieu

Le choix s'est alors porté sur un milieu différent de la composition du poisson mais néanmoins riche : le bouillon coeur-cerveille. Il est habituellement utilisé pour la culture de Streptocoques, Pneumocoques et autres germes exigeants, il conviendra donc parfaitement au développement de la flore rencontrée dans la chair de poisson.

Nous avons donc testé l'absence de TMA (méthode de Conway) dans les mêmes conditions que pour le milieu Sea-fish. Les résultats obtenus montrent l'absence de TMA dans le milieu quelque soit la température et la durée d'incubation.

Le bouillon coeur-cerveille ajusté à un pH de 6,8 (pH optimal pour la réduction de l'OTMA Gram et coll. (1987)) supplémenté par 1 ml d'une solution d'OTMA à 25 g/l (ajustée à pH 6,8 et filtrée à 0,45 μ m) sera donc utilisé comme base de milieu de culture pour cette étude (§ 2. p.56).

c) Exploitation de cette méthode

L'évaluation de la capacité des souches bactériennes à réduire l'OTMA sera donc analysée à partir d'un inoculum d'environ 10^6 bactéries/ml (correspondant à une flore élevée d'altération) sur le milieu à base de bouillon coeur-cerveille modifié (la concentration bactérienne est déterminée par dénombrement sur boîtes de Pétri). La quantité de TMA produite sur les onze souches a été déterminée selon la méthode de dosage de Conway.

Les dosages de la TMA produite sont effectués après une incubation à 0, 8, 20, 25, et 30°C pendant 18, 24, 48, 72 et 168 h.

Les quantités obtenues pour chaque souche sont indiquées dans les tableaux 44 (p. 119-120).

Toutes les souches sont capables de réduire l'OTMA et ceci quelles que soient les capacités de la souche à produire de l'H₂S. Ceci confirme la conclusion précédente (§ c. p. 115) et les recherches menées par Laycock et Regier (1971) et Easter et coll., (1982). Ces auteurs démontrent que la majeure partie de la flore de contamination est capable de produire de la TMA : *Acinetobacter*, *Pseudomonas* de type I et II, *Shewanella putrefaciens*, les flavobactéries, *Vibrio*, *Bacillus sp.*, *Coryneforme* et *Micrococci*. Ces mêmes bactéries sont capables de se développer en surface comme en profondeur de la chair de poisson (Strom et coll., 1979) d'où leur capacité à réduire en anaérobiose l'OTMA.

La réaction enzymatique se déroule au voisinage de 25-30°C à une exception près *Aeromonas hydrophila* plus psychrotrophe (8-20°C), mais il faut noter que les réactions ne sont pas nulles aux faibles températures (0 et 8°C). Donc la dégradation se réalise à faible température mais elle est considérablement réduite d'où l'importance de conserver la chair de poisson à basse température (inférieure à 2°C).

On observe des quantités de TMA variables suivant les souches pour une même température et un même temps d'incubation. Par exemple *Escherichia coli* produit de la TMA quelles que soient les conditions de culture et ceci en quantité non négligeable (22,1mg d'azote pour 100 ml de culture en 24 h à 0°C).

Ce dosage montre que toutes les bactéries réduisent l'OTMA. D'autre part, cette méthode permet de donner une information rapide (24 h.) sur les capacités d'une flore de contamination d'un poisson à réduire l'OTMA.

Cette méthode pourrait, pour les poissons conservés sous vide ou sous atmosphère modifiée avec ou sans fumage, avoir l'avantage de montrer l'activité OTMA réductase de la flore totale qui est généralement très faible sur ces produits alors que leur qualité organoleptique peut être décevante.

Tableaux 44. Dosage de la TMA (mg d'azote pour 100 ml de culture) produite par les souches bactériennes testées.

<i>Shewanella putrefaciens</i>		H ₂ S ⁺				
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours	
0°C	0	0,8	1,6	3,6	5,6	
8°C	0	0,9	1	2,9	5,6	
20°C	1,6	2,2	4,2	8,1	7,2	
25°C	2,2	2,5	7,2	9,1	27,7	
30°C	2	3,3	6,1	8,2	21,9	

<i>Proteus mirabilis</i>		H ₂ S ⁺				
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours	
0°C	0,4	2,8	2,8	4,15	5,5	
8°C	2,8	6,9	12,5	13,9	16,6	
20°C	11,1	19,4	34,6	48,4	66,4	
25°C	13,8	31,8	54,0	55,3	71,9	
30°C	38,7	52,6	49,8	52,6	55,3	

<i>Aeromonas hydrophila</i>		H ₂ S ⁺				
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours	
0°C	2,8	2,8	2,8	4,2	18,0	
8°C	2,8	3,6	23,5	31,8	110,0	
20°C	13,8	22,1	51,2	49,8	110,0	
25°C	33,2	36	52,6	49,8	55,0	
30°C	36	49,8	59,5	55,3	62,25	

<i>Serratia marcescens</i>		H ₂ S ⁻				
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours	
0°C	0,4	2,1	0,6	3,3	19,4	
8°C	5,5	4,2	8,3	23,2	44,3	
20°C	9,7	12,5	21,6	49,8	91,3	
25°C	18	22,1	32,4	55,3	> 111	
30°C	19,4	24,9	37,6	60,9	> 111	

<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		H ₂ S ⁺				
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours	
0°C	4,2	1,4	4,2	4,2	5,5	
8°C	4,2	6,9	16,9	16,9	27,7	
20°C	13,8	41,5	47,0	47	> 111	
25°C	49,8	44,3	58,1	49,8	> 111	
30°C	49,8	52,6	65	76,1	87,1	

<i>Alteromonas communis</i>		H ₂ S ⁻				
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours	
0°C	0	0	1,4	13,8	13,8	
8°C	1,4	1,4	2,8	5,5	9,7	
20°C	1,4	1,4	4,2	16,6	22,0	
25°C	2,8	4,2	4,2	9	12,5	
30°C	2,8	2,8	9,7	37	48,4	

<i>Flavobacterium branchiophilum</i>		H ₂ S ⁻			
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours
0°C	0	1,4	2,8	0	0
8°C	0	4,2	2,8	6,9	13,8
20°C	2,8	4,8	2,8	30,4	55,3
25°C	4,2	8,3	44,3	48,7	69,2
30°C	2,1	19,4	48,4	55,3	42,9

<i>Pseudomonas nautica</i>		H ₂ S ⁻			
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours
0°C	0	2,8	8,3	0	13,9
8°C	4,2	8,3	5,5	13,8	12,5
20°C	5,5	13,8	13,8	28,9	63,6
25°C	8,3	20,8	44,3	52,6	66,4
30°C	20,75	40,1	45,6	66,4	76,1

<i>Pseudomonas fluorescens</i>		H ₂ S ⁻			
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours
0°C	0	0	0	0	0,8
8°C	0	0	0	0	1,2
20°C	0	11,1	3,0	3,8	4,2
25°C	1,4	6,9	3,0	1,9	5,5
30°C	2,7	7,7	6,9	4,15	11,8

<i>Escherichia coli</i>		H ₂ S ⁻			
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours
0°C	0,7	22,1	20,8	8,3	2,8
8°C	4,2	33,2	40,1	49,8	12,5
20°C	13,8	33,2	55,3	58,1	55,3
25°C	36	49,8	55,3	66,4	107,9
30°C	49,8	69,2	83	102,4	60,9

<i>Micrococcus sedentarius</i>		H ₂ S ⁻			
°C / Temps	18 h	24 h	48 h	72 h	7 jours
0°C	0	0	2,7	4,15	4,2
8°C	0,4	2,8	2,1	5,5	13,8
20°C	1,4	6,9	29,1	6,9	47,0
25°C	6,9	nd	47,0	49,8	55,3
30°C	24,9	47	51,2	55,3	55,3

nd : non déterminé

VI. Mise au point d'une méthode de dosage de la réduction de l'OTMA

1.6.1. Temps d'incubation

Afin de pouvoir exploiter cette méthode sur du poisson (trois rascasses de niveaux d'altération différents), nous avons réalisé un ensemencement à partir d'un millilitre de suspension bactérienne des poissons dans le milieu coeur-cerveille modifié (chap. II § 2. p.56). L'incubation est réalisée à 25°C pendant : 4, 6, 8, 15, 24 et 36h (tableau 45).

Tableau 45. Essais de différents temps d'incubation pour une réduction optimale de l'OTMA dans le milieu coeur-cerveille modifié de suspensions bactériennes de poisson (n = 4).

temps d'incubation		4 h.	5 h.	8 h.	15 h.	24 h.	36 h.
Très altéré	ABVT=50,2 TMA=46,5	tr	tr	tr	4,98 ± 0,14	66,13 ± 5,81	52,99 ± 2,42
Altéré	ABVT=35,3 TMA=15,8	tr	tr	tr	2,40 ± 0,24	35,97 ± 0,55	49,25 ± 3,60
Frais	ABVT=24 TMA=5,5	tr	tr	tr	1,07 ± 0,27	10,10 ± 3,12	55,34 ± 3,88

tr : trace, ABVT et TMA en mg d'azote/100 g de chair, $x \pm \sigma$: mg d'azote/100 ml de culture ($\times 10$ pour mg/100g de chair).

Les temps d'incubation inférieurs à 15 h ne permettent pas l'appréciation de l'activité des bactéries à réduire l'OTMA. L'activité de la flore d'un poisson frais ou l'altéré ne peut plus être discernée après un temps d'incubation supérieur à 24 h. Les taux de TMA dosés après 36h d'incubation correspondent probablement à l'activité de certaines souches capables de mieux se développer en anaérobiose, le seuil limite de détection de la méthode de Conway n'est pas atteint. Il en découle que ces taux après 36 h d'incubation devraient être des seuils limites de dosages (ce qui est confirmé dans le paragraphe suivant).

Au vu de ces résultats, il est préférable d'utiliser une incubation de **24 h**. Elle permet, d'obtenir des différences plus importantes entre les niveaux d'altération d'une incubation de 15h.

2. Exploitation sur du poisson

A partir des lots de rascasses et morues pêchés en hiver et respectivement conservés entiers et éviscérés sous glace à 0°C. Nous avons réalisé le dosage de la réduction de l'OTMA défini dans les paragraphes précédents (Coeur-Cerveille modifié à 25°C pendant 24 h.).

Nous appellerons l'A.B.R. : l'activité bactérienne de réduction de l'OTMA.

Nous avons modélisé (tableau 46) les évolutions de l'A.B.R. uniquement en fonction de l'I.F. Nous avons vu que l'I.F. permet le mieux d'apprécier la cinétique d'évolution de la flore totale (variance la plus petite) sur ces deux espèces de poisson.

Tableau 46. Estimation a,b,c des différents paramètres des modèles retenus pour l'évaluation de l'activité bactérienne de réduction de l'OTMA (A.B.R.) en fonction de l'I.F..

Espèce	a	b	c	Σ^2	d.d.l.	Modèle	Seuil théorique
Rascasse	47,2754	21772,7331	4,4296	1196,8187	33	Gompertz	46,88
borne sup.	49,9273	157881,0312	7,2850				49,93
borne inf.	44,6236	-114335,5650	1,5741				
Morue	48,3909	99666982,3725	6,7443	1111,2407	42	logistique	41,62
borne sup.	50,6101	100696063,8775	6,8934				45,80
borne inf.	46,1718	98637900,8674	6,5951				36,88

d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle ; Seuil théorique en mg d'azote pour 100 ml de culture ; borne sup. et borne inf. : intervalle de confiance approché à 95 %.

On ne peut réaliser un seul modèle commun aux deux espèces (les modèles de chaque espèce sont différents). Si on ne peut pas regrouper l'ensemble des résultats ce n'est probablement pas dû à un effet espèce mais plutôt à un effet mode de conservation.

L'évolution de l'A.B.R. (figure 13) n'est peut être pas identique entre les espèces mais elle a malgré cette divergence plusieurs points en commun :

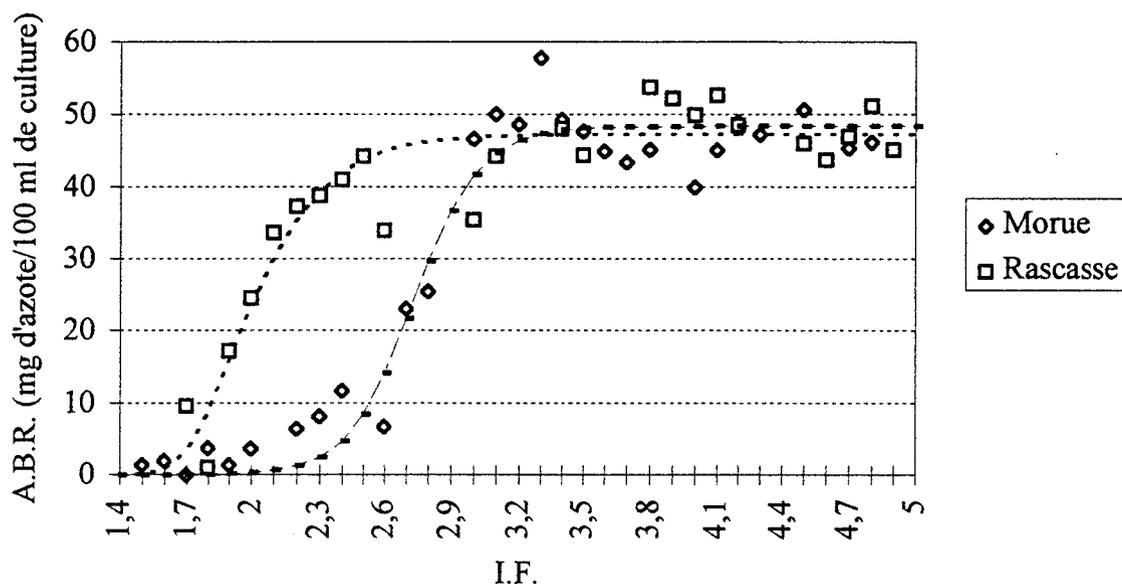
- lorsque le poisson est peu contaminé l'A.B.R. est voisine de 0 mg d'azote / 100 ml de culture,

- lorsque le poisson est inconsommable (I.F. = 3) l'A.B.R. atteint un seuil (valeurs estimées des paramètres $\alpha = a$) de l'ordre de 47 à 48 mg d'azote / 100 ml de culture soit pour une flore totale supérieure à 100.000 ufc/g, une flore à Gram négatif supérieure à 45.000 ufc/g et une flore H₂S supérieure à 10.000 ufc/g,

- l'A.B.R. a l'avantage d'évoluer rapidement.

Cette limite (47-48 mg d'azote / 100 ml de culture) est due à l'activité maximale de la flore d'altération à réduire l'OTMA en 24h.

Figure 13. Modélisation de l'A.B.R. en fonction de l'I.F. pour deux espèces de poissons étudiées (rascasse et morue).



On peut donc évaluer avec prudence différents "seuils" de qualité d'un poisson suivant l'A.B.R. :

- un poisson frais possède un A.B.R. inférieure à 10 mg d'azote / 100 ml de culture,
- un poisson **consommable** possède un **A.B.R. inférieure à 36 mg d'azote / 100 ml de culture**,
- par contre il est très difficile d'affirmer un seuil de rejet qui se situe au dessus de 36mg d'azote / 100 ml de culture. Par expérience un poisson consommable ayant un A.B.R. voisin de 36 mg d'azote / 100 ml de culture ne sera plus consommable le lendemain dans les conditions expérimentales de conservation.

Il apparait donc que l'A.B.R. dépendant directement de la flore d'altération permet en 24h. une évaluation de la fraîcheur du poisson.

On constate (figure 13) que cette activité n'apparait pas immédiatement mais après une phase de latence importante. Cette phase de latence est estimée pour la rascasse à un I.F.

de 1,7 soit 1 jour de conservation supplémentaire (dans nos conditions expérimentales) et pour la morue à un I.F. de 2,45 soit 2 à 3 jours de conservation supplémentaire (dans nos conditions expérimentales).

VII. Méthode qualitative d'évaluation de la production d'amines biogènes

Nous cherchons à mettre au point un milieu gélosé permettant la mise en évidence de bactéries capables de dégrader les acides aminés en amines biogènes par une coloration des colonies.

Nos premiers essais ont été réalisés à partir du milieu Möller auquel nous avons additionné différents acides aminés (lysine, histidine, ornithine) afin de déterminer la concentration (2,5, 5, 10, 15 g/l) permettant une lecture optimale dans des tubes inoculés par des souches bactériennes (§ IX. p. 57).

Après quelques essais sur la concentration en acide aminé à ajouter (10 g/L) et la possibilité de travailler en aérobiose (ce qui ne gêne pas les réactions enzymatiques), nous avons gélosé le milieu à 12 g/l. Ceci dans le but de pouvoir dénombrer les colonies capables de produire une ou plusieurs amines.

Nous avons également testé d'autres indicateurs de variation de pH : le rouge neutre, le rouge de phénol. Les observations sur les boîtes de Pétri réalisées avec les trois indicateurs sont les mêmes, on observe une diffusion de la coloration sur toute la boîte.

Cette observation traduit la présence d'un phénomène de potentiel d'oxydo-réduction qui, comme pour l'OTMA, empêche toute exploitation sur un milieu gélosé. Nous avons donc abandonné cette perspective.

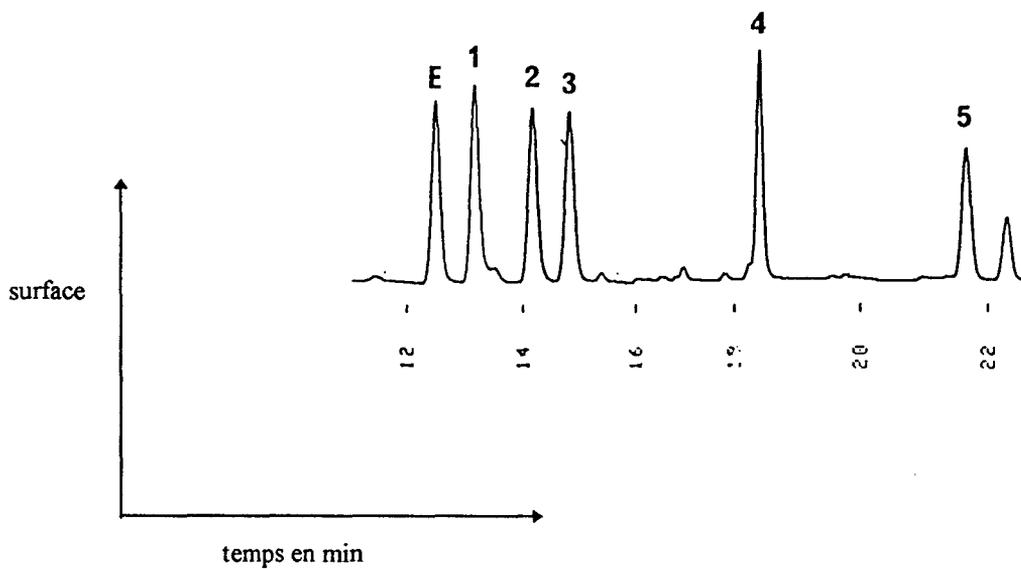
B. Etudes biochimiques

I. Mise au point d'une méthode de dosage des amines par C.L.H.P.

1. Intérêt du protocole retenu

Le protocole et le gradient d'élution présentés au chapitre II (§ II. p. 59) permettent la détection de 5 amines biogènes (putrescine : 1, cadavérine : 2, histamine : 3, spermidine : 4, spermine : 5) et de l'étalon interne (le 1-3 diaminopropane : E) en moins de 22 min. (figure 14) et une régénération de la colonne en 30 min.

Figure 14. Chromatogramme des amines biogènes détectées par C.L.H.P.



Afin de déterminer avec précision les quantités d'amines récupérées (ppm = mg/Kg de chair) dans la chair de poisson nous avons établi des droites de régression (Tableau 47 p.126) à partir des solutions standards.

Tableau 47. Estimation des paramètres a et b des droites de régression ($Y = \alpha X + \beta$) des amines étudiées :

amines	$a \times 10^{-5}$	$b \times 10^{-2}$	ddl	$s^2 \times 10^{-3}$
Putrescine	8,2752	1,2532	33	4,761
Cadavérine	10,1447	0,5139	34	3,249
Histamine	13,9934	0,7968	36	8,100
Spermidine	11,1415	1,1186	36	6,084
Spermine	12,9396	0,8387	35	4,900

a : coefficient directeur, b : ordonnée à l'origine, Y : ppm, X : surface du pic corrigée, ddl : degré de liberté, s^2 : variance résiduelle.

L'exploitation d'un tel protocole serait difficilement réalisable en analyse de routine sur du poisson car il est trop long. Toutes les étapes du protocole présenté dans le chapitre II (§ 2. p. 61) ont été optimisées successivement afin de réduire le temps de manipulation sans nuire à la récupération des amines.

2. Optimisation de la phase d'extraction

Les tests sont réalisés à partir des solutions standards d'amines mais également à partir de la chair de plusieurs morues consommables (ABVT < 30 mg/100 g de chair et TMA < 10 mg/100 g de chair). La chair a été broyée et conservée à -20°C , ceci permet de travailler avec le même échantillon de poisson et d'obtenir ainsi des résultats comparables.

2.1. Recherche de l'acide d'extraction

Les acides testés sont : l'acide perchlorique, l'acide trichloroacétique, l'acide trifluoroacétique. Nous n'avons pas testé l'acide chlorhydrique car lors d'expériences préalables menées au laboratoire (Malle et coll., 1996), cet acide s'est révélé être inadapté pour l'extraction de l'histamine (récupération des amines par une seule phase organique).

a) L'acide perchlorique

L'extraction des amines est testée en fonction de différentes concentrations d'acide perchlorique, de 0,05 à 0,4 M (tableau 48 p. 127).

Tableau 48. Effet de la concentration en acide perchlorique sur l'extraction des amines (ppm \pm σ).

n = 8	0,05 M	0,1 M	0,15 M	0,2 M	0,3 M	0,4 M
Putrescine	1,85 \pm 0,34	1,71 \pm 0,28	1,88 \pm 0,33	1,81 \pm 0,27	1,86 \pm 0,39	1,83 \pm 0,32
Cadavérine	1,86 \pm 0,44	1,92 \pm 0,39	1,90 \pm 0,39	1,91 \pm 0,22	1,82 \pm 0,28	1,72 \pm 0,22
Spermidine	0,27 \pm 0,16	0,24 \pm 0,18	0,25 \pm 0,20	0,35 \pm 0,18	0,33 \pm 0,21	0,31 \pm 0,17
Spermine	1,33 \pm 0,59	2,75 \pm 0,79	2,39 \pm 0,87	2,56 \pm 0,93	2,40 \pm 1,02	2,08 \pm 0,92

La concentration de l'acide influence la récupération des amines : la putrescine ne semble pas affectée par la concentration de l'acide, la cadavérine semble être mieux récupérée pour une concentration de 0,1 à 0,2 M d'acide, la spermidine est mieux récupérée à 0,2 M d'acide et la spermine ne supporte pas les trop faibles et trop importantes concentrations d'acide. L'histamine est en trop faible concentration pour être interprétable (inférieure à la surface seuil) mais elle existe à l'état de trace.

Nous choisissons donc une concentration intermédiaire de 0,2 M pour l'extraction des amines. Cette concentration est utilisée par Smith et Davies (1985).

b) l'Acide trichloroacétique

L'extraction des amines est testée en fonction de différentes concentrations d'acide trichloroacétique, de 1 à 7 % (p/v) (tableau 49).

Tableau 49. Effet de la concentration en acide trichloroacétique sur l'extraction des amines (ppm \pm σ).

n = 8	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %	6 %	7 %
Putrescine	0,95 \pm 0,35	0,93 \pm 0,45	0,89 \pm 0,33	0,96 \pm 0,38	0,92 \pm 0,40	0,89 \pm 0,37	0,93 \pm 0,42
Cadavérine	0,78 \pm 0,23	0,80 \pm 0,22	0,89 \pm 0,25	0,81 \pm 0,24	0,80 \pm 0,22	0,60 \pm 0,19	0,43 \pm 0,10
Spermidine	0	0	0,12 \pm 0,06	0,15 \pm 0,07	0,17 \pm 0,09	0,16 \pm 0,11	0,19 \pm 0,12
Spermine	0,86 \pm 0,23	0,89 \pm 0,34	0,85 \pm 0,28	0,88 \pm 0,32	0,91 \pm 0,24	0,85 \pm 0,31	0,72 \pm 0,21

Comme pour l'acide perchlorique, les récupérations varient suivant l'amine considérée: la putrescine ne semble pas dépendre de la concentration en acide, la cadavérine est moins bien récupérée aux fortes et faibles concentrations d'acide, la spermidine n'est pas récupérée aux faibles concentrations d'acide et la spermine est très mal récupérée aux fortes concentrations d'acide. L'histamine n'a jamais été détectée même à l'état de trace.

En conclusion une concentration intermédiaire de 4 ou de 5 % en acide trichloroacétique semble permettre une meilleure extraction des amines. La concentration de

5% est retenue, Mietz et Karmas (1977) utilisent cette concentration pour l'extraction des amines.

c) l'Acide trifluoroacétique

L'extraction des amines est testée en fonction de différentes concentrations d'acide trifluoroacétique, de 1 à 7 % (v/v) (tableau 50).

Tableau 50. Effet de la concentration en acide trifluoroacétique sur l'extraction des amines (ppm \pm σ).

n = 8	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %	6 %	7 %
Putrescine	0,91 \pm 0,37	0,90 \pm 0,28	0,89 \pm 0,27	0,90 \pm 0,33	0,86 \pm 0,34	0,84 \pm 0,29	0,73 \pm 0,30
Cadavérine	0,83 \pm 0,32	0,84 \pm 0,25	0,88 \pm 0,21	0,68 \pm 0,28	0,36 \pm 0,16	0	0
Spermidine	0	0	0,16 \pm 0,08	0,16 \pm 0,06	0,15 \pm 0,07	0,13 \pm 0,05	0,11 \pm 0,10
Spermine	0,89 \pm 0,28	0,92 \pm 0,24	0,90 \pm 0,31	0,87 \pm 0,28	0,80 \pm 0,29	0,75 \pm 0,25	0,70 \pm 0,20

La récupération des amines diminue en fonction de l'augmentation de la concentration en acide trifluoroacétique. La spermidine n'est pas extraite aux faibles concentrations d'acide. L'histamine n'a jamais été détectée.

La concentration intermédiaire de 3 % en acide trifluoroacétique permettrait une bonne extraction des amines.

d) Comparaison

Nous allons comparer les résultats de la meilleure concentration d'extraction pour chaque acide (tableau 51).

Tableau 51. Comparaison de la récupération des différentes amines aux meilleures concentrations pour chaque acide (ppm \pm σ).

n = 8	Perchlorique à 0,2 M	Trichloroacétique à 5 %	Trifluoroacétique à 3 %
Putrescine	1,81 \pm 0,27	0,92 \pm 0,40	0,89 \pm 0,27
Cadavérine	1,91 \pm 0,22	0,80 \pm 0,22	0,88 \pm 0,21
Spermidine	0,35 \pm 0,18	0,17 \pm 0,09	0,16 \pm 0,08
Spermine	2,56 \pm 0,93	0,91 \pm 0,24	0,90 \pm 0,31

Il n'y a pas de différences significatives entre les récupérations des amines par l'acide trichloroacétique à 5 % et l'acide trifluoroacétique à 3 % (les tests-t sont non significatifs : put=0,16 ; cad=0,74 ; spd=0,23 ; spm=0,07). Par contre, Il y a des différences significatives

entre les récupérations des amines avec l'acide perchlorique 0,2 M et les autres acides (les test-t sont significatifs à 95 % compris entre : $5,22 < \text{put} < 6,81$, $9,58 < \text{cad} < 10,09$, $2,53 < \text{spm} < 2,72$). En effet, on constate que l'on récupère près de 1,5 à 2,5 fois plus d'amine avec l'acide perchlorique. Nous utiliserons donc l'acide perchlorique à 0,2 M pour l'extraction des amines biogènes du poisson.

2.2. Température de broyage

Nous nous sommes aperçus que l'utilisation de l'ultraturrax entraîne un échauffement de la chair broyée.

Pour pallier aux problèmes engendrés par l'utilisation de l'ultraturrax nous broyons à froid les échantillons dans un cryostat à -20°C . Les récupérations des amines à partir de la chair de morue broyée à -20°C et à température ambiante (tableau 52) sont sans équivoque : il y a de 12 à 25 % d'amines récupérées en plus si le broyage est effectué à -20°C .

Tableau 52. Effet de la température de broyage du poisson sur la récupération des amines en ppm ($n = 34$).

amines	récupération à 20°C	récupération à -20°C	Gain de récupération à -20°C
Putrescine	$1,50 \pm 0,18$	$1,90 \pm 0,14$	25,38 % (test-t = 11,84 ***)
Cadavérine	$1,64 \pm 0,11$	$1,93 \pm 0,08$	17,93 % (test-t = 12,4 ***)
Histamine	nd	nd	nd
Spermidine	ni	ni	ni
Spermine	$2,12 \pm 0,44$	$2,38 \pm 0,37$	12,07 % (test-t = 3,45 **)

(ppm $\pm \sigma$) ; nd : non détecté ; ni : non interprété ; *** : différence significative à 99,9 % ; ** : différence significative à 99 %.

On constate que les surfaces des pics d'histamine sont inférieures au seuil (1000) pour pouvoir être interprétées sur cet échantillon. Toutefois, on remarque que pour la spermidine sa récupération est variable en raison d'un pic de co-élution gênant et ayant un temps de rétention variable (ceci se traduit par des écarts types importants tableau 51 p. 128). Les surfaces ne peuvent donc être interprétées.

Afin d'éviter cette variabilité et de risquer une erreur d'interprétation, l'injecteur automatique a été réfrigéré par le même cryostat. La comparaison de récupération des amines d'un même échantillon de morue conservé à différentes températures (tableau 53 p. 130), nous montre que l'on peut maintenant interpréter les pics de spermidine et d'histamine.

Tableau 53. Quantités d'amines extraites (ppm) de la chair de morue après un broyage à froid et conservées à différentes températures (n = 36).

Température de conservation	20°C	- 20°C
Putrescine	1,91 ± 0,16	1,95 ± 0,13
Cadavérine	1,93 ± 0,09	1,99 ± 0,06
Histamine	nd	0,45 ± 0,09
Spermidine	ni	2,43 ± 0,23
Spermine	2,99 ± 0,41	2,47 ± 0,13

(ppm ± σ) ; nd : non déterminé ; ni : non interprété

Le fait d'utiliser le cryostat pour le broyage et pour le conditionnement de l'injecteur automatique améliore considérablement l'extraction et la détection mais aussi la reproductibilité des résultats (tableau 54). Pour le démontrer, nous avons comparé les coefficients de variation (écart type / moyenne) des solutions standards d'amines marquées conservées à température ambiante et à froid. Les résultats montrent que l'utilisation du cryostat permet ainsi d'éviter des variations pendant plusieurs jours et de stabiliser les amines marquées.

Tableau 54. Comparaison des coefficients de variation (CV %) d'une conservation de 6 jours à température ambiante (20°C) ou à -20°C (n = 24)

amines	analyse à 20°C	analyse à -20°C
Putrescine	5,3674 %	0,0438 %
Cadavérine	3,2429 %	0,0952 %
Histamine	9,0328 %	0,1681 %
Spermidine	10,6270 %	0,7811 %
Spermine	1,1848 %	0,8936 %

Les coefficients de variation obtenus en 6 jours de conservation à -20°C sont meilleurs que ceux obtenus à l'aide du protocole initial (tableau 55).

Tableau 55. Comparaison de la stabilité des amines analysées (CV %) entre le protocole initial en 6 h d'injection (30 min. × 12) et le protocole transformé à -20°C pendant 6 jours.

amines	protocole initial (n = 12)	analyse à -20°C (n = 24)
Putrescine	2,667 %	0,0438 %
Cadavérine	2,545 %	0,0952 %
Histamine	2,434 %	0,1681 %
Spermidine	3,791 %	0,7811 %
Spermine	4,255 %	0,8936 %

Pour la suite de notre optimisation, l'extraction et l'injection à -20°C seront utilisées pour la récupération et l'analyse des amines sur du poisson.

2.3. Nombre de broyages

Quatre broyages successifs ont été réalisés à partir de la chair de morue fraîche. Les résultats présentés dans le tableau 56 démontrent qu'il est préférable de ne réaliser qu'un seul broyage. En effet, en prenant en considération la dilution de chaque broyage, nous récupérons entre 64 et 79 % des amines dès la première extraction. Les manipulations sont donc réduites et par conséquent les risques de variations le sont aussi.

Tableau 56. Quantités d'amines (ppm) récupérées après quatre extractions successives sur de la chair de morue.

amines	1er broyage	2ème broyage	3ème broyage	4ème broyage
Putrescine	3,75 ± 0,30	0,78 ± 0,21	0,19 ± 0,05	nd
Cadavérine	1,86 ± 0,05	0,63 ± 0,29	0,29 ± 0,07	nd
Histamine	1,06 ± 0,13	0,37 ± 0,09	nd	nd
Spermidine	5,39 ± 0,87	2,07 ± 0,54	0,56 ± 0,26	nd
Spermine	4,52 ± 0,29	1,75 ± 0,45	0,69 ± 0,17	nd

(ppm ± σ) ; nd : non détecté

2.4. Temps de broyage

L'échauffement lors du broyage et les pertes d'amines importantes sont évités grâce à l'utilisation d'un cryostat. Cependant un paramètre n'a pas encore été étudié : il s'agit du temps de broyage des 5 g de chair dans 10 ml d'acide perchlorique 0,2M.

La récupération des amines extraites de chair de morue fraîche ayant subi de 10 à 240 secondes de broyage est présentée dans le tableau 57 (p. 132). Un broyage de 90 secondes permet d'obtenir un rendement maximal pour la spermidine et la spermine. Au-delà de 60 secondes le rendement est maximal pour la putrescine. La récupération de la cadavérine ne semble pas dépendre du temps de broyage. nous estimons qu'un broyage de 90 secondes est optimal pour la récupération des amines.

Tableau 57. Récupération des amines extraites (ppm) de la chair de morue en fonction de différents temps de broyage (t.b.) à -20°C avec ultraturrax à 20.000 tr/min.

t.b.	10''	20''	30''	40''	50''	60''	80''	90''	100''	120''	180''	240''
Putrescine	1,62 ± 0,31	1,64 ± 0,25	1,94 ± 0,25	1,83 ± 0,19	1,78 ± 0,16	4,08 ± 1,88	2,03 ± 0,18	1,92 ± 0,18	2,07 ± 0,15	1,90 ± 0,15	2,10 ± 0,08	1,94 ± 0,22
Cadavérine	0,88 ± 0,10	0,84 ± 0,14	0,92 ± 0,13	0,80 ± 0,09	0,83 ± 0,09	0,84 ± 0,08	0,84 ± 0,05	0,92 ± 0,08	0,85 ± 0,13	0,85 ± 0,19	0,80 ± 0,08	0,72 ± 0,14
Spermidine	0,32 ± 0,10	0,46 ± 0,08	0,82 ± 0,22	0,42 ± 0,06	0,49 ± 0,06	0,47 ± 0,05	1,32 ± 0,40	1,87 ± 0,10	1,58 ± 0,22	1,23 ± 0,25	1,00 ± 0,11	0,94 ± 0,13
Spermine	1,63 ± 0,35	1,89 ± 0,31	2,08 ± 0,50	2,11 ± 0,30	2,34 ± 0,23	2,23 ± 0,15	2,66 ± 0,32	2,71 ± 0,23	2,40 ± 0,58	2,72 ± 0,51	2,21 ± 0,18	2,26 ± 0,48

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons)

2.5. Temps de centrifugation

Nous cherchons à savoir si la centrifugation qui permet l'élimination d'agrégats protéiques peut avoir une influence sur la récupération et le marquage des amines.

Le tableau 58 montre que la centrifugation n'a pas d'incidence sur la récupération et le marquage des amines et qu'elle peut être réduite au minimum. Pour cette raison, nous avons essayé de remplacer la centrifugation par une filtration des broyats de poisson sur papier Whatman n°3 pour réduire le temps de manipulation. Aucune différence significative (test-t) n'a pu être établie en raison des faibles teneurs des amines dans le poisson frais. Nous avons donc travaillé à partir des solutions standards (tableau 59) afin d'établir s'il y a un désavantage de travailler en filtrant le broyat de poisson.

La centrifugation permet de réduire les pertes de récupération des amines (même si les tests-t démontrent des différences non significatives entre amines filtrées et non filtrées). De ce fait, nous avons retenu un temps de centrifugation de 5 minutes et non une filtration.

Tableau 58. Récupération des amines extraites de la chair de morue (ppm) en fonction de différents temps de centrifugation (t.c).

t.c.	5'	10'	15'	20'	30'
Putrescine	1,73 ± 0,27	2,02 ± 0,21	1,64 ± 0,44	2,19 ± 0,17	1,95 ± 0,15
Cadavérine	1,06 ± 0,12	0,94 ± 0,12	0,94 ± 0,14	1,00 ± 0,15	0,97 ± 0,03
Spermidine	0,54 ± 0,21	0,55 ± 0,09	0,39 ± 0,11	0,74 ± 0,09	0,72 ± 0,10
Spermine	6,96 ± 7,13	4,45 ± 4,58	8,57 ± 9,58	3,85 ± 4,88	2,58 ± 0,39

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons)

Tableau 59. Récupération (ppm) des solutions d'amines filtrées ou non avant marquage.

	centrifugé	filtré	Perte %
Putrescine	13,44 ± 0,61	12,57 ± 1,02	6,43
Cadavérine	14,90 ± 0,72	14,10 ± 1,17	5,35
Histamine	18,19 ± 0,85	17,71 ± 1,40	2,65
Spermidine	15,88 ± 1,21	14,78 ± 1,23	6,93
Spermine	13,91 ± 0,80	12,61 ± 9,36	9,36

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons)

2.6. pH de la phase aqueuse

En ajustant correctement le pH de la solution aqueuse, les amines sont mieux récupérées dans la phase organique (on supprime l'ionisation des fonctions aminées $\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_2$).

a) Avec du poisson

Nous avons testé différents volumes d'une solution de carbonate de sodium saturée pour ajuster le pH de la phase aqueuse (tableau 60 p. 135).

Il existe une relation entre la récupération de chaque amine extraite du poisson et le pH de la solution aqueuse : la cadavérine est mieux extraite à un pH de 9,8-10,6, alors que la putrescine, la spermidine et la spermine sont mieux extraites à pH plus élevé ; supérieur à 11.

On peut estimer que la récupération optimale de toutes les amines est obtenue avec de l'acide perchlorique 0,2 M pour un volume de **300 µl de carbonate de sodium** (pH de 11,25).

Il faut noter que nos expériences ont également été réalisées avec de l'acide perchlorique 0,1, 0,3 et 0,4 M, pour vérifier que l'on a toujours la meilleure extraction à cette concentration d'acide quel que soit le volume de carbonate de sodium ajouté.

b) Avec des solutions d'amines

Une récupération optimale des amines est donc obtenue avec l'acide perchlorique 0,2M et 300 µl de carbonate de sodium pour amener le pH à 11,25. Ce pH est beaucoup plus élevé que celui recommandé dans la bibliographie (Mietz et Karmas, 1977 ; 1978 ; Bravo et coll., 1988) : pH de 9,5. Nous avons donc défini, pour des solutions standards quels étaient les différents volumes de carbonate de sodium à ajouter à l'acide perchlorique d'extraction 0,2 M pour obtenir un pH basique optimal (tableau 61 p. 135).

Ce tableau nous montre que le volume de carbonate de sodium optimal pour récupérer les solutions standards n'est que de 15 µl soit un pH voisin de 9,5. On peut donc en conclure que **la récupération des amines extraites du poisson est différente de celle des amines en solutions**. La différence peut s'expliquer par des liaisons ioniques entre amines et substrat (poisson).

Nos recherches ne seront plus effectuées qu'à partir de chair de poisson et non plus avec les solutions standards.

Tableau 60. Récupération (ppm) des amines extraites de la chair de morue par de l'acide perchlorique 0,2 M en fonction du volume de Na₂CO₃.

Volume de Na ₂ CO ₃	5 µl	10 µl	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl
Putrescine	1,27 ± 0,40	1,76 ± 0,28	2,11 ± 0,21	2,02 ± 0,04	2,15 ± 0,11	2,43 ± 0,15	2,41 ± 0,18	2,55 ± 0,34	2,37 ± 0,29
Cadavérine	1,31 ± 0,08	1,20 ± 0,14	1,21 ± 0,24	1,27 ± 0,21	1,30 ± 0,17	1,18 ± 0,15	1,18 ± 0,13	1,13 ± 0,17	0,90 ± 0,14
Spermidine	nd	nd	0,20 ± 0,03	0,24 ± 0,06	0,41 ± 0,05	0,83 ± 0,09	3,11 ± 0,18	2,77 ± 0,29	3,13 ± 0,43
Spermine	0,28 ± 0,11	0,47 ± 0,09	0,87 ± 0,27	1,21 ± 0,25	2,09 ± 0,38	3,26 ± 0,30	6,82 ± 0,54	5,82 ± 0,83	7,47 ± 1,09
pH	7,55	9,78	10,36	10,64	10,88	11,13	11,25	11,3	11,37

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons); nd : non détecté

Tableau 61. Récupération (ppm) des amines des solutions standard en fonction du volume de Na₂CO₃ en présence d'acide perchlorique 0,2 M.

	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl	175 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl
Putrescine	0,46 ± 0,24	12,64 ± 0,77	12,61 ± 0,76	12,78 ± 0,59	11,88 ± 0,48	11,22 ± 0,96	11,93 ± 0,80	11,34 ± 0,67	11,63 ± 1,15	11,63 ± 0,49	11,10 ± 1,01	10,94 ± 1,13	10,58 ± 0,86	10,71 ± 1,19	9,22 ± 1,36
Cadavérine	0,59 ± 0,24	13,52 ± 0,80	13,62 ± 0,73	13,91 ± 0,67	13,03 ± 0,44	12,84 ± 1,01	13,14 ± 0,80	12,76 ± 0,95	12,81 ± 1,23	12,96 ± 0,57	12,58 ± 1,14	12,71 ± 1,41	12,61 ± 1,00	12,56 ± 0,65	10,42 ± 1,94
Histamine	0,41 ± 0,01	13,61 ± 0,79	12,81 ± 0,73	13,23 ± 0,53	12,39 ± 0,50	12,18 ± 0,64	12,52 ± 0,96	12,11 ± 0,95	11,78 ± 1,33	12,09 ± 0,49	11,55 ± 1,12	11,60 ± 1,25	10,72 ± 0,82	8,69 ± 0,61	6,70 ± 1,30
Spermidine	nd	12,55 ± 0,72	17,05 ± 1,06	17,43 ± 0,75	14,51 ± 1,71	12,41 ± 2,02	11,70 ± 0,90	11,35 ± 0,99	12,29 ± 1,78	12,02 ± 0,59	11,48 ± 1,95	12,05 ± 2,15	12,31 ± 1,24	12,66 ± 1,46	10,06 ± 2,18
Spermine	0,23 ± 0,09	15,61 ± 0,96	15,09 ± 1,42	15,77 ± 0,72	14,70 ± 0,72	12,70 ± 1,21	12,76 ± 1,01	12,53 ± 1,06	13,17 ± 1,71	13,59 ± 0,74	12,31 ± 1,31	12,65 ± 0,84	13,13 ± 1,12	12,94 ± 1,39	10,66 ± 2,05
pH	1,75	8,2	9,46	9,71	9,87	10,23	10,37	10,45	10,52	10,61	10,64	10,69	10,81	10,86	10,92

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons); nd : non détecté

3. Optimisation de la phase de marquage

3.1. Concentration de la solution de chlorure de dansyl

Le tableau 62 (p. 137) présente les différentes concentrations en chlorure de dansyl utilisées pour le dosage (sur la chair de morue).

La présence de pics de co-élutions aux très fortes concentrations de Chlorure de dansyl (150 et 200 mg/100 ml d'acétone) entraîne de très "faibles récupérations" de spermine. La concentration intermédiaire permettant un meilleur marquage semble être la concentration habituellement utilisée (7,5 mg/ml). Ceci paraît logique car la concentration de l'acide, le volume de carbonate de sodium et la concentration du chlorure de dansyl sont fortement liés.

3.2. Temps de marquage

Le tableau 63 (p. 137) regroupe les différentes amines extraites de la morue et marquées pendant des temps différents. Les résultats montrent un temps optimal de marquage par dansylation relativement court. En effet, à 60°C la dansylation optimale est obtenue en 5 minutes. Ce temps relativement faible de 5 minutes a déjà été notifié par Tapuhi et coll. (1981) lors d'une étude sur la dansylation d'acides aminés.

4. Optimisation de la phase de neutralisation du chlorure de dansyl

Un volume de 100 µl de la solution de L-proline à 100 mg/ml d'eau est suffisant pour neutraliser l'excès de chlorure de dansyl. Il ne faut en réalité que quelques microlitres de cette solution pour le neutraliser (<20 µl). La L-proline est utilisée car une fois marquée avec le chlorure de dansyl, elle reste dans la phase aqueuse et ne vient pas interférer avec les amines biogènes récupérées dans la phase organique.

Tableau 62. Récupération (ppm) des amines extraites de la chair de morue en fonction de la concentration de la solution de chlorure de dansyl
(mg/ml d'acétone).

mg/ml d'acétone	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20
Putrescine	2,74 ± 0,29	3,11 ± 0,29	3,12 ± 0,42	3,38 ± 0,30	3,15 ± 0,33	2,91 ± 0,33	2,60 ± 0,42	2,81 ± 0,44	2,45 ± 0,16	2,56 ± 0,47
Cadavérine	0,37 ± 0,04	0,50 ± 0,05	0,62 ± 0,04	0,91 ± 0,14	0,76 ± 0,10	0,90 ± 0,10	0,84 ± 0,13	1,04 ± 0,13	1,91 ± 0,05	1,36 ± 0,13
Spermidine	1,28 ± 0,19	1,74 ± 0,17	1,91 ± 0,20	2,04 ± 0,21	2,08 ± 0,32	2,33 ± 0,39	2,41 ± 0,27	2,47 ± 0,26	0,30 ± 0,09	0,25 ± 0,09
Spermine	2,11 ± 0,42	3,10 ± 0,39	3,58 ± 0,45	3,99 ± 0,52	4,02 ± 0,31	2,93 ± 0,69	2,35 ± 0,37	2,65 ± 0,49	2,32 ± 0,27	2,17 ± 0,48

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons); nd : non détecté

Tableau 63. Récupération (ppm) des amines extraites de la chair de morue en fonction du temps de marquage (min.) à 60°C.

min.	2'	4'	6'	8'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
Putrescine	3,01 ± 0,61	3,23 ± 0,56	3,28 ± 0,74	3,13 ± 0,70	2,92 ± 0,21	2,97 ± 0,22	3,05 ± 0,27	2,94 ± 0,29	2,61 ± 0,42	2,67 ± 0,15
Cadavérine	1,65 ± 0,14	1,80 ± 0,11	1,75 ± 0,13	1,52 ± 0,19	1,45 ± 0,11	1,42 ± 0,12	1,25 ± 0,12	1,13 ± 0,10	1,07 ± 0,12	1,01 ± 0,09
Spermidine	4,29 ± 0,98	4,60 ± 0,92	4,28 ± 1,03	3,96 ± 0,94	3,71 ± 0,18	3,36 ± 0,28	3,28 ± 0,37	3,13 ± 0,30	2,99 ± 0,48	2,97 ± 0,31
Spermine	6,71 ± 2,15	7,41 ± 1,88	6,86 ± 2,26	6,03 ± 1,77	5,44 ± 0,35	3,74 ± 0,50	4,78 ± 1,05	4,47 ± 0,61	4,22 ± 1,02	4,58 ± 0,86

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons)

Par ailleurs le temps de neutralisation à 20°C peut être réduit à 15 minutes comme nous le montrent les résultats du tableau 64 même si pour la putrescine il serait préférable de neutraliser pendant 30 minutes (test-t=2,67 différence significative à 95 % entre la récupération de 15 et 30 min.).

Tableau 64. Récupération (ppm) des amines extraites de la chair de morue en fonction du temps de neutralisation (min) du chlorure de dansyl par la proline à 20°C

min.	5'	10'	15'	20'	30'
Putrescine	1,50 ± 0,18	1,93 ± 0,10	2,36 ± 0,31	2,56 ± 0,34	2,76 ± 0,29
Cadavérine	1,02 ± 0,27	1,09 ± 0,26	1,27 ± 0,25	1,19 ± 0,26	1,15 ± 0,21
Spermidine	3,42 ± 0,51	3,36 ± 0,29	3,77 ± 0,34	3,66 ± 0,40	3,74 ± 0,36
Spermine	4,75 ± 0,36	4,61 ± 0,59	5,18 ± 0,49	4,89 ± 0,61	4,79 ± 0,37

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons)

Des essais de neutralisation à 60°C (tableau 65) nous révèlent un temps intermédiaire de 4 minutes.

Tableau 65. Récupération (ppm) des amines extraites de la chair de morue en fonction du temps de neutralisation (min) du chlorure de dansyl par la proline à 60°C

min.	2'	4'	6'	8'	10'
Putrescine	2,05 ± 0,22	2,03 ± 0,15	2,21 ± 0,19	2,29 ± 0,18	2,39 ± 0,29
Cadavérine	1,18 ± 0,16	1,11 ± 0,10	1,15 ± 0,09	1,12 ± 0,05	1,16 ± 0,11
Spermidine	3,00 ± 0,13	2,53 ± 0,13	2,38 ± 0,20	2,29 ± 0,13	2,61 ± 0,23
Spermine	3,56 ± 0,58	3,05 ± 0,56	2,75 ± 0,64	3,01 ± 0,34	3,14 ± 0,43

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons)

Afin de pouvoir choisir entre une neutralisation à 20°C et à 60°C, nous avons réalisé les manipulations sur les mêmes échantillons (tableau 66).

Tableau 66. Récupération (ppm) des amines extraites de la chair de morue en fonction du type de neutralisation du chlorure de dansyl.

	60°C bouché (4 min.)	60°C non bouché (4 min.)	20°C (15 min.)
Putrescine	2,08 ± 0,14	1,88 ± 0,30	2,13 ± 0,27
Cadavérine	1,15 ± 0,03	1,11 ± 0,13	1,43 ± 0,08
Spermidine	1,06 ± 0,35	0,60 ± 0,46	1,42 ± 0,45
Spermine	1,81 ± 0,07	1,60 ± 0,28	2,02 ± 0,32

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons)

On observe des pertes importantes à 60°C si le tube n'est pas bouché. D'autre part les récupérations d'amines sont, d'une façon générale, supérieures pour une neutralisation à température de 20°C pendant 15 minutes.

Ces observations confirment que le temps de passage à 60°C ne doit pas dépasser le temps de marquage retenu (5 min.) pour éviter tout risque de perte.

5. Optimisation de la phase de purification des amines

Plusieurs phases organiques présentées dans le tableau 67 ont été testées sur les amines extraites de la chair de morue.

Tableau 67. Récupération (ppm) des amines extraites de la chair de morue en fonction de la phase organique utilisée.

	500 µl de T + 300 µl d'AN	500 µl de T + 200 µl d'AN	300 µl de T	300 µl d'AN
Putrescine	1,63 ± 0,10	2,44 ± 0,24	nd	0,55 ± 0,14
Cadavérine	1,33 ± 0,14	1,71 ± 0,16	nd	0,30 ± 0,04
Spermidine	2,77 ± 0,04	4,49 ± 0,32	nd	0,95 ± 0,15
Spermine	2,66 ± 0,25	4,30 ± 0,68	nd	1,00 ± 0,18

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons); nd : non détecté; T : toluène; AN : acétonitrile.

On peut retenir que la phase de purification avec le toluène évaporé par l'azote à froid et la récupération des amines par l'acétonitrile est incontournable. Toutes les simplifications se sont avérées décevantes (toluène ou acétonitrile seul). Par contre on peut réduire à 200µl le volume d'acétonitrile et ainsi abaisser les seuils de détections. Après correction de la récupération due au volume d'acétonitrile (1/3), on trouve par le test-t des différences significatives à 95 % (put=2,79, spd=6,99, spm=2,81) entre les récupérations avec 200 ou 300µl d'acétonitrile sauf pour la cadavérine (test-t=0,68).

6. Vérification de la méthode

Nous avons montré que l'utilisation de l'acide perchlorique 0,2 M donne les meilleurs résultats. Nous avons complété ce test en réalisant dans les conditions optimisées (pH voisin de 11,2) des comparaisons (tableau 68 p. 140) de récupérations des amines avec des acides ou alcool recommandés dans la littérature : de l'acide trichloroacétique (ATCA) à 5 % (Mietz et Karmas, 1977), de l'acide chlorhydrique (AC) 0,12 M (Lin et Lai, 1980), de l'acide

trifluoroacétique (AFA) (3 % concentration optimale testée) de l'acide perchlorique (AP) 0,2M (Malle et coll., 1996) et du méthanol (Hui et Taylor, 1983).

Tableau 68. Comparaison de la récupération (ppm) des amines en fonction de l'acide ou de l'alcool utilisé.

	AP 0,2 M	ATCA 5 %	AFA 3 %	AC 0,12 M	Méthanol
Putrescine	4,81 ± 0,14	3,92 ± 0,96	3,94 ± 0,32	4,14 ± 0,17	2,47 ± 0,11
Cadavérine	2,05 ± 0,12	1,25 ± 0,18	0,82 ± 0,11	1,91 ± 0,13	0,39 ± 0,06
Spermidine	5,27 ± 0,31	4,45 ± 1,04	2,93 ± 0,21	0,79 ± 0,17	2,15 ± 0,29
Spermine	9,17 ± 0,38	8,42 ± 1,79	4,69 ± 0,21	2,83 ± 0,14	0,10 ± 0,08

moyenne ± écart type de huit mesures (2 × 4 échantillons)

Les meilleurs résultats sont obtenus avec de l'acide perchlorique 0,2 M.

A la suite de ces optimisations le protocole retenu est le suivant :

Ajouter à 5g de chair homogénéisée 100µl de la solution étalon, un seul broyage dans 10 ml d'HClO₄ 0,2 M est réalisé à -20°C par un ultraturrax à 20.000 tr/min. pendant 90 secondes.



Centrifuger 5 min. à 2500 g à 2°C.



A 100 µl de surnageant ajouter 300 µl de Na₂CO₃ et 400 µl de la solution de chlorure de dansyl dans un tube que l'on peut fermer hermétiquement.



Agiter et incuber pendant 5 minutes à 60°C et à l'obscurité.



Ajouter 100 µl de la solution de L-proline agiter et attendre 15 min à l'obscurité à 20°C.



Ajouter 500 µl de toluène, agiter et laisser décanter quelques minutes.
Prendre le tube et congeler la phase aqueuse à l'aide du cryostat.



Récupérer la phase organique et l'évaporer sous un flux d'azote.



Récupérer le culot par 200 µl d'acétonitrile (agiter).



Filtrer à 0,2 µm avant injection.

L'injecteur est réfrigéré à -20°C et les amines se trouvent à l'obscurité

7. Nombre de mesures et d'échantillons à réaliser

Pour cela, nous avons, à partir de morue fraîche, pris 4 échantillons (4 × 5g) et après broyage et centrifugation nous avons réalisé 8 dosages d'amines par échantillons (8 mesures).

Les résultats obtenus nous ont permis de réaliser différentes analyses de variance.

Nous avons, dans un premier temps, réalisé des comparaisons entre échantillons en les mélangeant et en réduisant leur nombre : 4 par 4 (1 combinaison), 3 par 3 (3 combinaisons) et 2 par 2 (6 combinaisons) avec 8 dosages par échantillon et ceci pour chaque amine. Aucune différence significative de récupération n'a été obtenue entre les différents échantillons.

Nous avons ensuite réalisé les mêmes analyses de variance mais en diminuant le nombre de dosages. Aucune différence significative n'a été obtenue entre les différents échantillons et dosage même avec 2 échantillons et 2 dosages.

On peut donc en conclure que cette méthode permet d'obtenir des résultats fiables avec seulement 2 dosages par échantillon.

8. Recherche d'autres amines

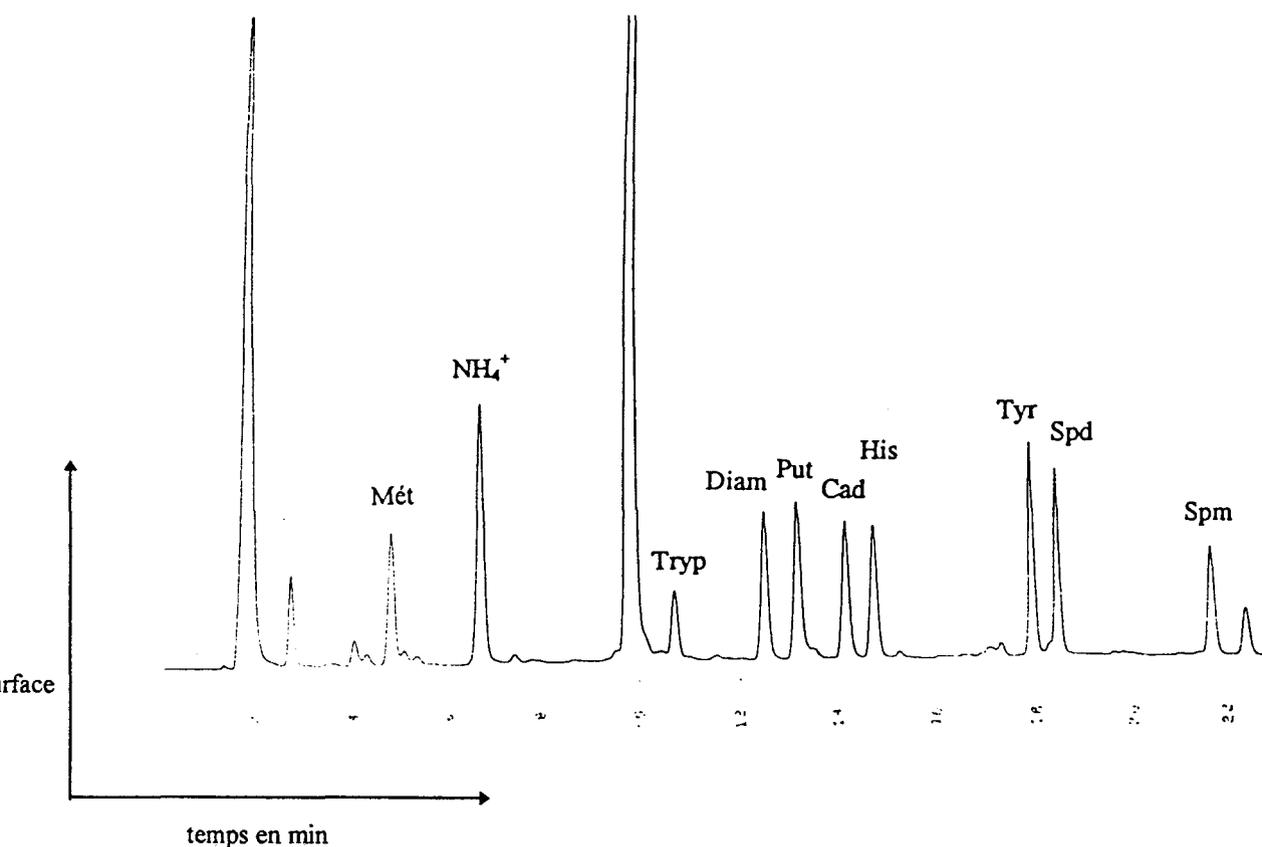
Nous avons une méthode simple et rapide qui, pour l'instant, n'apporte pas plus de renseignements sur l'altération que les travaux de Mietz et Karmas (1977, 1978). Nous avons donc recherché d'autres amines pour mieux évaluer l'altération d'un poisson.

Une étude bibliographique nous a révélé que l'analyse simultanée des amines volatiles méthylamine et ammoniac et d'amines biogènes (Hayman et coll., 1985) pouvait être réalisée par marquage au chlorure de dansyl. D'après les travaux de Yamanaka et coll. (1989) sur des miettes de saumon, la tyramine apparaît au bout de 5 jours de conservation à 5°C et augmente très rapidement. Les travaux qu'ils ont menés sur la truite ont montré l'apparition, non seulement de la tyramine, mais de tryptamine au bout de 3 jours de conservation.

Nous avons donc testé à partir de solutions standards à 80 mg/100 ml d'eau, la méthylamine hydrochlorate, la tyramine hydrochlorate, la tryptamine hydrochlorate et l'ammoniac.

Le protocole permet de détecter également ces différentes amines figure 15 (p. 142).

Figure 15. Chromatogramme des différentes amines analysées par chromatographie liquide.



Les temps de rétention des différentes amines sont : NH_4^+ 4,7 min., met 6,7 min., try 10,5 min., diam 12,5 min., put 13,1 min., cad 14,1 min., his 14,7 min., tyr 17,7 min., spd 18,4 min., spm 21,7 min.

Nous avons donc établi des droites de régression (tableau 69 p. 143) pour toutes les amines étudiées à partir de solutions d'amines allant, de 0,04 à 0,32 mg/10 ml d'acide perchlorique, sauf pour l'ammoniac de 0,04 à 81,92 mg/10 ml d'acide perchlorique. Ces droites nous permettront d'évaluer les quantités d'amines récupérées dans la chair de poisson.

Ce protocole optimisé permet de réduire considérablement les manipulations, alors, il devient exploitable et applicable pour une analyse de routine. On peut remarquer qu'il est proche de celui utilisé pour la recherche des amines dans le saucisson sec proposé par Eerola et coll. (1993) mais plus rapide. Il permet, comme lui, de caractériser la β phényléthylamine qui a le même temps de rétention que l'étalon interne.

Tableau 69. Estimation des paramètres respectifs a et b des droites de régression $Y = \alpha X + \beta$ des différentes amines.

	$a \times 10^{-4}$	$b \times 10^{-2}$	ddl	$s^2 \times 10^{-3}$	seuil (ppm)
Ammoniac	7,5394	-209.298	18	1238,0546	0,750
Méthylamine	1,2119	-5.1466	18	0,9610	0,070
Tryptamine	2,4458	-4.9872	18	0,9672	0,195
Putrescine	1,0471	-4.5414	18	1,7472	0,059
Cadavérine	1,3549	-5.8797	18	1,1357	0,077
Histamine	1,4130	-5.3764	18	1,5761	0,088
Tyramine	1,2293	-5.7992	18	1,2180	0,065
Spermidine	1.3309	-5.7165	18	1,1560	0,075
Spermine	1.4324	-5.7151	16	1,2745	0,086

a : coefficient directeur, b : ordonnée à l'origine, Y : ppm, X : surface du pic corrigé, ddl : degré de liberté, s^2 : variance résiduelle.

Avant d'aller plus loin dans l'exploitation de ces dosages nous avons vérifié que les optimisations du protocole sont valables pour les nouvelles amines. Les résultats ne changent en rien les différentes optimisations réalisées.

9. Évaluation de l'altération du poisson par les amines détectées

Les recherches que nous avons menées dans ce domaine l'ont été bien avant que le protocole est été complètement optimisé. Elles ont commencées dès que l'analyse des amines sur chromatogramme s'effectuait sans problèmes, c'est à dire, dès l'utilisation du traitement à basse température.

Des recherches portées sur le dosage des amines biogènes (Mietz et Karmas, 1977; 1978 ; Bravo et coll., 1988) ont toutes démontré que les amines prises séparément ne sont pas intéressantes pour évaluer l'altération. Les amines détectées comme nous l'avons noté précédemment, sont en quantités variables d'une espèce à une autre aussi bien quantitativement que qualitativement. Ces variations proviennent de la diversité de composition de la chair mais également de la diversité de la contamination bactérienne qui est la principale productrice d'amines (Chap. I § 2.1. p.30).

D'autres recherches se sont donc portées sur la détermination d'indice de qualité. Les travaux de Mietz et Karmas (1977) ont permis d'établir un indice d'amines biogènes (QI)

faisant intervenir la putrescine (put), la cadavérine (cad), l'histamine (his), la spermine (spm) et la spermidine (spd) :

$$QI = \frac{\text{Put (ppm)} + \text{cad (ppm)} + \text{his (ppm)}}{\text{Spm (ppm)} + \text{Spd (ppm)}} \times 100$$

Afin d'estimer la fiabilité de cet indice ; nous l'avons comparé aux différentes valeurs obtenues concernant l'ABVT, la TMA, le rapport P % et l'indice de fraîcheur (I.F.) pour différentes espèces de poissons. Nous avons ensuite, suivant la même logique, établi de nouveaux indices d'altération avec les amines que nous pouvons détecter.

Nous utilisons trois espèces de poisson : le carrelet (*Pleuronectes platessa*), le merlan (*Merlangus merlangus*) et le hareng (*Clupea harengus*). Ils ont été analysés par le protocole non complètement optimisé. Ces espèces ont été choisies en raison de leurs divergences physiologique et biochimique : le carrelet est un poisson plat et maigre, le merlan est un poisson maigre et le hareng est un poisson gras.

9.1. Information sur les amines volatiles

On remarque (tableaux 70, 71 et 72 p. 146-147) une augmentation de l'ABVT en fonction de l'altération quelle que soit l'espèce de poisson étudiée, ceci confirme les travaux de Malle et Tao (1987) et Malle et Poumeyrol (1989). Le taux de 30 mg/100g ne correspond pas, pour toutes les espèces, à la limite de consommation : il est atteint avant l'indice 1 de fraîcheur pour le merlan et à un niveau d'altération plus avancé (I.F.= 0,1) pour le carrelet. Ceci a déjà été signalé dans la première partie de ce chapitre.

Une augmentation de la TMA (que l'on retrouve dans le calcul de P %) confirme les résultats de Fernández-Salguero et Mackie (1987) et Malle et Tao (1987). L'évolution des taux d'ABVT et l'évolution des taux de TMA en fonction de l'altération sont dépendantes des espèces étudiées. On peut en conclure que l'évaluation de l'altération d'un poisson par ces critères ou indice pris séparément n'est pas suffisamment fiable.

Des résultats semblables sont obtenus lors de l'étude microbiologique et nous avons montré que l'I.F. était le moyen le plus fiable pour mesurer l'altération. Mais, l'I.F. ne sera pas le seul critère pris en compte pour les interprétations.

9.2. Recherche d'un indice d'altération

Les tableaux 70, 71 et 72 (p. 146-147) démontrent l'importance de certaines amines qui évoluent de façon significative en fonction de l'altération, mais de façon indépendante vis-à-vis de l'espèce étudiée. Une augmentation de la putrescine, cadavérine, histamine, tyramine est observée quel que soit le poisson (confirmée par les résultats de Mietz et Karmas (1977), Fernández-Salguero et Mackie (1987), Ritchie et Mackie, (1980), Yamanaka et coll., (1989)). Elle se réalise en deux étapes, lentement et de façon régulière pendant le début de l'altération puis de façon exponentielle en fin d'altération.

L'ammoniac augmente de façon régulière.

En ce qui concerne la spermidine et la spermine, d'une façon générale, elles diminuent au cours de l'altération (confirmé par les résultats de Mietz et Karmas (1977), Fernández-Salguero et Mackie (1987), Ritchie et Mackie, (1980)). Mais pour le carrelet la diminution de la spermine ne se fait qu'en toute fin d'altération et pour le hareng on n'observe qu'une diminution de la spermidine.

La quantité de méthylamine diminue en fonction de l'altération, toutefois pour le merlan on observe une augmentation pendant les premiers stades puis une diminution rapide une fois que le poisson est devenu inconsommable (valeurs inférieures à l'indice 3 de fraîcheur).

La tryptamine n'est jamais détectée avec ces espèces.

Aucun seuil général de putréfaction ne peut être établi à l'aide de ces différentes amines, car elles se trouvent en quantités variables d'une espèce à une autre. On peut éventuellement observer qu'un poisson frais a des taux de putrescine et/ou de cadavérine inférieurs à 10 ppm et des taux d'histamine et/ou de tyramine inférieurs à 5 ppm. Mais en aucun cas on ne peut affirmer qu'un poisson est inconsommable s'il dépasse ces taux.

Afin de pouvoir apprécier l'altération des poissons par le taux des amines biogènes ou des amines volatiles récupérées par C.L.H.P. nous proposons dans le tableau 73 (p. 148) différents rapports en fonction de l'I.F. : le QI, un rapport regroupant toutes les amines biogènes détectées (a.b.) et un rapport regroupant les amines volatiles (a.v.).

Tableau 70. Évolution de l'altération de la chair de carrelet.
(amine en ppm, ABVT et TMA en mg/100g, et P en % ; moyennes regroupant de 1 à 4 résultats par I.F. ($\bar{x} \pm \sigma$))

I.F.	ABVT	TMA	P %	NH ₄ ⁺	met	put	cad	his	tyr	spd	spm
1,5	16,55	1,05	6,34	9799 ± 813	18,94 ± 1,76	1,49 ± 0,11	0,95 ± 0,08	0,55 ± 0,08	0,52 ± 0,05	8,97 ± 0,98	12,27 ± 1,23
1,6	14,95	1,68	11,24	9119 ± 283	29,77 ± 1,08	1,7 ± 0,13	2,47 ± 0,36	0,26 ± 0,02	0,58 ± 0,06	10,31 ± 0,92	11,78 ± 0,23
2,2	13,44	0,84	6,25	6973 ± 1502	16,7 ± 3,18	1,77 ± 0,40	2,61 ± 0,85	0,48 ± 0,14	0,70 ± 0,21	7,12 ± 1,98	13,86 ± 4,14
2,3	13,69	1,18	8,59	9107 ± 258	24,5 ± 0,65	3,56 ± 0,17	6,31 ± 0,34	0,54 ± 0,06	1,17 ± 0,07	13,97 ± 0,98	16,36 ± 1,31
2,4	14,7	1,6	10,86	10586 ± 1089	34,06 ± 2,34	2,14 ± 0,22	6,03 ± 0,37	0,46 ± 0,12	0,89 ± 0,03	9,40 ± 0,38	8,87 ± 0,52
2,45	14,62	1,85	12,14	9171 ± 248	15,67 ± 2,19	3,87 ± 0,28	17,04 ± 1,60	1,29 ± 0,11	2,11 ± 0,28	13,71 ± 1,83	17,64 ± 1,69
2,5	16,88	3,44	20,4	9674 ± 591	18,1 ± 1,07	5,23 ± 0,35	25,81 ± 1,87	1,30 ± 0,37	2,46 ± 0,19	14,06 ± 1,22	21,57 ± 2,66
2,8	18,31	4,31	27,06	7499 ± 498	20,24 ± 0,72	4,75 ± 0,30	23,74 ± 1,22	6,06 ± 0,31	4,61 ± 0,27	10,21 ± 0,66	11,48 ± 0,77
3	18,4	3,28	17,81	7743 ± 1649	13,53 ± 2,80	6,25 ± 1,21	31,46 ± 5,85	7,04 ± 1,33	4,11 ± 0,70	11,67 ± 1,94	14,33 ± 2,34
3,1	21,17	5,12	24,21	9477 ± 732	14,07 ± 0,42	15,67 ± 0,98	90,80 ± 4,42	29,62 ± 1,03	12,96 ± 0,96	11,56 ± 0,96	15,19 ± 1,42
3,2	23,44	4,7	20,07	10421 ± 571	7,47 ± 0,67	31,94 ± 1,56	115,61 ± 5,82	29,27 ± 1,81	20,67 ± 0,97	12,39 ± 0,90	15,19 ± 0,71
3,5	26,38	5,04	19,11	10829 ± 684	10,14 ± 1,46	43,96 ± 1,71	150,44 ± 5,01	34,39 ± 2,12	38,52 ± 1,62	11,87 ± 1,58	9,04 ± 0,43
3,9	34,19	8,89	26,29	10477 ± 168	3,66 ± 0,22	64,93 ± 2,44	191,78 ± 5,24	125,72 ± 8,04	63,35 ± 2,15	7,81 ± 0,56	9,81 ± 0,38

Tableau 71. Évolution de l'altération de la chair de merlan.
(amine en ppm, ABVT et TMA en mg/100g, et P en % ; moyennes regroupant de 1 à 4 résultats par I.F. ($\bar{x} \pm \sigma$))

I.F.	ABVT	TMA	P %	NH ₄ ⁺	met	put	cad	his	tyr	spd	spm
1,8	14,62	1,77	12,07	6987 ± 604	63,02 ± 3,19	5,57 ± 0,43	2,44 ± 0,18	0,29 ± 0,02	0,99 ± 0,05	3,98 ± 0,39	6,74 ± 1,01
1,9	18,31	2,52	13,76	10895 ± 791	68,83 ± 3,63	4,52 ± 0,43	5,41 ± 0,19	0,68 ± 0,06	0,99 ± 0,09	5,17 ± 0,09	3,50 ± 0,51
2,3	18,73	3,61	19,28	11886 ± 724	58,98 ± 2,58	8,38 ± 0,59	8,77 ± 0,72	0,80 ± 0,07	1,75 ± 0,18	4,42 ± 0,53	5,22 ± 0,65
2,4	21,42	5,71	26,67	15514 ± 2969	65,64 ± 4,15	7,75 ± 1,03	5,97 ± 0,81	0,89 ± 0,11	1,40 ± 0,08	2,24 ± 0,20	4,97 ± 1,10
2,5	34,61	13,02	37,62	20352 ± 2788	71,03 ± 9,54	38,11 ± 6,09	38,7 ± 5,88	2,65 ± 0,44	7,97 ± 1,33	5,89 ± 0,98	2,93 ± 0,24
2,9	33,43	10,92	32,67	25341 ± 158	81,93 ± 2,75	43,86 ± 3,53	86,61 ± 5,78	17,84 ± 1,06	18,6 ± 1,01	8,77 ± 1,10	2,43 ± 0,44
3,1	49,64	22,51	45,35	18236 ± 726	45,54 ± 2,33	58,09 ± 4,31	91,67 ± 4,87	15,91 ± 0,54	41,52 ± 2,81	2,79 ± 0,20	0,64 ± 0,09
3,3	53,93	27,63	51,24	27430 ± 6838	35,13 ± 11,10	88,82 ± 26,12	270,87 ± 82,64	35,47 ± 12,49	66,91 ± 22,90	3,54 ± 1,14	1,06 ± 0,42
3,4	53,93	25,28	43,88	24161 ± 3600	45,53 ± 7,75	97,62 ± 21,25	253,86 ± 44,96	35,95 ± 5,54	65,21 ± 12,08	2,44 ± 0,51	1,53 ± 1,03
3,5	60,14	27,98	46,52	22554 ± 750	56,26 ± 1,49	102,19 ± 5,32	154,79 ± 7,41	21,62 ± 1,09	58,41 ± 2,71	3,61 ± 0,25	0,63 ± 0,06
3,7	55,44	29,57	53,33	19789 ± 756	27,07 ± 1,19	109,17 ± 7,83	235,46 ± 14,59	43,93 ± 3,03	80,55 ± 4,05	3,93 ± 0,40	1,28 ± 0,07
4	71,82	38,14	53,1	13743 ± 98	8,81 ± 0,31	87,79 ± 0,54	264,54 ± 0,06	52,2 ± 1,68	98,05 ± 2,70	0,88 ± 0,05	0,50 ± 0,04

Tableau 72. Évolution de l'altération de la chair de hareng.
(amine en ppm, ABVT et TMA en mg/100g, et P en % ; moyennes regroupant de 1 à 4 résultats par I.F. ($\bar{x} \pm \sigma$))

I.F.	ABVT	TMA	P %	NH ₄ ⁺	met	put	cad	his	tyr	spd	spm
1,6	19,4	1,43	7,37	14882 ± 577	46,46 ± 3,64	5,38 ± 1,67	0,54 ± 0,10	1,18 ± 0,16	1,20 ± 0,14	37,65 ± 5,09	2,85 ± 0,49
1,7	20,08	1,51	7,53	15109 ± 495	43,56 ± 4,89	3,30 ± 0,29	0,73 ± 0,43	0,75 ± 0,25	1,10 ± 0,11	37,41 ± 3,14	3,12 ± 0,90
2	20,24	1,34	6,64	15574 ± 750	47,40 ± 2,88	4,10 ± 0,40	0,64 ± 0,15	0,97 ± 0,26	1,67 ± 0,19	34,69 ± 3,40	3,44 ± 0,55
2,1	20,75	1,51	7,29	15110 ± 1142	41,81 ± 3,64	4,53 ± 0,65	0,67 ± 0,24	1,30 ± 0,47	1,55 ± 0,18	33,54 ± 4,09	3,27 ± 0,75
2,4	20,66	2,18	10,55	16112 ± 405	46,63 ± 2,21	4,60 ± 0,18	0,91 ± 0,04	1,84 ± 0,34	1,51 ± 0,13	34,54 ± 3,36	3,65 ± 0,24
2,5	25,12	2,69	10,7	16734 ± 2506	50,08 ± 11,41	3,96 ± 0,90	1,01 ± 0,04	1,11 ± 0,22	1,57 ± 0,36	32,84 ± 6,69	2,15 ± 0,60
2,6	19,4	1,85	9,52	15014 ± 2000	35,81 ± 2,11	4,56 ± 0,06	1,18 ± 0,12	1,13 ± 0,06	1,28 ± 0,13	27,68 ± 1,63	3,23 ± 0,36
2,8	21,34	2,44	11,42	15584 ± 1976	46,88 ± 6,46	2,82 ± 0,44	4,60 ± 0,69	1,32 ± 0,46	1,99 ± 0,28	39,21 ± 5,44	3,97 ± 0,78
2,9	24,36	4,03	16,55	15794 ± 2339	45,29 ± 7,26	2,43 ± 0,42	6,61 ± 0,99	2,21 ± 0,39	2,08 ± 0,44	33,76 ± 6,60	3,47 ± 1,05
3,2	28,9	8,57	29,65	17151 ± 2807	33,36 ± 5,06	11,02 ± 2,43	23,48 ± 4,63	9,72 ± 1,82	4,93 ± 1,13	20,01 ± 4,92	4,08 ± 1,96
3,6	32,76	12,43	37,94	19352 ± 1909	30,83 ± 4,41	12,01 ± 1,05	48,72 ± 4,28	29,46 ± 3,04	9,30 ± 0,95	14,77 ± 1,36	3,39 ± 0,39
3,8	38,39	16,8	43,76	17832 ± 487	20,99 ± 1,14	22,52 ± 2,78	71,47 ± 6,86	68,45 ± 5,32	12,71 ± 1,61	13,55 ± 1,57	2,72 ± 0,62
4	40,32	18,31	45,42	17730 ± 2325	15,05 ± 3,23	29,25 ± 3,08	84,18 ± 10,45	68,91 ± 9,65	23,28 ± 3,25	10,62 ± 0,94	2,93 ± 0,33

Tableau 73. Évaluation de l'altération par des rapports regroupant des amines détectées ($x \pm \sigma$).

I.F.	QI			I.F.	a.b.			I.F.	a.v.		
	Carrelet	Merlan	Hareng		Carrelet	Merlan	Hareng		Carrelet	Merlan	Hareng
1,6	20 ± 1		18 ± 1	1,6	23 ± 1		21 ± 1	1,6	238 ± 24		322 ± 15
1,7			12 ± 1	1,7			14 ± 1	1,7			350 ± 33
1,7		76 ± 5		1,7		86 ± 6		1,7		155 ± 7	
1,9		113 ± 11		1,9		124 ± 12		1,9		164 ± 9	
2			16 ± 1	2			20 ± 1	2			329 ± 12
2,1			17 ± 1	2,1			21 ± 2	2,1			409 ± 68
2,2	22 ± 1			2,2	26 ± 1			2,2	410 ± 17		
2,3	34 ± 1	175 ± 12		2,3	38 ± 2	194 ± 15		2,3	372 ± 9	189 ± 21	
2,4	47 ± 1	203 ± 14	20 ± 1	2,4	52 ± 1	223 ± 17	23 ± 1	2,4	312 ± 41	212 ± 27	346 ± 9
2,45	71 ± 1			2,45	78 ± 2			2,45	594 ± 65		
2,5	91 ± 3	899 ± 41	18 ± 1	2,5	98 ± 3	989 ± 47	22 ± 1	2,5	535 ± 10	286 ± 4	368 ± 7
2,6			21 ± 3	2,6			25 ± 3	2,6			378 ± 24
2,7				2,7				2,7			
2,8	160 ± 8		19 ± 1	2,8	181 ± 9		24 ± 1	2,8	372 ± 36		333 ± 13
2,9		1337 ± 97	30 ± 2	2,9		1506 ± 115	36 ± 2	2,9		310 ± 10	348 ± 10
3	171 ± 5			3	187 ± 5			3	572 ± 14		
3,2	511 ± 26	4835 ± 321		3,2	559 ± 27	6048 ± 424		3,2	673 ± 48	401 ± 9	
3,4	643 ± 34		173 ± 30	3,4	718 ± 37		192 ± 33	3,4	1401 ± 78		514 ± 21
3,6		8702 ± 472		3,6		10160 ± 552		3,6		794 ± 49	
3,8		12968 ± 2896		3,8		15086 ± 3445		3,8		533 ± 16	
4	1100 ± 65	6584 ± 532		4	1285 ± 76	7967 ± 666		4	1079 ± 81	401 ± 5	
4,2			499 ± 44	4,2			550 ± 50	4,2			633 ± 45
4,4		7507 ± 679		4,4		9062 ± 771		4,4		731 ± 23	
4,6			1002 ± 49	4,6			1080 ± 54	4,6			853 ± 67
4,8	2176 ± 34			4,8	2536 ± 34			4,8	2873 ± 195		
5		30096 ± 1617	1342 ± 59	5		37237 ± 2178	1513 ± 68	5		1563 ± 68	1196 ± 85

QI : Indice dérivé des travaux de Mietz et Karmas (1977) $(\text{put}+\text{cad}+\text{his}/\text{spd}+\text{spm}) \times 100$

a.b. : Indice regroupant toutes les amines biogènes $(\text{put}+\text{cad}+\text{his}+\text{tyr}/\text{spd}+\text{spm}) \times 100$

a.v. : Indice regroupant les amines volatiles (NH_4/met)

moyennes regroupant de 1 à 4 résultats par I.F.

En ce qui concerne le QI et le rapport (a.b.), ils évoluent de la même façon : ils augmentent faiblement et régulièrement en début d'altération puis de façon exponentielle au-delà. Ces rapports sont fiables mais, comme pour l'ABVT, P ou les différentes amines, ils sont spécifiques à chaque espèce. De plus leur évolution est peu significative en début d'altération. En ce qui concerne les amines volatiles avec le rapport (a.v.), aucun seuil ne peut être déterminé en raison des résultats variables en début d'altération.

D'autres rapports ont donc été proposés dans le tableau 74. (p. 150) regroupant toutes les amines détectées.

Si on réalise une addition des rapports a.b. et a.v. (a.r.) en tenant compte des pourcentages, aucun seuil ne peut être établi (résultats variables en début d'altération). Ce rapport est trop dépendant du taux des amines volatiles (a.v.) et notamment de l'ammoniac.

Pour le rapport t.a. (toutes les amines), l'augmentation en fonction de l'altération n'est pas régulière même si un seuil peut être compris entre 220 et 230. Ce seuil correspond exactement pour le hareng à l'indice de fraîcheur 3 et à des taux d'amines biogènes importants (tableau 72 p. 147).

Le merlan à ce seuil (220-230), possède des taux d'ABVT, TMA, P et d'amines biogènes importants (tableau 70 p. 147). Le rapport t.a. permet donc de prendre en considération les deux types d'amines. Le problème est qu'il est peu significatif du début d'altération et donc n'apporte pas plus de renseignements que les critères ou indices déterminés à moindre coût.

En raisons de ces différentes observations (rapports peu évolutifs en début d'altération, et taux d'ammoniac élevés) nous nous sommes intéressés au seul rapport permettant d'établir un seuil; le rapport t.a. en réduisant par mille la quantité d'ammoniac et en ramenant en pourcentage ce rapport.

Le rapport devient donc (quantité d'amine en ppm) Vallé et coll. (1996) :

$$I.A. = \frac{NH_4^+ / 1000 + Put + Cad + His + Tyr + Tryp}{NH_4^+ / 1000 + Put + Cad + His + Tyr + Tryp + Met + Spd + Spm} \times 100$$

On remarque que l'évolution du rapport I.A. (indice d'amines) en fonction de l'I.F. ressemblerait à une prolifération bactérienne de par la forme sigmoïde de l'évolution.

Cette méthode d'analyse par C.L.H.P. **rapide et simple permet de pouvoir apprécier correctement l'altération du poisson par l'intermédiaire d'un nouveau rapport : l'indice d'amines (I.A.).** Ce rapport regroupant amines volatiles et amines biogènes permettra d'établir plus facilement un seuil de putréfaction car il a l'avantage de tenir compte des

différents processus et facteurs majeurs de l'altération du poisson. Les calculs réalisés ne tiennent pas compte de la tryptamine, cette amine n'ayant pas été détectée sur les espèces étudiées, mais d'après les travaux de Yamanaka et coll. (1989) elle peut se révéler intéressante pour d'autres espèces de poisson et plus particulièrement le saumon.

Tableau 74. Évaluation de l'altération par des rapports regroupants toutes les amines détectées ($\bar{x} \pm \sigma$).

t.a.			a.r.			I.A.					
I.F.	Carrelet	Merlan	Hareng	I.F.	Carrelet	Merlan	Hareng	I.F.	Carrelet	Merlan	Hareng
1,6	140 ± 19		171 ± 10	1,6	238 ± 24		323 ± 15	1,6	18,94 ± 0,99		21,20 ± 0,22
1,7			181 ± 11	1,7			351 ± 33	1,7			20,00 ± 1,10
1,7		133 ± 6		1,7		156 ± 7		1,7		20,43 ± 0,30	
1,9		133 ± 6		1,9		165 ± 9		1,9		22,83 ± 0,66	
2			183 ± 6	2			329 ± 12	2			21,33 ± 0,52
2,1			211 ± 24	2,1			409 ± 68	2,1			23,79 ± 1,46
2,2	180 ± 8			2,2	410 ± 17			2,2	24,45 ± 0,25		
2,3	167 ± 6	163 ± 13		2,3	372 ± 9	191 ± 10		2,3	27,41 ± 0,55	29,86 ± 1,78	
2,4	203 ± 25	191 ± 20	191 ± 9	2,4	313 ± 41	215 ± 27	346 ± 9	2,4	27,77 ± 1,62	29,14 ± 2,45	22,84 ± 0,73
2,45	197 ± 15			2,45	595 ± 65			2,45	41,64 ± 0,70		
2,5	181 ± 8	256 ± 2	211 ± 2	2,5	536 ± 10	296 ± 4	368 ± 7	2,5	45,31 ± 0,27	57,37 ± 0,92	23,44 ± 1,38
2,6			202 ± 15	2,6			379 ± 24	2,6			24,12 ± 0,96
2,7				2,7				2,7			
2,8	180 ± 12		173 ± 6	2,8	373 ± 36		333 ± 13	2,8	52,64 ± 0,76		22,25 ± 0,40
2,9		274 ± 12	192 ± 8	2,9		325 ± 11	349 ± 10	2,9		67,36 ± 0,64	26,13 ± 0,70
3	196 ± 8			3	574 ± 14			3	58,82 ± 0,41		
3,2	236 ± 16	377 ± 7		3,2	679 ± 48	461 ± 7		3,2	79,53 ± 0,42	82,13 ± 0,67	
3,4	303 ± 13		291 ± 25	3,4	1409 ± 79		516 ± 22	3,4	85,58 ± 0,55		52,64 ± 2,83
3,6		714 ± 41		3,6		896 ± 48		3,6		92,47 ± 0,45	
3,8		506 ± 12		3,8		683 ± 32		3,8		90,95 ± 0,30	
4	359 ± 23	378 ± 6		4	1092 ± 82	480 ± 11		4	89,98 ± 0,54	85,58 ± 0,43	
4,2			397 ± 4	4,2			639 ± 44	4,2			70,84 ± 0,30
4,4		628 ± 22		4,4		822 ± 29		4,4		93,79 ± 0,36	
4,6			484 ± 22	4,6			864 ± 67	4,6			83,75 ± 1,07
4,8	514 ± 24			4,8	2898 ± 196			4,8	95,55 ± 0,09		
5		1400 ± 44	629 ± 11	5		1935 ± 46	1211 ± 85	5		98,10 ± 0,03	88,66 ± 0,47

t.a. : Indice regroupant toutes les amines ($\text{NH}_4 + \text{put} + \text{cad} + \text{his} + \text{tyr} / \text{met} + \text{spd} + \text{spm}$)

a.r. : Indice regroupant deux types d'amine ($(a.b.) / 100 + (a.v.)$)

I.A. : Indice d'amines (nouvel indice)

moynennes regroupant de 1 à 4 résultats par I.F.

9.3. Recherche d'un seuil et essai de modélisation du rapport I.A.

Les recherches qui viennent d'être menées sur l'établissement d'un nouveau rapport ont été poursuivies sur d'autres espèces, pêchées à différentes saisons et conservées différemment à partir du protocole que nous avons mis au point (p. 140).

Nous avons réalisé des suivis d'altération des lots de :

- rascasses et tacauds pêchés au printemps conservés entiers sous glace à 0°C,
- rascasses pêchées en hiver conservées entières sous glace à 0°C,
- morues pêchées en hiver conservées éviscérées sous glace à 0°C.

On remarque comme pour les autres espèces étudiées des taux variables d'amines suivant les espèces. Nous avons donc étudié l'évolution de ces différents rapports qui tendent, là aussi à une conclusion identique : le rapport I.A. exprime plus fidèlement l'altération (tableau 75 p. 152).

La première remarque qui peut être faite à partir de ces I.A. avant une étude plus complète est, que le rapport I.A. ne semble pas évoluer de la même façon suivant la saison de pêche et la conservation. Il semble donc y avoir une certaine dispersion des résultats. La question est donc de savoir si on peut établir une ou des évolutions du rapport I.A.

L'interprétation des résultats provenant des paramètres de modélisation (tableau 76 p. 153) se fera de la façon suivante :

- comparaison des espèces pêchées en même temps et conservées de la même façon,
- comparaisons pour la même espèce conservée de façon identique mais pêchée à des saisons différentes,
- comparaison entre espèces pêchées à la même saison mais conservée de manières différentes,
- interaction entre les 3 espèces pêchées à des saisons différentes et conservées de manières différentes.

Tableau 75. Évolution du rapport I.A. sur différentes espèces à partir du nouveau protocole

I.F.	Saison de pêche Conservation	Tacaud	Rascasse n°1	Rascasse n°2	Morue
		printemps	printemps	hiver	hiver
		entier	entier	entier	éviscérée
1,5		6,78			11,52
1,6		6,03			10,53
1,7		6,94		8,70	11,13
1,8			11,08	7,54	12,58
1,9				10,76	12,60
2		6,13		14,98	15,13
2,1		8,37	11,65	17,39	
2,2			12,50	13,64	13,21
2,3			12,77	19,44	12,40
2,4		6,75	17,91	37,91	14,60
2,5		8,43	16,38	23,94	
2,6		12,49	13,49	37,49	17,51
2,7		17,48	18,83		13,99
2,8		13,63	19,24		14,52
2,9		15,69	22,10		
3		21,89	26,75	30,92	31,35
3,1		14,30	40,37	43,96	14,41
3,2		38,42	15,30		17,05
3,3		35,15	50,44		14,28
3,4			58,34	41,34	15,80
3,5		20,79	23,69	41,52	18,14
3,6		50,65	31,36		25,56
3,7			66,02		17,18
3,8		54,63		52,73	18,92
3,9		61,18		67,22	
4		87,68	65,80	60,10	17,01
4,1		34,91	64,56	71,29	37,91
4,2			60,49	50,20	30,81
4,3		71,21	74,98		53,54
4,4		51,59			
4,5		72,59	74,06	73,66	42,80
4,6				51,12	
4,7		65,16	89,35	60,76	75,12
4,8		70,36	90,34	78,22	66,50
4,9					
5		77,59	84,30		

moyennes regroupant de 1 à 3 résultats par indice de fraîcheur.

Tableau 76. Estimation a, b, c des différents paramètres des modèles retenus pour l'évaluation de l'I.A. des différentes espèces étudiées en fonction de l'I.F.

Espèce	a	b	c	Σ^2	d.d.l.	Modèle	Seuil théorique
Rascasse n°1	97,8433	161,0691	1,4273	5355,2618	42	logistique	30,33
Rascasse n°2	183,2610	229,6996	0,1527	4165,0823	33	monomoléculaire	37,98
Morue	67050,8723	32954,9415	0,7126	2957,6745	41	logistique	17,25
tacaud	74,7575	956,0667	2,0108	5116,9213	42	logistique	22,69

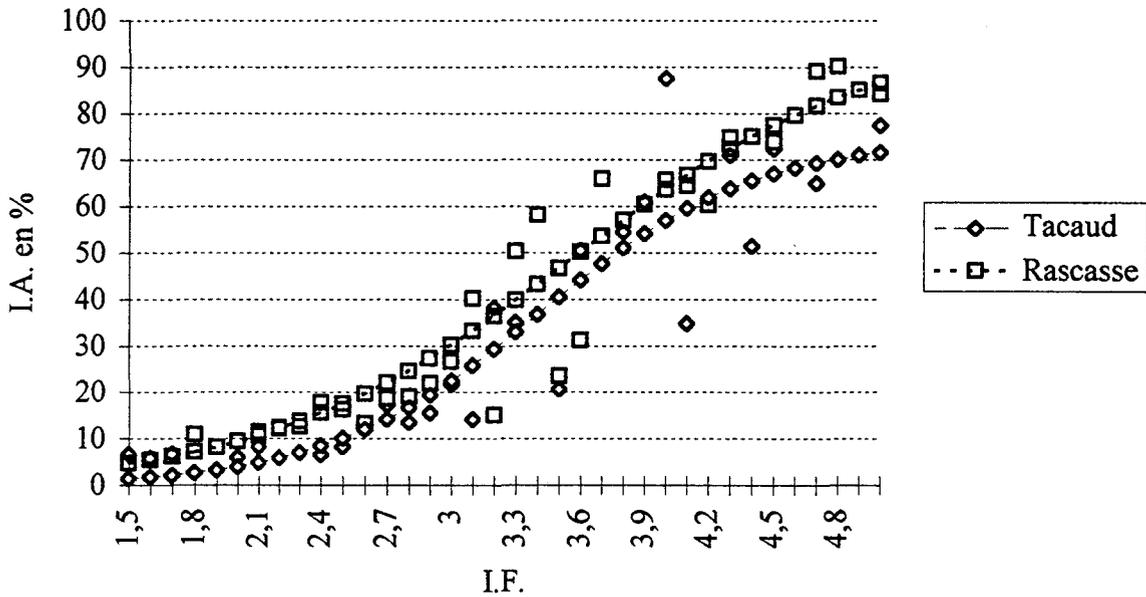
d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle ; Seuil théorique en I.A. (%) ; n°1 : pêche de printemps ; n°2 : pêche d'hiver.

Ce tableau permet de constater que l'évolution de l'I.A. n'est pas la même suivant l'espèce de poisson. D'autre part, les modèles ont des variances résiduelles relativement importantes si on les compare à celles obtenues pour les flores (tableaux 27 p. 90, 31 p. 99, 37 p. 109). Des essais de modélisations des évolutions des taux d'ABVT et P (%) en fonction de l'I.F pour les espèces étudiées (non présentées) ont montré des variances résiduelles du même ordre que ceux des évolutions des I.A. Par conséquent si les variations des taux d'ABVT et de P (%) sont admises on peut également admettre celles du rapport I.A. Ces variances importantes se traduisent par des intervalles de confiance approchés des paramètres contenant 0 et donc des intervalles peu fiables. D'autre part certaines valeurs d'asymptotes (a) sont anormalement élevées (manque de résultats en fin d'altération ou manque de précision des donnés).

Première étude :

Nous avons travaillé à partir des poissons pêchés au printemps : le tacaud et le premier lot de rascasse. A partir de l'observation des modèles de ces deux espèces (tableau 76) on constate que l'on peut les regrouper en un seul modèle commun (figure 16 p. 154) d'équation logistique estimée : $Y = 83,9595 / [1 + 330,0497 \times \exp(-1,6883 \times I.F.)]$ pour $\Sigma^2=12383,9282$ et un d.d.l. = 87 soit un I.A. = 27,22 pour un I.F de 3. Les intervalles de confiance approchés n'ont pas de signification. Il est préférable de ne pas regrouper les modèles : la comparaison du modèle complet et ceux des deux espèces montre une différence significative à 99% (test- $F_{(3,84)} = 5,115$).

Figure 16. Modélisations de l'I.A. de deux espèces de poisson (rascasse et tacaud) pêchées pendant la même saison.

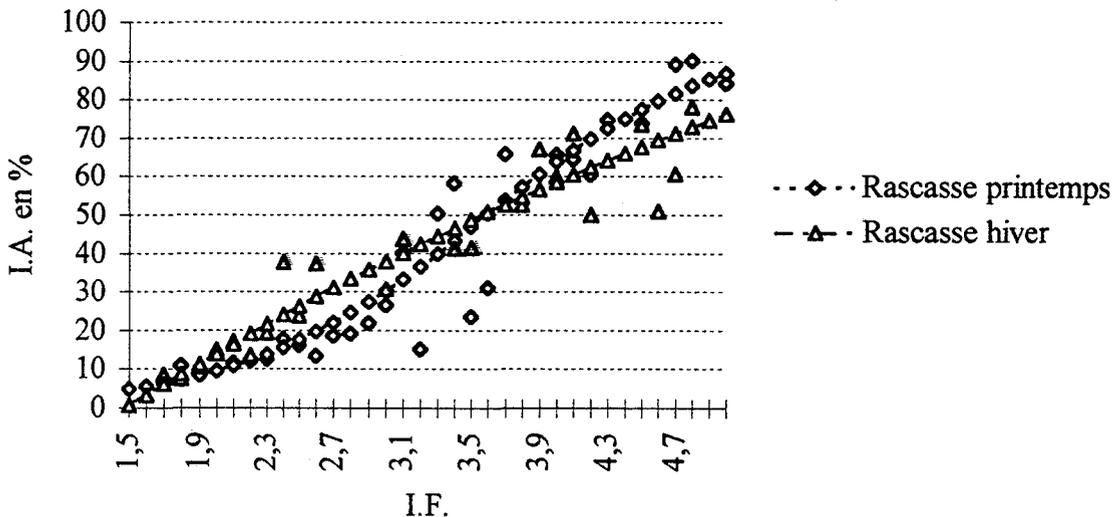


L'évolution de l'I.A. est donc dépendant de l'espèces de poissons pêchées pendant la même saison et conservées de façon identique.

Deuxième étude :

Nous avons comparé les résultats (tableau 76 p. 153) obtenus sur les deux lots de rascasses pêchées à des saisons différentes. Il est impossible de regrouper les résultats, les évolutions de l'I.A. sont différentes (figure 17).

Figure 17. Modélisations de l'I.A. de la rascasse (*Helicolenus dactylopterus*) pêchée à des saisons différentes.

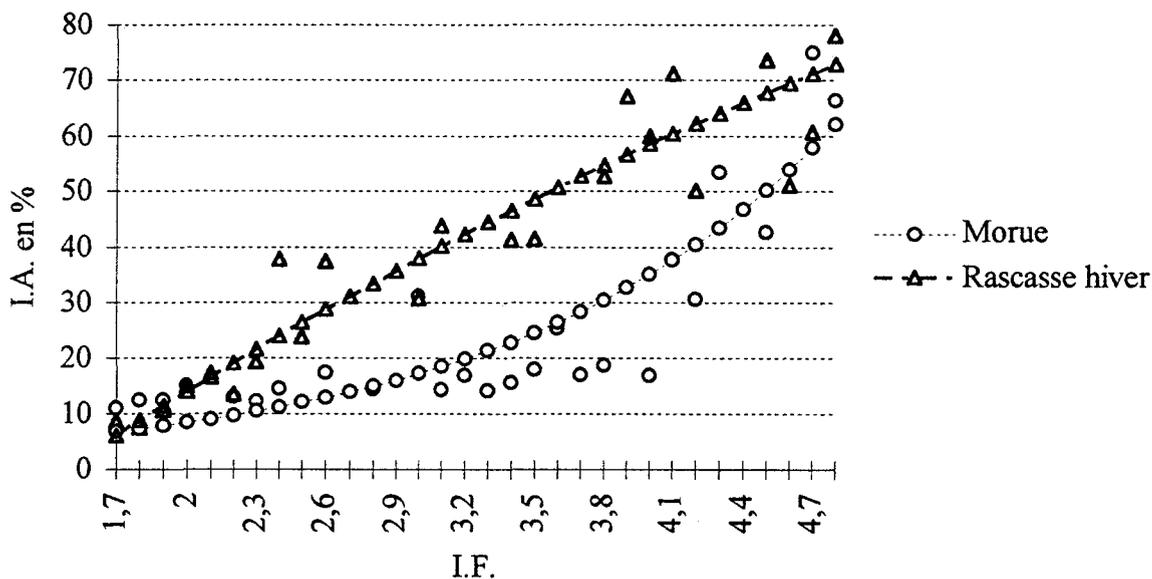


L'évolution de l'I.A. est donc dépendante des saisons, ceci pourrait provenir de la variation de la flore marine suivant les saisons de pêche (chap. I § I. p.35), mais également de la composition du substrat (chap I § II. p. 15).

Troisième étude :

Pour observer l'évolution du rapport I.A. suivant les modes de conservation différents (entier et éviscéré sous glace à 0°C), en fonction des résultats d'un lot de morues éviscérées et du lot de rascasses n°2 entières tous deux pêchés en hiver et conservés sous glace à 0°C. Il n'est pas possible de réaliser un modèle commun, les évolutions de l'I.A. sont différentes pour chaque espèce (figure 18).

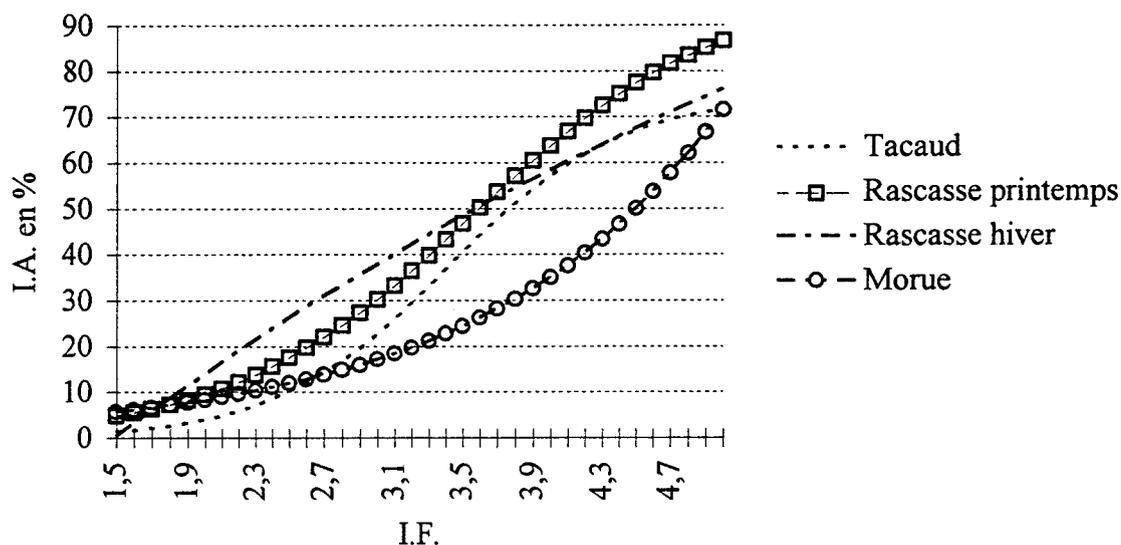
Figure 18. Modélisations de l'I.A. de deux espèces (morue et rascasse) pêchées à la même saison mais conservées dans des conditions différentes.



On ne peut donc pas regrouper l'évolution de l'I.A. d'espèces différentes, conservées dans des conditions différentes mais pêchées pendant la même saison.

Comme nous venons de le montrer, les différents facteurs influencent plus ou moins directement l'évolution de I.A. (figure 19 p. 156). Il apparait que le facteur saison et le facteur mode de conservation influence fortement l'évolution. Ces facteurs interviennent directement sur la qualité microbiologique et la composition biochimique du produit aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

Figure 19. Modélisations de l'I.A. de trois espèces étudiées (morue, tacaud et rascasse) pêchées à des saisons différentes (printemps et hiver) et conservées dans des conditions différentes (entières et éviscérées).



Les modèles estimés pour les espèces, saisons et conservations étudiés ne permettent pas d'établir un seuil commun de fraîcheur :

- un poisson frais aurait un I.A. inférieur à 10 % quelles que soient l'espèce, la saison et le mode de conservation

- un poisson conservé entier en voie d'altération a un I.A. compris entre 23 % et 38 % et s'il est inconsommable il dépasse ce seuil de 38 %.

- un poisson inconsommable conservé éviscéré possède un I.A. supérieur à 18 %.

Mais actuellement les modèle estimés offrent de trop grandes variances pour généraliser les seuils. D'autre part, nous ne pouvons pas affirmer actuellement la signification d'un I.A. compris entre 23 et 38 %. Suivant l'espèce, la saison de pêche des conclusions opposées peuvent être réalisées dans cet intervalle, il faut donc être prudent sur l'interprétation des résultats.

Malgré ces inconvénients, le rapport I.A. a l'avantage de pouvoir être aussi bien utilisé sur des poissons gras (hareng), maigre (merlan) et des poissons plats (carrelet). Nous avons réalisé d'autres essais ponctuels sur de la raie (Sélaciens), des poissons fumés (hareng et saumon), des poissons mis en conserve (hareng) et nous n'avons rencontré aucun problème d'analyse.

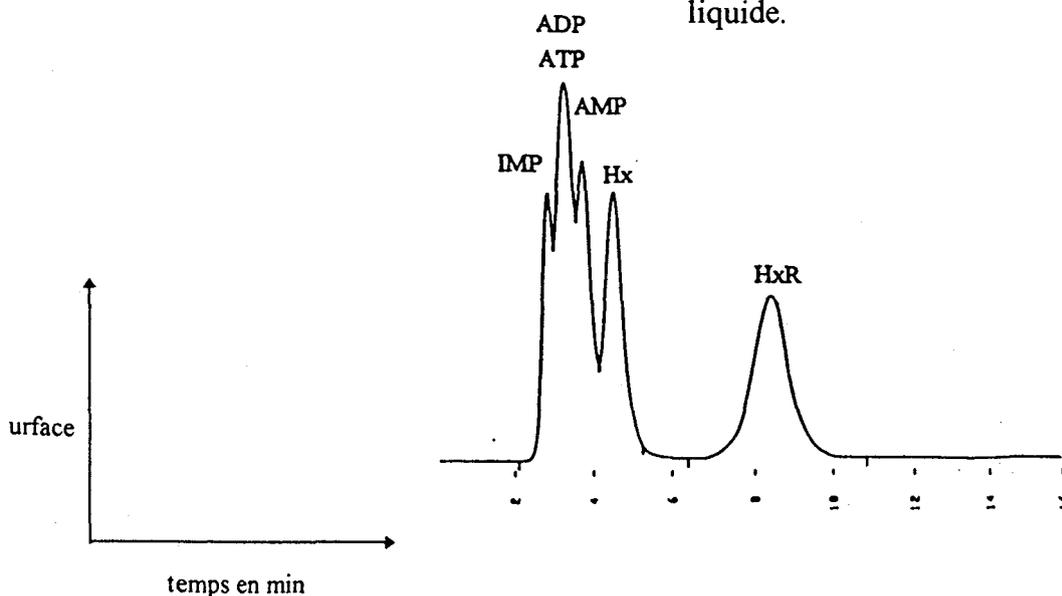
La figure 19 (p. 156) nous apporte également un renseignement beaucoup plus fondamental sur l'évolution de l'I.A : à part pour la rascasse pêchée en hiver les autres modèles ont une phase de latence. Cette phase de latence peut être estimée pour le tacaud à un I.F. de 2,4 soit 3 à 4 jours de conservation, pour la rascasse pêchée au printemps à un I.F. de 2,1 à 2,2 soit 2 à 3 jours de conservation et pour la morue le modèle est trop imprécis pour être déterminé mais on peut l'estimer à un I.F. supérieur à 3 et donc entre 6 et 8 jours de conservation (dans nos conditions expérimentales). L'apparition des amines n'est donc pas instantanée mais comme pour l'A.B.R. dépend du type de flore présente. Il apparaît donc qu'une éviscération permet d'éliminer une source d'altération importante : la flore bactérienne et les enzymes "digestives" capables de produire des amines se trouvent en quantités réduites. Ces observations peuvent être corrélées avec la phase de latence (2 à 3 jours) de la cinétique de la flore protéolytique de poissons entiers conservés dans les mêmes conditions (Liston, 1980). Cette flore est capable de libérer des acides aminés précurseurs d'amines.

II. Mise au point d'une méthode de dosage des dérivés de dégradation de l'ATP

Nous cherchons à mettre au point une méthode d'analyse des dérivés de dégradation de l'ATP sur la même chaîne de chromatographie liquide utilisée pour le dosage des amines biogènes. Le but étant de pouvoir réaliser successivement les deux types d'analyses.

Les premiers essais réalisés avec le protocole et le gradient présentés dans le chapitre II (p. 63) sur des solutions d'ATP, d'ADP, d'AMP, d'IMP, d'HxR et d'Hx nous donnent les temps de rétention présentés dans la figure 20.

Figure 20. Chromatogramme des dérivés nucléotidiques détectés par chromatographie liquide.



Le chromatogramme révèle d'une part, que la méthode permet de détecter l'ATP (3,26 min.), l'ADP (même temps que l'ATP), l'AMP (3,74 min.), l'IMP (2,85 min.), l'inosine ou HxR (4,54 min.) et l'hypoxanthine ou Hx (8,40 min.) et d'autre part, que le gradient est inadapté. Les temps de rétention sont trop proches pour pouvoir séparer correctement l'ensemble des pics (on n'en observe d'ailleurs que quatre). Il nous faut donc un gradient d'élution adapté.

1. Recherche d'un nouveau gradient d'élution

Différents solvants ont été successivement utilisés pour optimiser la séparation des pics des différents dérivés nucléotidiques :

- le solvant n°1 = 0,06 M de K_2HPO_4 + 0,04 M de KH_2PO_4 ,
- le solvant n°2 = solvant n°1 + 0,5 % de méthanol,
- le solvant n°3 = solvant n°1 + 5 % éthanol,
- le solvant n°4 = solvant n°1 + 1 % d'acétone,
- le solvant n°5 = solvant n°1 + 0,5 % d'acétonitrile,
- le solvant n°6 = solvant n°1 + 5 % d'acétonitrile.

Le tableau 77. regroupe ces différentes étapes.

Tableau 77. Temps (min) de rétention des dérivés nucléotidiques à partir des différents solvants utilisés.

N° solvant	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	Hx
1	6,9	7,5	9,2	4,8	40,8	10,5
2	4,6	4,6	5	3,4	22,3	6
3	2,6	2,6	2,6	2,6	4,2	3,3
4	2,8	3,2	3,6	2,4	9	4,3
5	5,4	5,5	6,7	3,9	25	8
6	2,7	2,7	2,7	2,7	4,2	3,2

En diminuant la concentration en méthanol du solvant d'élution de départ, on s'aperçoit (solvant n°2) que les pics ont tendance à être de plus en plus évasés en fonction de cette diminution. La séparation ne s'est pas améliorée sauf pour l'hypoxanthine (22,3 min.). Ce gradient ne sera donc pas retenu.

Des essais réalisés à partir du tampon phosphate de potassium (solvant n°1) montrent que les pics sont bien séparés mais le dernier temps de rétention (pic d'inosine) se situe à plus de 40 min avec un léger évaseement, ce qui est gênant pour une analyse rapide et précise. De plus les temps de rétention ne sont pas reproductibles. Pour ces raisons, ce gradient ne sera pas retenu.

Nous avons voulu réduire le temps de rétention du pic d'inosine. Pour cela, nous avons utilisé le solvant n°3. Il permet une séparation encore moins bonne. Ceci s'explique par la viscosité de l'éthanol ($1,5 \text{ m Ns/m}^2$) qui est supérieure à celle du méthanol ($0,59 \text{ m Ns/m}^2$) et de ce fait, l'éthanol possède un coefficient de séparation plus faible que celui du méthanol.

Nous avons donc recherché un solvant possédant une viscosité plus faible que celle du méthanol pour séparer les pics. Deux solvants s'avèrent intéressants : l'acétone ($0,32 \text{ m Ns/m}^2$) et l'acétonitrile ($0,38 \text{ m Ns/m}^2$).

Des essais ont été réalisés avec le tampon phosphate de potassium contenant 0,5 à 1 % d'acétone. En utilisant l'acétone, les pics se chevauchent toujours. (une plus forte concentration d'acétone ne peut être utilisée : les pics ont les mêmes temps de rétention).

D'autres essais ont été réalisés avec le tampon phosphate de potassium contenant 0,5 à 5% d'acétonitrile. Les résultats montrent des temps de rétentions similaires à ceux obtenus avec le méthanol. On remarque également un évaseement important aux faibles concentrations d'acétonitrile ne permettant pas une très bonne séparation, de plus aux fortes concentrations les pics sortent trop rapidement pour être séparés.

Nous avons donc testé différents gradients d'éluion binaires et non linéaires (tampon phosphate de potassium et acétonitrile).

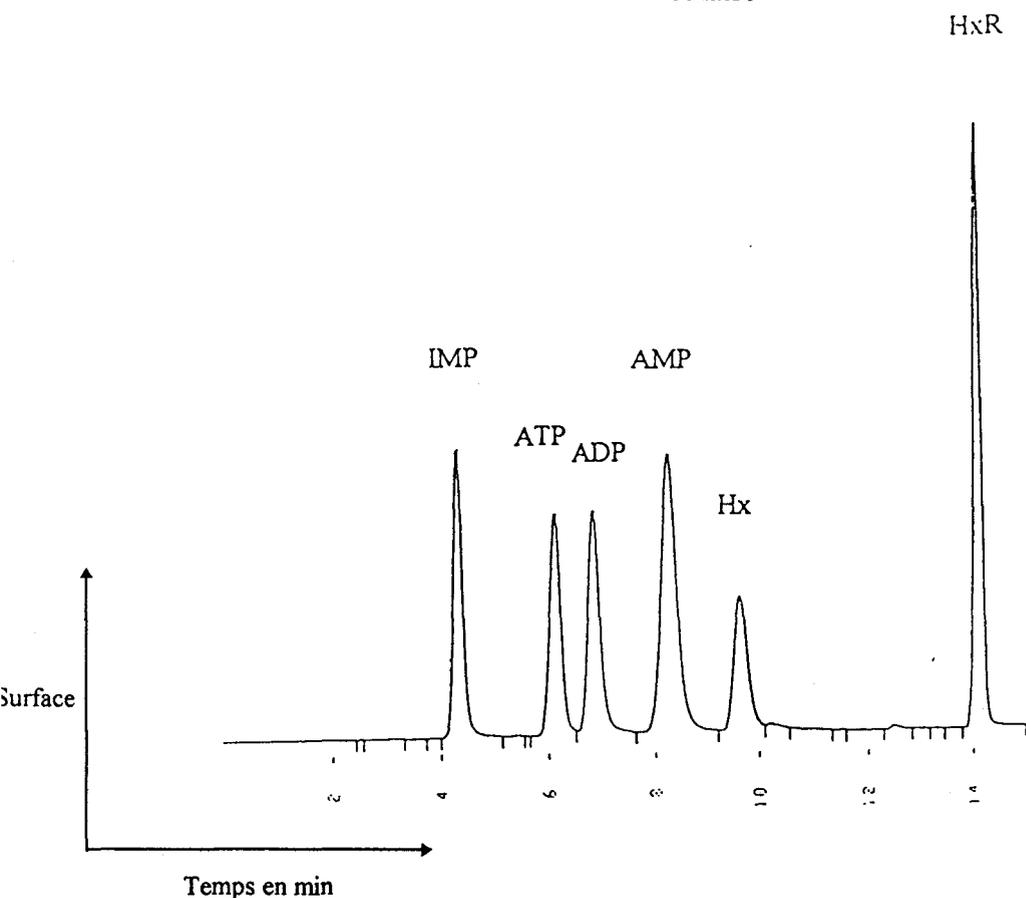
L'étude nous a amenée à choisir un nouveau mélange d'acétonitrile et de tampon phosphate ($0,06 \text{ M de K}_2\text{HPO}_4 + 0,04 \text{ M de KH}_2\text{PO}_4$). présenté dans le tableau 78 (p. 160).

Tableau 78. Étapes du gradient d'élution pour la séparation des dérivés nucléotidiques

Temps (min)	Acétonitrile (%)	Tampon phosphate (%)
0	0	100
4	2	98
5	3	97
8	4	96
15	4	96
15,01	0	100

Ce gradient binaire permet une séparation complète des pics en 14 min. (figure 21) et une régénération de la colonne en 20 min.

Figure 21. Chromatogramme des dérivés nucléotidiques séparés par un nouveau gradient binaire



Il faut 2 h pour conditionner la colonne avec le tampon phosphate de potassium avant de doser les dérivés nucléotidiques. Si on veut doser les amines biogènes sur la même colonne à la suite du dosage des dérivés nucléotidiques il faut 1 h pour régénérer la colonne avec 60 % d'acétonitrile et 40 % d'eau. Ceci ne pose aucun problème si le système d'injection est programmable et automatique.

2. Récupération des dérivés de l'ATP sur du poisson

Avec la méthode (chap. II § 1. p. 62) et le nouveau gradient nous avons réalisé des tests de récupération sur des filets de lieu noir broyés et placés à 37°C pendant 2 jours. Cela nous permet de suivre une altération rapide du poisson afin de déterminer les problèmes rencontrés pour l'analyse.

Nous n'avons rencontré aucun problème analytique particulier, par contre, la méthodologie peut être simplifiée.

En effet, les résultats du tableau 79 révèlent que l'analyse des nucléotides est facilement réalisable.

Tableau 79. Récupération des nucléotides sur de la chair de lieu noir (les valeurs sont exprimées en surface d'intégrations).

Taux d'ABVT	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	Hx
12,6	114537	137439	146401	20795	5227155	1528715
15,5	165189	152753	158314	18723	4352956	2758420
36,5	130049	169637	121346	17049	110219	5888146
53,3	86992	222919	87542	9477	129456	5793731

Nous pouvons constater la présence d'ATP, ADP et AMP même si le poisson est altéré. Ces nucléotides auraient dû disparaître très rapidement (Saito et coll., 1959 ; Soudan et coll., 1965 ; Mulchandani et coll., 1990) au profit de l'IMP lorsque le poisson est frais et lorsque le poisson s'altère au profit de l'HxR et/ou Hx (Greene et Barnett-Byrne, 1990; Luong et coll., 1992; Lee et coll., 1992).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les taux d'ATP, d'ADP et d'AMP :

- la méthode d'extraction détruit une partie des cellules bactériennes ce qui entraîne une libération de ces nucléotides ; en raison de la concentration de l'acide et de l'utilisation de l'ultraturax,

- il y aurait des pics de co-élution parasites lors de l'analyse du poisson,

- ce n'est pas de l'ATP, ADP et AMP mais d'autres molécules qui ont le même comportement.

Suite à ces observations et à quelques constatations sur la méthodologie, nous avons simplifié la méthode d'analyse sans en modifier profondément les étapes :

- le broyage est réalisé à froid pour éviter tout échauffement (dénaturation éventuelle qui n'a jamais été montrée),

- la centrifugation est plus forte et dure moins longtemps ; l'acide perchlorique 0,6 N dénature fortement les protéines qui précipitent facilement, les résultats sont identiques entre une centrifugation à 1.250g pendant 15 min et 2.500 g pendant 5 min),

- la solution de KOH est amenée à 5 M pour diminuer la quantité à ajouter,

- pour gagner du temps on peut remplacer la filtration sur papier Whatman par une décantation à froid. En effet, l'acide perchlorique précipite très facilement et on peut prélever, après la phase de décantation, les quelques millilitres nécessaires à l'analyse sans prélever des cristaux d'acides (aucune perte n'a été démontrée lors de l'utilisation du papier Whatman).

Ces modifications n'affectent pas les résultats mais ramènent l'extraction des dérivés nucléotidiques à 15 minutes ce qui, comparé aux dernières méthodes développées dans ce domaine, est rapide. Les techniques récentes de détection des dérivés nucléotidiques par C.L.H.P. (Ohashi et coll., 1991 ; Williams et coll., 1991; Fischer, 1995) sont longues et fastidieuses quant aux techniques enzymatiques (Luong et coll., 1992 ; Mulchandani et coll., 1990 ; Lee et coll., 1992) elles sont encore plus longues et ne permettent de réaliser qu'une quarantaine d'analyses par colonne.

Le protocole retenu est le suivant :

10 g de chair homogénéisée + 20 ml d'acide perchlorique 0,6 N



Broyer à l'ultraturrax à 20.000 t/min (-20°C) et centrifuger à 2.500 g pendant 5 min à 2°C



Prélever 10 ml de surnageant et ramener le pH entre 6,5-6,8 (KOH 5 M)



Laisser décanter 5 min à 2°C



Filtrer sur 0,2 µm avant analyse par C.L.H.P.

Cette méthodologie, comme les autres méthodes proposées dans la bibliographie, ne nous permet pas d'évaluer les pertes occasionnées par les manipulations. Pour évaluer les pertes nous avons deux possibilités : soit utiliser une technique dite d'ajout (ajouter différentes concentrations de nucléotides à la solution de poisson à doser), soit l'utilisation d'un étalon interne (ajout d'un produit permettant de suivre le comportement des produits analysés qui subissent les manipulations).

Il est évident que pour une analyse rapide, la technique d'ajout entraîne forcément plusieurs analyses alors que la technique de l'étalon interne permet de ne réaliser qu'une seule analyse. Nous avons donc recherché un étalon interne pour les dérivés nucléotidiques (comme pour l'analyse des amines).

3. Recherche d'un étalon interne

Les premiers essais ont été réalisés à partir de dérivés nucléotidiques rares (marqués) : le 2 chloropyrimidine, le 8 bromoguanosine, le 2 amino-5 bromo-6 méthyl-4 pyrimidinol, le 4 chloro-2 méthylthio-5 pyrimidinecarboxylique éthyl ester.

Ces composés possèdent des temps de rétention beaucoup trop importants (supérieurs à 20 min), ce qui pourrait être en partie imputé à leur masse moléculaire importante.

L'idéal serait de trouver un étalon se situant entre le pic d'inosine et d'hypoxanthine.

Nous avons testé des groupements benzènes, naphthalène, indol en raison de leur absorbance à 254 nm et de leur masse moléculaire plus faible (de 136,1 à 268,2) : l'acide indol-2 carboxylique, le fluorène, le L-tryptophane, le p diméthyl-amino-azobenzène, l' α naphthol, le β indol-acétonitrile.

Il n'y a que le β indol-acétonitrile qui apparaît entre l'inosine et l'hypoxanthine mais le pic est évasé. Pour les autres composés ils ne sont pas détectés (probablement précipités avec l'acide perchlorique) ou sortent de manière très diffuse (trop hydrophobe). L'étalon interne doit également supporter la phase d'ajustement de pH et être plus hydrophile.

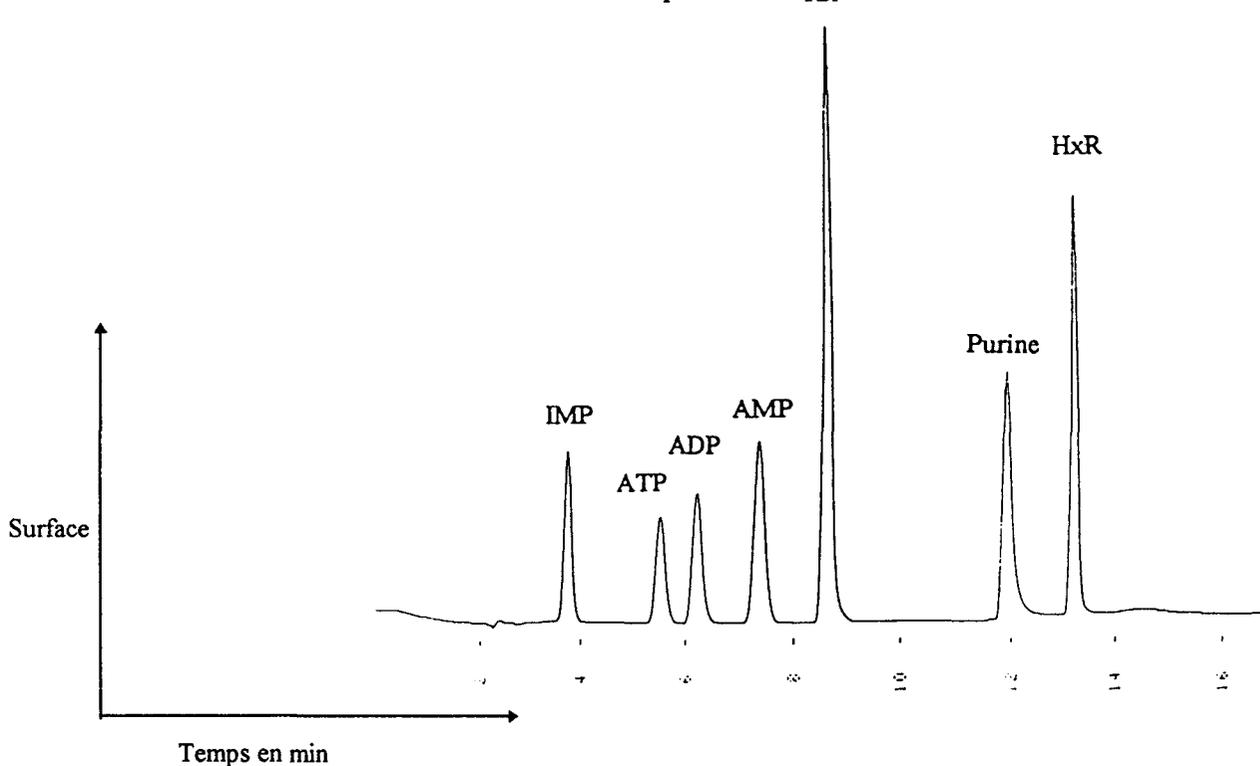
Le chlorure de dansyl est intéressant mais il réagit avec les acides aminés et amines : on ne peut donc pas l'utiliser.

Ces différents composés du deuxième test n'ont rien à voir avec des nucléotides. Se comportent-ils de la même façon que les nucléotides vis à vis de l'extraction et de l'analyse ?

Nous nous sommes donc penchés sur des nucléotides hydrophiles, nous avons testé : la purine, la pyrimidine, le 4,5 diamino 2,6 dihydroxy pyrimidine, le 5'déoxy-5'méthylthio adénosine, le 2' déoxy-5 (trifluorométhyl)-uridine, le 3 isobutyl 1 méthyl xanthine, le 5' tosyladénosine, le 2'3' isopropylidène adénosine, le N₂ isobutyryl 2' déoxyguanosine, le 5 déoxyadénosine, le 2,6 dichloropurine.

Il s'est avéré que la purine sort entre les pics d'inosine et d'hypoxanthine à 11,94 min. sans poser de problème (figure 22).

Figure 22. Chromatogramme des dérivés nucléotidiques détectés par chromatographie liquide.



100 µl d'une solution de purine à 100 mg/ 100 ml d'eau distillée conservée à 5°C doit être ajoutée aux 10 g de chair avant broyage dans l'acide.

La purine permet donc d'évaluer le comportement des dérivés nucléotidiques durant les manipulations et par conséquent le calcul des pertes :

$$\text{Perte} = [\text{Surface théorique}/\text{Surface observée}]$$

Nous avons établi les droites de régression (tableau 80) des différents nucléotides pour ainsi évaluer les quantités de ces dérivés détectés par cette technique dans la chair de poisson.

Tableau 80. Estimation a et b des paramètre respectifs des droites de régression ($Y = \alpha X + \beta$) des différents dérivés nucléotitiques étudiés.

	$a \times 10^{-4}$	$b \times 10^{-3}$	ddl	$s^2 \times 10^{-4}$	seuil (ppm)	Temps de rétention (min)
IMP	3,3426	- 2,8112	25	7,840	0,33	3,79
ATP	6,1855	- 8,1600	25	8,122	0,61	5,54
ADP	3,2010	+ 4,8345	25	7,618	0,32	6,27
AMP	2,2979	- 3,9987	25	7,728	0,23	7,43
Hx	88,1968	+ 10,7928	25	13,5424	0,10	8,64
HxR	1,6937	- 3,8153	25	7,129	0,17	13,28

a : coefficient directeur, b : ordonnée à l'origine, Y : ppm, X : surface du pic corrigé, ddl : degré de liberté, s^2 : variance résiduelle.

4. Recherche d'un rapport

L'évaluation de l'altération par les dérivés de l'ATP a été déterminée pour la première fois par Saito et coll. en 1959 par le rapport K,

$$K = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx}$$

simplifié successivement par Jones et Murray (1964),

$$K' = \frac{HxR + Hx}{IMP + HxR + Hx}$$

et par Luong et coll., 1992,

$$H = \frac{Hx}{IMP + HxR + Hx}$$

4.1. Essais préalables

Nous avons déterminé le nombre minimum d'échantillons et de mesures à réaliser pour avoir un résultat fiable. En utilisant la même technique d'analyse présentée au paragraphe 7 (p.141), nous avons déterminé qu'il ne faut réaliser qu'un échantillon et deux mesures.

Puis, nous avons réalisé un suivi de l'altération de la chair homogénéisée, récupérée sur plusieurs merlans (pour cette raison l'I.F. n'est pas évalué) et conservée à 2°C pendant plusieurs jours afin de pouvoir réaliser un suivi régulier de l'altération.

Sur chaque échantillon de chair, nous avons réalisé le dosage de l'ABVT, de la TMA, de l'I.A. et des différents nucléotides (tableau 81).

Tableau 81. Évolution de l'altération de la chair de merlan conservée à 2°C.

Jours	ABVT	TMA	P	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR	Hx	I.A.
0	15,12	0,5	3,31	0	425,23	0	10332,63	1760,88	467,9	9,51
1	16,72	1,17	7,00	4,94	215,02	1,6	5477,48	2125,54	299,84	10,27
2	17,3	1,76	10,17	20,16	219,72	8,51	4493,16	3110,88	426,68	16,09
3	23,19	6,55	28,24	0	352,32	1,66	2599,51	3469,66	540,07	29,59
4	31,08	14,11	45,40	71,96	122,58	17,02	2885,54	3006,48	770,67	59,41
5	42,17	19,91	47,21	38,25	154,89	11,95	259,76	3338,08	1086,58	80,5
6	58,88	36,29	61,63	0	486,27	0	58,44	3317,16	2337,14	92,68
7	92,4	57,96	62,73	21,9	304,73	0	10,62	675,8	3117,86	98,31
8	91,9	56,28	61,24	5,22	449,07	3,49	21,99	1494,88	3585,34	98,88
9	121,38	54,43	44,84	0	485,34	2,6	6,43	236,11	3783,28	98,90

ABVT et TMA en mg/100 g de chair, P et I.A. en %, ATP, ADP, AMP, IMP, HxR et Hx en ppm.

Comme nous pouvons le constater, la chair de merlan, dans ces conditions de conservation n'est plus consommable au bout de 4 jours (ABVT, P et I.A. supérieurs aux seuils).

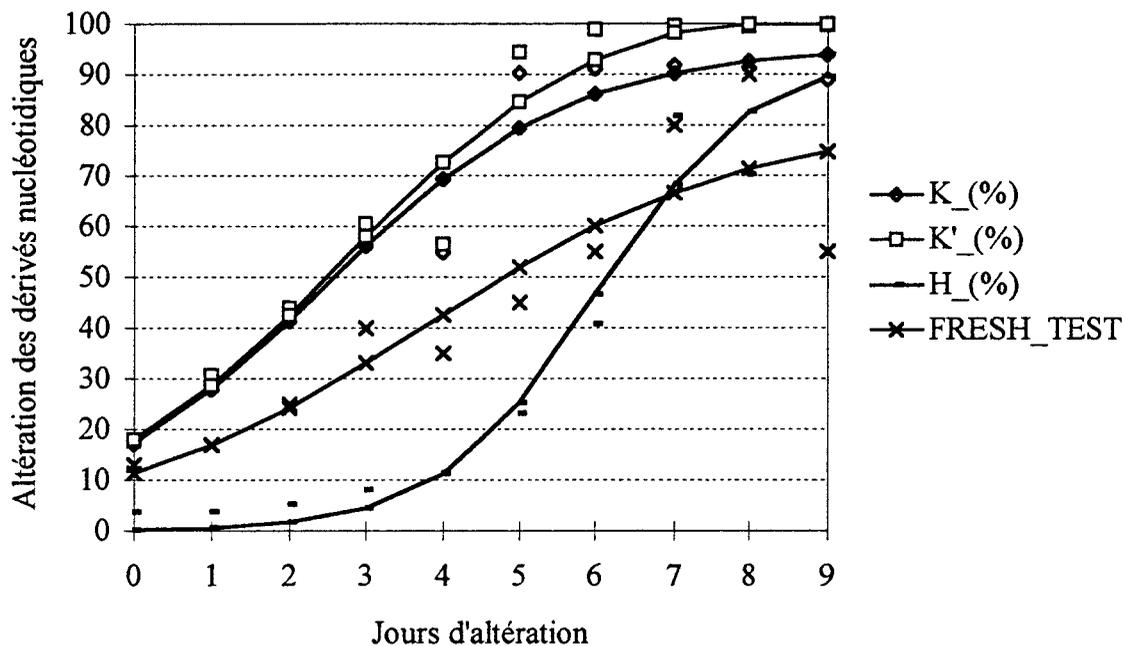
On observe comme pour le lieu noir la présence d'ATP, d'ADP et d'AMP. Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer la présence de ces nucléotides. Par contre, on observe la disparition de l'IMP au profit dans un premier temps de l'inosine (jusqu'à 3 à 5 jours) puis la diminution de l'inosine au profit de l'hypoxanthine.

Le suivi de l'IMP et/ou celui de l'hypoxanthine peut s'avérer intéressant pour évaluer l'altération des poissons si cela se confirmait sur d'autres espèces.

Nous avons calculé les différents rapports K, K' et H (figure 23 p. 167) et nous les avons comparés au seul test existant sur le marché le fresh-tester permettant l'évaluation de l'altération suivant le rapport K.

On constate que l'évolution du rapport K par analyse par C.L.H.P. est plus régulière et sensible que le Fresh-tester. Ces trois rapports peuvent être utilisés pour l'évaluation de l'altération d'un poisson, mais ne connaissant pas l'origine de l'ATP, ADP et AMP nous ne prendrons en considération que le rapport H.

Figure 23. Modélisations des différents rapports suivant l'altération de la chair de merlan conservée à 2°C.



L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que la technique par C.L.H.P. est plus fiable que le Fresh tester. D'autre part, on remarque que seul le rapport H permet d'estimer une phase de latence estimable à 4 jours de conservation. On peut donc supposer que la dégradation de l'ATP, ADP et AMP est principalement le fait d'une autolyse et que la dégradation de l'IMP proviendrait plus d'une dégradation bactérienne au même titre que l'A.B.R. et le rapport I.A.

4.2. Essais de généralisation

Nous avons, sur des lots de rascasses et de morues (pêchés en hiver et conservés respectivement entières et éviscérées sous glace à 0°C) évalué d'une part les quantités de nucléotides récupérées et d'autre part les rapports (H, K et K'). Les résultats simplifiés sont présentés dans le tableau 82. (p. 168).

On constate que la diminution de l'IMP n'est pas généralisable à l'ensemble des espèces. L'augmentation de l'hypoxanthine est évidente pour la morue mais l'est beaucoup moins pour la rascasse. Le rapport H n'apporte pas plus d'information. Il en est de même pour les rapports K et K'. Nous avons réalisé le Fresh-test mais il donne aussi bien pour les

poissons frais que très altérés des rapports K supérieurs à 90%, il n'est donc pas utilisable sur ces espèces.

Tableau 82. Évolution de l'altération de la chair de différents lots de morues et de rascasses par l'IMP, Hx et H.

I.F.	Rascasse			Morue		
	IMP	Hx	H	IMP	Hx	H
1,7	5,33	1015,44	99,08	50,70	181,48	8,05
1,8	3,64	1010,46	99,51	14,77	313,27	13,10
1,9	2,05	776,81	99,34	389,62	293,25	12,84
2	2,65	761,51	99,41	9,34	199,94	7,59
2,1	1,49	782,12	99,49			
2,2	1,96	634,76	99,44	20,21	182,45	7,66
2,3	1,38	687,61	99,55	593,59	220,95	10,58
2,4	1,18	677,68	99,55	300,78	281,19	12,26
2,5	1,31	838,18	99,61			
2,6	1,12	610,04	99,53	7,74	256,18	20,27
2,7				663,89	170,17	6,10
2,8				66,86	228,30	10,79
2,9						
3	3,15	1064,05	99,57	2,88	294,91	18,96
3,1	0,94	984,47	99,77	3,58	348,17	22,12
3,2				38,62	286,56	14,33
3,3	1,43	982,17	99,74	11,78	272,29	17,96
3,4	1,87	971,81	99,64	41,59	530,84	17,42
3,5				25,37	571,91	21,12
3,6				25,81	728,24	22,82
3,7	0,93	911,00	99,70	27,42	609,15	19,18
3,8	0,77	930,95	99,66	22,40	714,74	20,37
3,9	0,99	785,82	99,65			
4	3,06	1294,83	99,34	35,96	566,69	17,64
4,1	5,03	1384,21	99,54	30,25	761,54	26,23
4,2				28,67	542,31	17,23
4,3				56,16	961,32	32,17
4,4						
4,5	4,07	1316,44	99,65	40,28	768,50	27,87
4,6	4,26	1095,22	99,49			
4,7	3,66	1325,02	99,69	11,70	1382,88	53,71
4,8	4,76	1184,28	99,56	13,55	1416,29	51,50
4,9						
5						

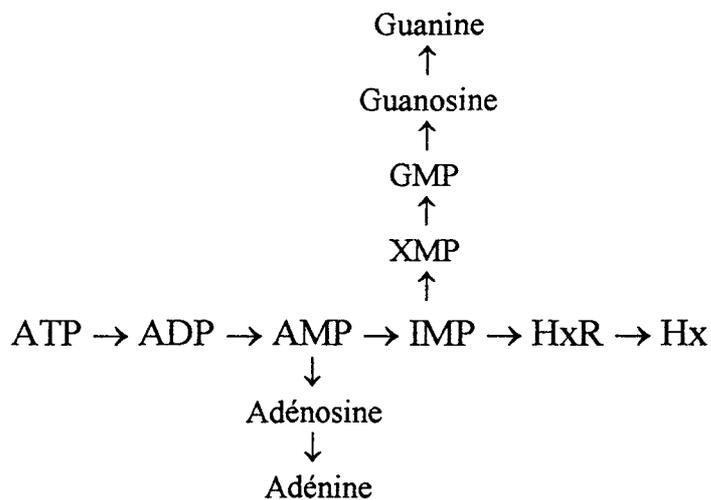
IMP et Hx en ppm H en %

Il apparaît que l'étude des ces dérivés nucléotidiques semble spécifique à certaines espèces. En effet, les deux espèces étudiées ne se comportent pas comme le merlan précédemment étudié (§ 4.1. p. 165). Nous avons également testé un autre lot de rascasses un lot de tacauds qui ont également montré un manque de relation dans les évolutions. D'autres essais ponctuels ont été réalisés sur le saumon et n'ont pas posé de problèmes.

Toutefois, sur les chromatogrammes il apparaît des pics non identifiés au voisinage de l'AMP et l'Hx qui pourraient peut être devenir des marqueurs intéressants.

Des recherches devront se poursuivre pour les identifier (probablement d'autres dérivés nucléotidiques) et d'autre part pour définir un nouveau rapport permettant une étude sur différentes espèces, saisons de pêche et modes de conservation. La possibilité d'analyser d'autres dérivés nucléotidiques est concevable par C.L.H.P. (Fischer, 1995).

Pour notre part, nous allons nous intéresser à d'autres voies de dégradation de l'ATP présentées dans le schéma suivant :



XMP : Xanthosine 5' monophosphate ; GMP guanosine 5' monophosphate.

Nous ne négligerons pas les bases pyrimidiques (cytosine, uracile, thymine) mais elles sont naturellement présentes à plus faible concentration dans le poisson (chap. I § e p. 21).

III. Mise au point d'une technique de dosage du formol

1. Mise au point de la méthode pour le formol

A partir du protocole proposé (Chap. II § 1. p. 64), nous avons réalisé des essais sur des solutions de formol et du poisson.

Si le dosage des solutions de formol s'effectue sans problème (à condition d'éviter l'exposition des solutions à la lumière), il n'en est pas de même quand on s'intéresse aux extractions à partir de la chair de poisson.

Nous avons essayé de doser le formol sur des poissons frais (ABVT < 20) et altérés (ABVT > 30) comme la morue, le hareng et la raie

On remarque dans ces conditions que les protéines réagissent avec le réactif de Hantzsch et qu'il faut obligatoirement éliminer le précipité formé. Après avoir essayé différentes techniques il est apparu qu'il était nécessaire de centrifuger le milieu à 2.000 g pendant 1 min puis de filtrer les surnageants sur des filtres à seuil de coupure de 0,45 μm .

Les solutions limpides sont lues au spectrophotomètre (tableau 83).

Une centrifugation beaucoup plus importante (> 5000 g) permettrait probablement de réduire la durée des manipulations.

Tableau 83. Essais de dosage du formol ($\mu\text{g/g}$ de chair) sur 3 espèces de poisson.

Taux de formol (ppm)	hareng	morue	raie
frais	1,37	1,11	1,24
altéré	3,70	4,2	2,89

On constate une augmentation du taux de formol, mais l'augmentation est-elle suffisamment significative pour être exploitable ?

Nous avons réalisé le même type d'essais avec de la langoustine, des noix de coquille St Jacques et des crevettes. Les résultats ont été similaires à ceux des trois espèces de poisson testées.

2. Mise au point de la méthode pour les groupements aminés

2.1. Vérification de la réaction d'imination

A partir de différentes solutions d'acides aminés et d'amines biogènes nous avons ajouté différentes solutions de formol (Chap. II § 1. p. 65) puis réalisé un dosage de la perte de formol (par rapport à des solutions témoin de formol dans de l'eau). Ces pertes correspondent au formol réagissant avec les acides aminés ou les amines en solutions (tableau 84).

Tableau 84. Évaluation de l'imination du formol sur des acides aminés et amines

Acides aminés	NH ₂ libre	Perte moyenne %	Amines	NH ₂ libre	Perte moyenne %
L histidine	1	9,65	Tyramine	1	23,04
L lysine	2	9,91	Histamine	1	20,51
Arginine	2	18,95	Putrescine	2	27,80
Tryptophane	1	18,00	Cadavérine	2	25,18
Glutamine	1	35,59	Spermine	2	21,28
			Spermidine	2	12,78
			Méthylamine	1	16,21

Le temps réactionnel a été étudié (entre 0 et 90 min) : il s'est avéré que la réaction était quasiment instantanée.

Le tableau 84 nous montre que la réaction d'imination n'est pas uniforme entre acides aminés et amines, sans que la différence soit imputable au nombre de groupement -NH₂.

Ces résultats démontrent que la réaction d'imination se réalise très facilement. Des travaux de Lescure et Geruy (1990) ont montré exactement la même réaction sur l'aspartate, le glutamate, la leucine, la glutamine, l'ammoniac et l'arginine. Owusu-Ansah et Hultin (1987) montrent que le formol produit par la réduction de l'OTMA en DMA est à l'origine de la perte d'hydrosolubilité et/ou d'extractabilité des protéines myofibrillaires et de polypeptides.

2.2. Réaction d'imination sur le poisson

Nous avons dû réaliser, comme pour le dosage du formol sur le poisson, une centrifugation et une filtration pour pouvoir évaluer les pertes de formol attribuées à l'imination du formol aux groupements -NH₂.

Des essais d'évaluation de l'imination du formol ont donc été réalisés sur les mêmes espèces qui ont servi pour le dosage du formol (tableau 85).

Tableau 85. Dosage des groupements aminés libres (en %) par évaluation de l'imination du formol sur 3 espèces de poisson.

	hareng	morue	raie
frais	65	75	55
altéré	12	8	11

On constate une diminution des pertes relatives à une diminution des groupements -NH₂ libres probablement réagissant avec le formol produit. La diminution est-elle suffisamment significative pour être exploitable?

3. Évaluation du taux de formol et des groupements NH₂ libres

Nous avons, à partir de deux lots de poisson (rascasses entières et morues éviscérées conservées à 0°C sous glace fondante pendant plusieurs jours. Ces lots ont été utilisés pour les dosages d'amines et des nucléotides), réalisé un suivi de la production de formol et d'évaluation des groupements aminés libres. Les résultats moyens par jour sont présentés dans le tableau 86 p. 173.

La production de formol n'évolue pas régulièrement en fonction de l'altération (repérable par l'I.F. et P %) et de l'espèce étudiée : pour la rascasse l'augmentation du taux de formol n'apparaît que dans les stades avancés de l'altération et pour ces mêmes taux, la morue serait encore consommable. Un fort taux de formol (> 4 µg/g) ne permet de constater qu'un état de putréfaction.

Le formol qui est produit par la dégradation de l'OTMA, de la TMA ou de la DMA, doit réagir avec les groupements -NH₂ libres avant de pouvoir être dosé. Cette réaction dépendant de la dégradation de l'OTMA et de la TMA mais également de la dégradation des protéines, des acides aminés et de la production d'amines.

L'évaluation des groupements -NH₂ restants libres après expérimentation que nous allons appeler G.A.L. (groupements aminés libres), s'avère beaucoup plus intéressante : l'évolution n'est pas régulière mais elle évolue rapidement en début d'altération. Les poissons frais ont des taux de perte supérieurs à 30 % et les poissons inconsommables ont un taux de

perte inférieure à 20 %. Le G.A.L. dépend comme la production de formol de la dégradation de l'OTMA, des protéines, des acides aminés et de la production d'amines.

Tableau 86. Altération d'un lot de morues et de rascasses en fonction du dosage de formol et des groupements NH₂ libres.

I.F.	Rascasse			Morue		
	P en %	NH ₂ libre	Taux de formol	P en %	NH ₂ libre	Taux de formol
1,5				1,50	44,95	0,00
1,6				3,44	52,83	0,92
1,7	13,94	36,89	0,58	5,41	44,86	0,41
1,8	11,30	29,24	0,31	6,48	42,96	0,31
1,9	6,25	29,70	0,35	6,25	41,61	0,85
2	7,04	34,29	0,41	6,86	36,65	0,57
2,1	9,36	30,99	0,53			
2,2	13,69	30,58	0,70	10,47	29,47	0,51
2,3	25,30	30,63	0,55	12,50	17,33	2,33
2,4	25,99	44,49	0,50	19,69	24,56	0,49
2,5	25,21	34,01	0,71			
2,6	29,13	21,87	0,83	15,16	18,72	3,81
2,7				16,18	16,64	3,51
2,8				12,59	27,71	1,03
2,9						
3	44,85	12,05	0,33	34,32	12,23	4,85
3,1	58,33	14,83	0,62	33,15	29,47	2,13
3,2				39,33	9,18	3,42
3,3				29,00	21,22	2,11
3,4	63,06	18,07	0,65	30,34	14,97	3,74
3,5	53,83	16,68	0,50	38,86	5,47	4,70
3,6				48,91	2,69	4,63
3,7				30,75	3,24	4,19
3,8	61,12	14,50	0,88	32,64	4,08	4,39
3,9	68,49	16,10	0,84			
4	66,94	20,30	1,50	39,87	21,22	2,17
4,1	58,81	17,24	1,01	56,86	10,60	2,89
4,2	66,41	18,91	0,78	55,83	5,28	3,02
4,3				63,20	11,17	4,05
4,4						
4,5	64,53	16,03	1,04	58,57	4,15	4,63
4,6	49,56	9,18	1,43			
4,7	52,07	11,12	1,79	70,45	5,93	3,40
4,8	72,39	14,27	2,43	68,88	4,22	2,72
4,9	80,88	10,66	2,65			
5						

NH₂ libre : groupements aminés libres (G.A.L.) en % ; Taux de formol en µg/g de chair. moyennes regroupant de 1 à 4 résultats par I.F.

4. Recherche d'un seuil d'altération et essai de modélisation du G.A.L.

A partir de ces lots de poissons nous avons estimé les modèles les plus adaptés à l'évolution des G.A.L. (tableau 87) en fonction de l'indice de fraîcheur.

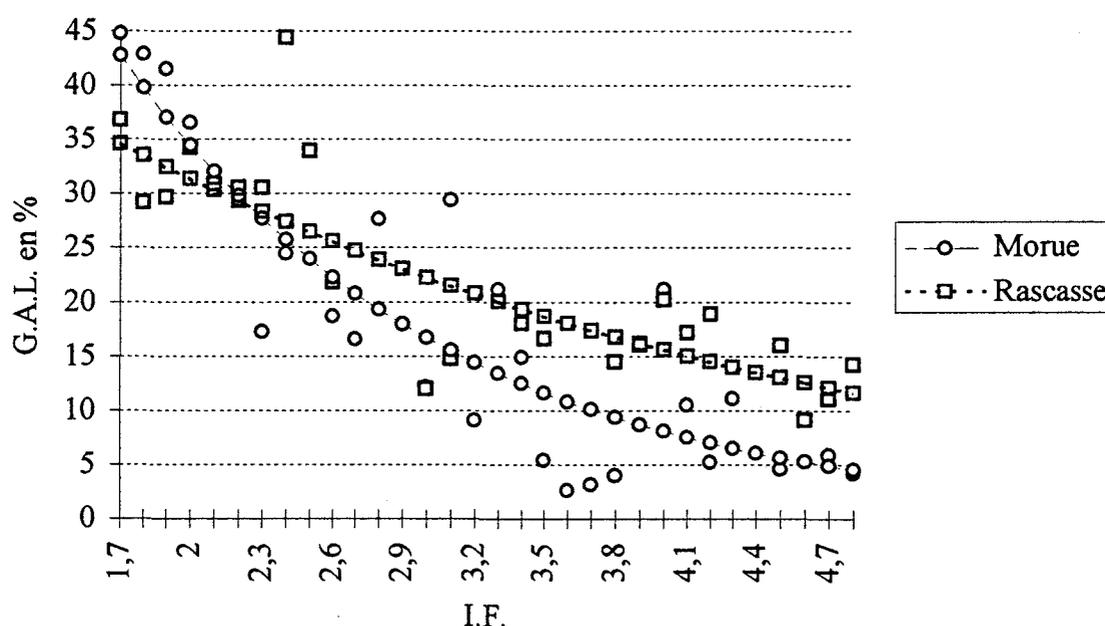
Tableau 87. Estimation a, b, c des différents paramètres des modèles retenus pour l'évaluation du G.A.L. des différentes espèces étudiées en fonction de l'I.F.

Espèce	a	b	c	Σ^2	d.d.l.	Modèle	Seuil théorique
Rascasse	230,1656	2,9156	-0,3876	1042,3359	33	logistique	22,29
Morue	63394,1460	432,7396	-0,7233	2776,3540	41	logistique	16,72
Complet	101472,4332	983,3586	-0,5571	4584,9182	77	logistique	19,40

d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle ; Seuil théorique en G.A.L. (%).

On constate des variances résiduelles importantes qui traduisent une dispersion des résultats (tableau 86 p. 173) mais ces variances sont du même ordre que celles des I.A. (§ 9.3 p. 151). Il est donc préférable de ne pas tenir compte des intervalles de confiance. Le modèle retenu étant identique entre les deux espèces pêchées on a réalisé un modèle commun. Mais il est préférable de travailler avec un modèle pour chaque espèce car la comparaison avec le modèle complet montre une différence significative à 99 % (test- $F_{(3,74)} = 4,9494$).

Figure 23. Modélisations du G.A.L. pour la rascasse et la morue en fonction de l'I.F..



Il faut être prudent sur l'interprétation des modèles. En effet, ces modèles ne peuvent être généralisés de plus ils comportent des variations importantes dans l'estimation des paramètres, nous ne pouvons donc que constater :

- un poisson consommable a un taux de G.A.L. supérieur à 25 %,
- un poisson inconsommable a un taux de G.A.L. inférieur à 10 %.

On ne peut rien établir de façon fiable pour un taux de 10 % à 25 % en G.A.L., il faudra pour cela analyser d'autres espèces, d'autres modes de conservation et différentes saisons de pêche (comme pour le rapport I.A.).

5. Corrélation entre le G.A.L. et l'I.A.

Le G.A.L. correspond, nous l'avons déjà dit, aux groupements NH_2 libres donc à la présence d'amines biogènes, d'acides aminés et de protéines non "dégradés" ou non iminés par le formol produit. Le rapport I.A. correspond à la production d'amines donc à la dégradation des acides aminés et protéines. Nous avons donc comparé l'évolution des G.A.L. et les rapports I.A. pour la rascasse (figure 24) et pour la morue (figure 25 p. 176).

Figure 24. Comparaison des modèles d'évolution du G.A.L. et de l'I.A. chez la rascasse.

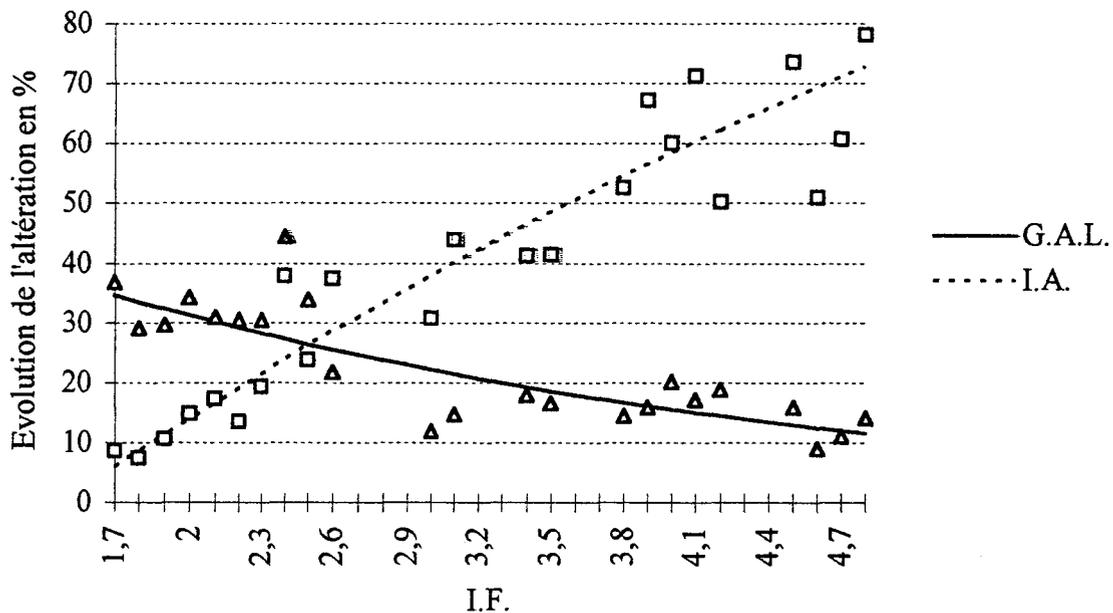
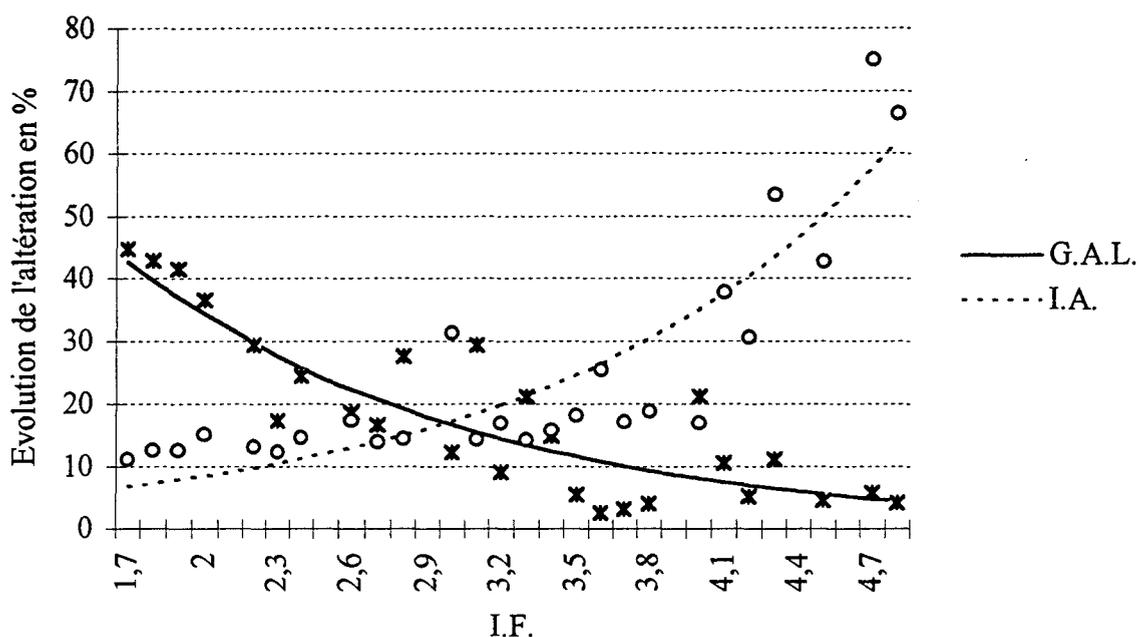


Figure 25. Comparaison des modèles d'évolution du G.A.L. et de l'I.A. chez la morue.



Ces deux figures (24 et 25.) nous montrent que la dégradation des composés aminés ne correspond pas simultanément et exactement à une production d'amines. Ce résultat est logique, car d'une part, les dosages sont de natures différentes et par conséquent on ne dose pas les mêmes produits (on ne dose également que les amines qui n'ont pas réagi avec le formol) et d'autre part les bactéries peuvent utiliser les composés aminés à leurs profits et donc altérer ces composés aminés.

On constate également que les courbes se coupent au moment où les lots de poisson vont devenir inconsommables : à l'I.F. proche de 3 pour la morue et proche de 2,5 pour la rascasse. Cette dernière remarque ne va pas à l'encontre des conclusions concernant les taux de G.A.L. (§ 3. p. 172) et les I.A. (§ 9.3. p. 151).

Ces remarques nous mènent à conclure pour les deux espèces : qu'un poisson serait consommable si le G.A.L. est supérieur à I.A. et le poisson serait inconsommable si le taux de perte du formol est inférieur à l'I.A.

6. Mise au point d'un nouveau rapport

A la suite des remarques précédentes nous avons réalisé pour les deux espèces étudiées (rascasse et morue) le rapport I.G.L. (indice de groupements libres) :

$$\text{I.G.L.} = \frac{\text{G.A.L.}}{\text{I.A.}} \times 10$$

Le facteur 10 est utilisé uniquement pour une meilleure visualisation du rapport I.G.L.

Nous avons donc essayé de modéliser ce rapport en fonction de l'indice de fraîcheur pour les deux espèces étudiées (tableau 88).

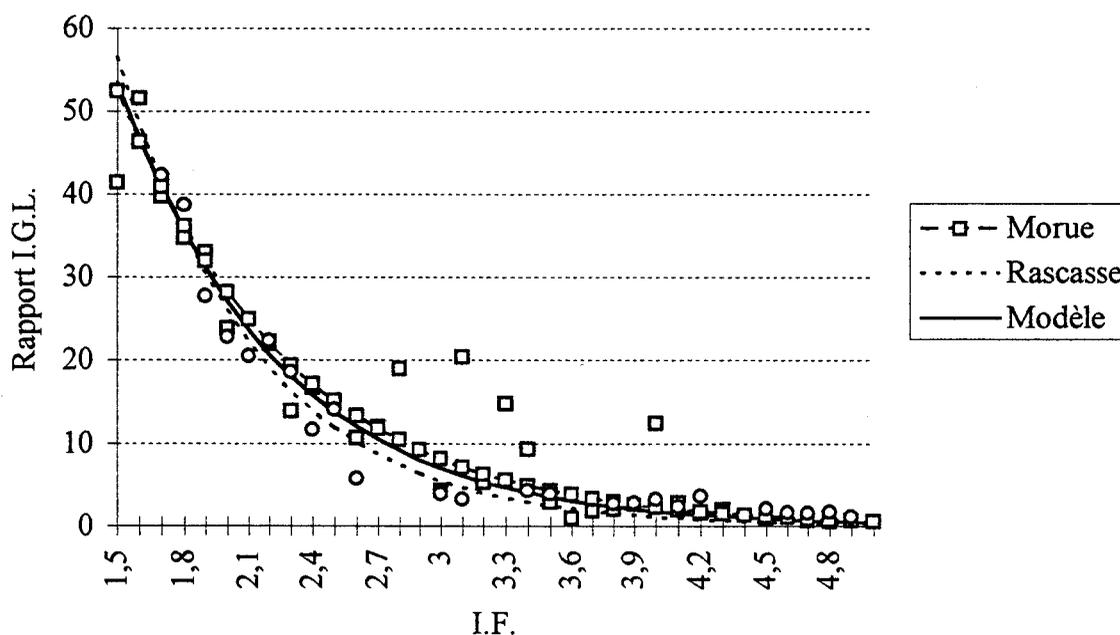
Tableau 88. Estimation a, b des différents paramètres du modèle exponentiel théorique $Y = \alpha \times \exp(\beta \times \text{I.F.})$ retenu pour l'évaluation du rapport I.G.L. des différentes espèces étudiées.

Espèce	a	b	Σ^2	d.d.l.	Seuil théorique
Rascasse	580,5177	-1,5506	571,3656	34	5,54
Morue	337,4886	-1,2398	1801,4767	42	8,18
Complet	410,0369	-1,3580	2436,3188	78	6,97
borne sup.	569,8061	-1,1486			18,16
borne inf.	250,2677	-1,5673			2,27

d.d.l. : degré de liberté ; Σ^2 : somme des carrés résiduelle ; Seuil théorique en I.G.L. ; borne sup. et borne inf. : intervalle de confiance approché à 95 %.

On constate que les variations résiduelles des modèles sont légèrement plus faibles que ceux des autres modèles réalisés pour les dosages chimiques. Mais il faut rester prudent sur l'interprétation des intervalles de confiance. Le modèle retenu pour les deux espèces étant le même nous avons réalisé le modèle commun au deux espèces. Ce modèle commun comparé à ceux de chaque espèce (test-F $(2,76) = 1,0165$) ne montre pas de différence significative à 95 %. Il est donc préférable de ne réaliser qu'un seul modèle (figure 26) pour ces deux espèces pêchées en même temps mais conservées différemment.

Figure 26. Modélisations des rapports I.G.L. chez la rascasse et la morue.



La représentation des trois modèles nous montre qu'ils sont très proches, alors que les modèles complets estimés de l'évolution de I.A. (figure 19 p. 156) et du G.A.L. (figure 23 p.174) ne peuvent être réalisés pour ces deux espèces. De plus ces deux espèces conservées dans ces conditions ont toujours donné les résultats les plus variables jusqu'à l'utilisation de ce nouveau rapport.

Le modèle commun de l'évolution de l'I.G.L. permet de considérer qu'un poisson **consommable a un I.G.L. supérieur à 18** car comme on peut le constater, des variations existent (figure 26 p. 177). Ce seuil ne peut pas être généralisé, il faut réaliser une étude plus complète (espèces, saisons de pêche, modes de conservations).

D'un point de vue purement biochimique l'évaluation de ce nouveau rapport a deux intérêts majeurs malgré quelques incertitudes :

- il prend en considération le catabolisme des composés aminés (protéines et acides aminés),
- il prend en considération la réaction d'imination des composés aminés avec le formol provenant de la dégradation de l'OTMA, de la TMA ou de la DMA

Afin de mieux comprendre l'importance des problèmes de dégradation, nous avons calculé les corrélations (tableau 89) qui peuvent exister entre la dégradation de la chair de poisson et deux types de flore bactérienne étudiée sur ces espèces.

Tableau 89. Corrélations entre les flores totales et H₂S dénombrées sur PCA-H₂S 1,5 % et l'A.B.R., la production de formol, l'I.A. le G.A.L. et l'I.G.L. chez la rascasse et la morue pêchées à la même saison et conservées dans des conditions différentes.

	A.B.R.	Taux de formol	G.A.L.	I.A.	I.G.L.
Rascasse n=36					
Flore totale	0,7733	0,6112	-0,7075	0,7704	-0,8221
Flore H ₂ S	0,7951	0,6445	-0,7330	0,7545	-0,8320
Morue n=45					
Flore totale	0,8866	0,6955	-0,7404	0,6564	-0,7089
Flore H ₂ S	0,8585	0,7148	-0,7659	0,6410	-0,7328

A.B.R. : activité bactérienne de réduction de l'OTMA ; G.A.L. : groupements aminés libres ; I.A. : indice d'amines ; I.G.L. indice des groupements libres.

Les degrés de corrélation sont tous significatifs à 99,9%, ce qui signifie que la flore bactérienne intervient bien dans la production de formol, d'amines, de TMA et la disparition de composés aminés. Mais la comparaison entre les différents coefficients de corrélation est plus intéressante :

- La flore H₂S a quelle que soit l'espèce le plus de corrélation avec la production de formol, le G.A.L. et l'I.G.L. Ceci est logique, nous avons démontré (§ 4. p.110) que la flore H₂S est majoritairement constituée de *Shewanella putrefaciens* qui est connue pour ces capacités à réduire l'OTMA (Ringo et coll., 1984 ; Stenberg et coll., 1984).

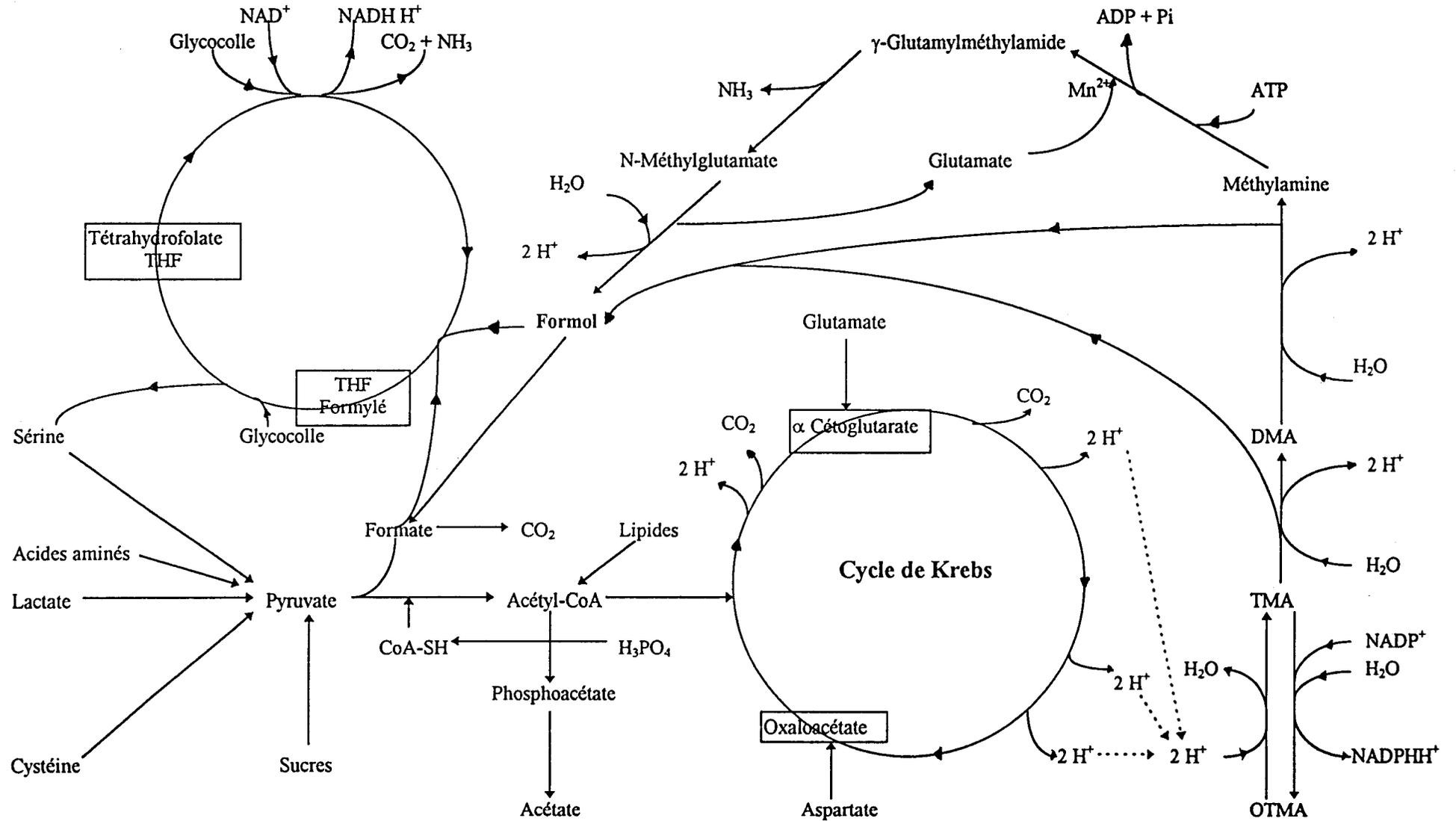
- La flore totale a quelle que soit l'espèce le plus de corrélation avec la production d'amines. L'étude bibliographique (Chap. I § 2.1. p. 30) nous a montré qu'un grand nombre de bactéries est capable de dégrader les acides aminés.

- L'A.B.R. montre des corrélations plus importantes avec la flore H₂S pour la rascasse et avec la flore totale pour la morue. Il en résulte que suivant la flore et son dénombrement, l'activité de réduction de l'OTMA est variable et donc les différents dosages de formol ou des groupements aminés libres en sont plus ou moins affectés.

IV. Voie de dégradation de l'OTMA

La réduction de l'OTMA (présentée chapitre I § 2. p. 45) en TMA, DMA et la production de formol peu se résumer sous la forme d'un schéma général (figure 27) illustré page 180.

Figure 27. Dégradation de l'OTMA



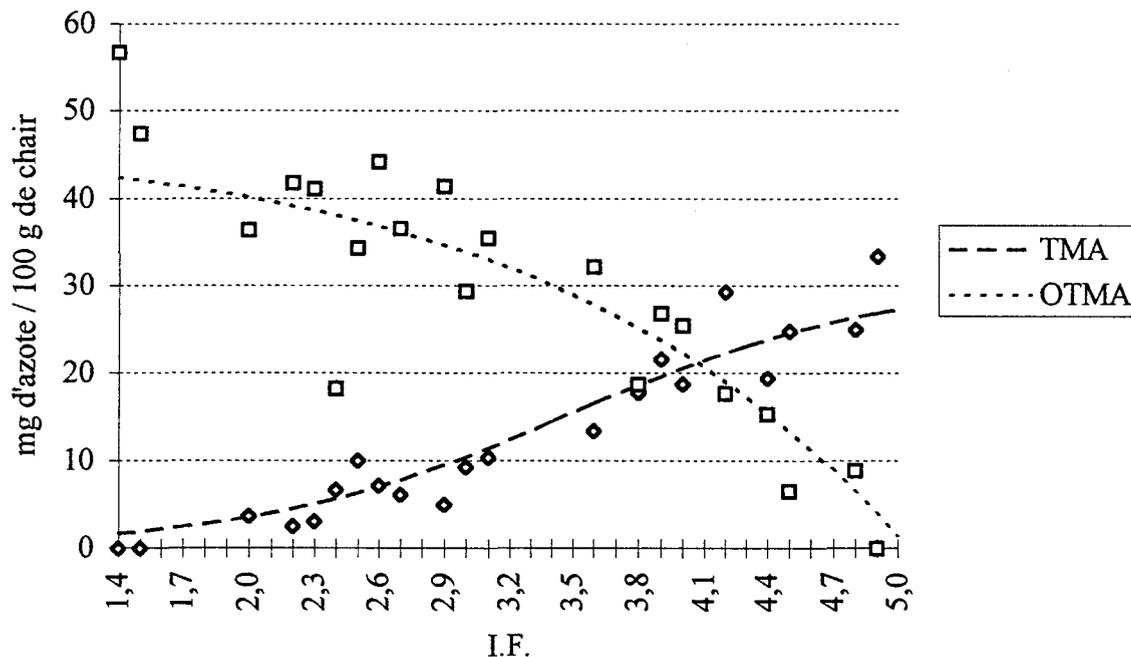
Il apparaît clairement dans cette voie que le formol est un noeud important dans la dégradation et nous l'avons vu il peut influencer directement les caractéristiques organoleptiques du poisson.

Nous avons observé sur du merlan, tacaud, rascasse, hareng, carrelet, morue, une légère accumulation de méthylamine qui montre la dégradation de la TMA et de la DMA suivi d'une diminution importante révélatrice de la dégradation de méthylamine.

Des évolutions similaires ont été observées pour la DMA (Beatty et Collins, 1939 ; Soudan et coll., 1965 ; Tate et Alexander, 1976 ; Ritchie et Mackie., 1980 ; Sainclivier, 1983). Ceci signifie que l'on a bien une flore méthyloprote chez le poisson, qui peut être aussi bien la flore totale que la flore H₂S.

Nous avons également remarqué que la disparition de l'OTMA ne correspond pas à une production simultanée de TMA chez le tacaud (figure 28).

Figure 28. Modélisations de la production de TMA et de la réduction d'OTMA chez le tacaud



Les équations estimées pour la disparition de l'OTMA et la formation de TMA sont respectivement (Σ^2 = somme des carrés résiduelle : d.d.l. = degré de liberté) :

$$Y = 47,7195 - 2,2468 \times \text{Exp}(0,6054 \times \text{I.F.}) \quad \Sigma^2 = 2414,3748 \text{ avec un d.d.l.} = 38$$

$$Y = 47,7195 / [1 + 117,4515 \times \text{Exp}(-1,3658 \times \text{I.F.})] \quad \Sigma^2 = 701,8737 \text{ avec un d.d.l.} = 38$$

1. Etude de la voie de dégradation de l'OTMA

A partir du protocole précisé dans le chapitre II (§ VI. p. 66) une étude des différentes étapes de cette voie de dégradation est réalisée.

La mise en évidence de la production de TMA, de méthylamine et de formol à partir d'OTMA en anaérobiose est présentée tableaux 90 et 91 (p. 183-185).

Nous avons utilisé trois souches bactériennes aérobies strictes avec un métabolisme oxydatif : *Shewanella putrefaciens*, *Alteromonas communis*, *Pseudomonas fluorescens*, et une souche aérobie anaérobie facultative à métabolisme fermentatif : *Proteus mirabilis*. Ces souches ont été choisies pour démontrer que des bactéries aérobies ou anaérobies étaient susceptibles de se développer grâce à l'OTMA.

Les résultats obtenus apportent plusieurs types d'informations :

- sur les souches bactériennes et leurs caractéristiques ; elles sont toutes capables d'utiliser la voie de dégradation de l'OTMA,
- sur la production de formol, de TMA et de méthylamine à partir des différents ajouts,
- sur l'utilisation du formol, de la TMA et de la méthylamine ajoutée (indiquée dans les tableaux 90 et 91 en grisé) ; ces pertes ont été évaluées en fonction de tubes témoins non ensemencés.

La TMA est dosée par la méthode de Conway (Chap. II. § 2. p. 59), la méthylamine par C.L.H.P., le formol par le réactif de Hantzsch. Le développement bactérien est estimé à 600 nm. par spectrophotométrie (aucun ensemencement n'est réalisé pour évaluer le développement).

Tableau 90. Développement de *Shewanella putrefaciens* et *Pseudomonas fluorescens* sur un milieu minimum différemment supplémenté (incubation 24 h.)

n = 4 N° tube	Composition	<i>Shewanella putrefaciens</i>				<i>Pseudomonas fluorescens</i>			
		Absorption	F	TMA	Mét	Absorption	F	TMA	Mét
1	témoin	0,065	0	0	0	0,680	0	0	0
2	OTMA	0,043	0,82	tr	0,04	0,596	0,72	tr	0,04
3	TMA	0,025	-0,57	-41,49	0	0,636	-0,36	-23,49	0
4	DMA	0,040	0,28	24,90	0	0,680	0,25	28,50	0,01
5	Méthylamine	0,045	0,64	6,91	-4,32	0,600	-0,07	8,85	-5,24
6	Nitrate	0,026	-0,34	0	0	0,618	-0,49	0	0
7	Glutamate	0,058	-0,13	0	0	0,604	-0,36	0	0
8	Glycocolle	0,052	0,21	2,76	0	0,601	-0,06	0	0
9	Formol	0,015	-3,69	0	0	0,050	-5,43	0	0
10	OTMA+TMA	0,047	0,72	-40,10	0,01	0,573	3,69	-16,58	0,06
11	OTMA+DMA	0,045	-0,06	26,20	0,02	0,510	3,47	33,20	0,18
12	OTMA+Méthylamine	0,031	0,45	16,60	-4,69	0,562	1,24	13,84	-4,35
13	OTMA+Nitrate	0,081	2,21	0	0	0,647	1,09	1,38	0,02
14	OTMA+Glutamate	0,029	-0,22	0	0,06	0,683	1,62	1,38	0,05
15	OTMA+glycocolle	0,037	-0,04	5,53	0,04	0,352	1,26	1,38	0,06
16	OTMA+Formol	0,035	-3,43	0	0,01	0,030	-5,61	1,38	0,02
17	Glutamate+TMA	0,031	-0,66	-40,10	0	0,575	-0,33	-38,71	0
18	Glutamate+DMA	0,050	-0,15	26,20	0	0,635	0,15	23,51	0
19	Glutamate+Méthylamine	0,028	-0,61	17,10	-4,83	0,699	0,42	6,92	-7,02
20	Glycine+Formol	0,014	-5,96	0	0	0,013	-6,96	5,53	0
21	OTMA+TMA+Glu	0,034	-0,18	-42,90	0,03	0,500	2,27	-25,43	0,04
22	OTMA+DMA+Glu	0,047	-0,36	26,28	0,02	0,553	1,23	20,75	0,11
23	OTMA+Mét+Glu	0,028	-0,30	15,21	-5,27	0,538	4,41	10,24	-5,96
24	OTMA+Formol+Glyco.	0,010	-4,59	0	0,08	0,026	-6,72	tr	0,16

Absorption : absorbance à 600 nm ; F : formol en µg/ml; TMA en mg d'azote pour 100 ml de culture; Mét : méthylamine en ppm

Tableau 91. Développement de *Proteus mirabilis* et *Alteromonas communis* sur un milieu minimum différemment supplémenté (incubation 24 h.)

n = 4		<i>Proteus mirabilis</i>				<i>Alteromonas communis</i>			
N° tube	Composition	Absorption	F	TMA	Mét	Absorption	F	TMA	Mét
1	Témoin	0,267	0	0	0	0,065	0	0	0
2	OTMA	0,264	0,28	tr	0	0,038	0,48	tr	0,05
3	TMA	0,300	0	-33,20	0	0,035	0,69	-34,57	0
4	DMA	0,287	0,01	24,90	0	0,029	0,52	24,90	0,01
5	Méthylamine	0,274	0,04	11,04	-0,77	0,041	0,15	12,45	-4,78
6	Nitrate	0,313	-0,52	0	0	0,040	0,36	0	0
7	Glutamate	0,284	-0,31	0	0	0,050	0,15	0	0
8	Glycocolle	0,290	1,26	11,04	0	0,039	0,63	0	0
9	Formol	0,049	-1,68	0	0	0,010	-8,51	0	0
10	OTMA+TMA	0,372	-0,30	-25,74	0	0,122	-0,10	-37,33	0,04
11	OTMA+DMA	0,500	-1,56	33,50	0,02	0,059	-0,75	21,31	0,09
12	OTMA+Méthylamine	0,503	-1,32	24,90	-4,18	0,030	1,05	9,68	-2,86
13	OTMA+Nitrate	0,270	3,52	1,38	0,03	0,035	-0,15	0	0,06
14	OTMA+Glutamate	0,296	-0,31	11,07	0,01	0,022	-1,35	1,38	0,06
15	OTMA+Glycocolle	0,451	0,45	15,10	0,04	0,009	0,79	2,77	0,09
16	OTMA+Formol	0,042	-6,06	1,38	0,04	0,034	-8,60	0	0,09
17	Glutamate+TMA	0,285	-1,90	-65,00	0	0,040	-0,60	-35,95	0
18	Glutamate+DMA	0,269	-1,93	38,70	0	0,031	-1,50	24,35	0
19	Glutamate+Méthylamine	0,543	-1,99	27,67	-2,98	0,029	0	9,68	-5,48
20	Glycine+Formol	0,024	-8,42	0	0	0,020	-10,8	0	0
21	OTMA+TMA+Glu	0,568	-1,68	-26,1	0,05	0,038	0,93	-37,88	0,06
22	OTMA+DMA+Glu	0,607	-1,62	30,36	0,07	0,041	1,17	22,14	0,10
23	OTMA+Mét+Glu	0,602	-1,36	24,90	-4,65	0,028	-1,50	8,28	-9,01
24	OTMA+Formol+Glyco.	0,030	-8,96	0	0	0,010	-11,5	0	0,01

Absorption : absorbance à 600 nm ; F : formol en µg/ml; TMA en mg d'azote pour 100 ml de culture; Mét : méthylamine en ppm

La croissance bactérienne :

Comme on peut le constater les quatre souches testées se divisent en deux groupes : *S. putrefaciens* et *A. communis* qui se développent beaucoup plus difficilement que *P. mirabilis* et *P. fluorescens*. (L'évaluation du développement des flores par mesure de l'absorbance n'a qu'une relative signification mais elle apporte certains renseignements).

Cette "croissance" ne semble pas liée au développement en anaérobiose des souches mais plutôt si l'on fait référence aux tableaux 44 p. 119-120 à leur capacité à réduire l'OTMA (produire l'OTMA réductase).

Nous avons (tableaux 44 p. 119-120) pour *S. putrefaciens* et *A. communis* une production de 2,5 et 4,2 mg d'azote pour 100 ml de culture et pour *P. mirabilis* et *P.*

fluorescens 31,8 et 6,9 mg d'azote pour 100 ml de culture sur le milieu coeur-cervelle modifié à 25°C pendant 24 h d'incubation.

L'effet de l'ajout de formol :

Le formol est bactériostatique aux concentrations utilisées. Ceci se traduit généralement par un plus faible développement (absorbance plus faible dans les tubes 9, 16, 20 et 24). Mais on remarque que le formol, à cette concentration est naturellement utilisé, dégradé par les bactéries ou il réagit avec des groupements aminés libres. Il peut être utilisé comme donneur de carbone par l'intermédiaire du tétrahydrofolate.

La production de TMA :

Elle n'est pas observée avec de l'OTMA en 24 h (tube n°2) mais après 48 h d'incubation, la production de TMA est pour *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Proteus* et *Alteromonas* respectivement de 18,54, 2,76, 41,51 et 1,38 mg d'azote pour 100 ml de culture.

La réduction de l'OTMA est "activée" dès que le milieu minimum contient un autre élément nutritif (tubes 10 à 15).

Ces expériences montrent une fois encore que toutes les souches sont capables de réduire l'OTMA en anaérobiose.

Il est normal de retrouver dans les tubes 3, 10, 17, et 21 une perte de TMA qui correspond à sa dégradation.

La "TMA" est produite à partir du glycofolate (tube 8 pour *Shewanella* et *Proteus*), de la DMA (tube 4 pour toutes les souches) et de la méthylamine (tube 5 pour toutes les souches). Ceci peut s'expliquer par une et/ou des méthylations successives de la DMA et méthylamine au niveau du groupement $-NH_2$ libre pour former de la TMA qui sera de nouveau dégradée. Le glycofolate est triméthylé en bétaine qui est une amine tertiaire qui peut être réduite et le produit de réduction est dosé par la technique de Conway. Cette méthylation pourrait être réalisée par le tétrahydrofolate et/ou la S-Adénosyl-méthionine. La production de TMA à partir de choline et de bétaine est possible chez certaines Entérobactériacées : *Enterobacter*, *Proteus*, *E. coli*. (Barrett et Kwan, 1985).

La production de méthylamine :

Elle apparaît à partir de la dégradation de l'OTMA (tube 2) sauf pour *Shewanella* et à partir de la DMA (tube 4) pour *Pseudomonas* et *Alteromonas*. La méthylamine apparaît pour toutes les souches sur milieu minimum contenant de l'OTMA supplémenté par un autre élément (tubes 10 à 16).

On remarque aussi que la méthylamine est utilisée ou dégradée par toutes les souches (tube 5).

Effet du glutamate :

Le glutamate agit à deux niveaux pour les 4 souches :

- sur le cycle de Krebs (α Cétoglutarate) ce qui peut se traduire par une production plus importante de TMA (tube 14),

- il active la dégradation de la méthylamine ce qui peut se traduire par une production plus importante de formol et/ou une diminution de méthylamine (tube 19). On peut également observer une diminution du taux de TMA (tubes 17, 18, 19, 21, 22, 23).

Toutefois, il faut noter que l'action du glutamate est suivant les souches, plus ou moins importante à l'un des deux niveaux, même avec les souches qui fermentent le glucose.

Effet du glycolle :

Nous avons déjà montré qu'il peut générer la production de bétaine qui, une fois réduite, est dosable par la technique de Conway au même titre que la TMA.

Il permet également la diminution du taux de formol initial (tube 20) et une diminution du formol produit (tube 15 et 24).

Ces observations permettent de supposer l'utilisation du tétrahydrofolate comme transporteur de méthyle.

Effet du nitrate :

On constate qu'il est utilisé (tube n°6) au même titre que l'OTMA : comme donneur d'oxygène (Ishimoto et Shimokawa, 1978) au même titre que le dimethylsulfoxyde (DMSO) (Silvestro et coll., 1986) mais il n'active pas la réduction de l'OTMA (tube n°13). Il semble donc que l'OTMA réductase entre en compétition avec la nitrate réductase (Giordano et coll., 1984 ; Silvestro et coll., 1989). Nous n'avons pas obtenu d'inhibition du développement bactérien par KNO_3 .

La voie proposée existe bien mais elle doit être complétée par une méthylation de la méthylamine, de la DMA pour donner de la TMA. Par contre la triméthylation du glycolle montre que d'autres substances peuvent donner des amines tertiaires.

2. Production d'amines tertiaires chez le poisson

A partir de différents substrats (naturellement présent dans le poisson) pouvant donner, comme le glycolle, une amine tertiaire nous avons réalisé un dosage de la production de TMA par la méthode de Conway (tableau 92).

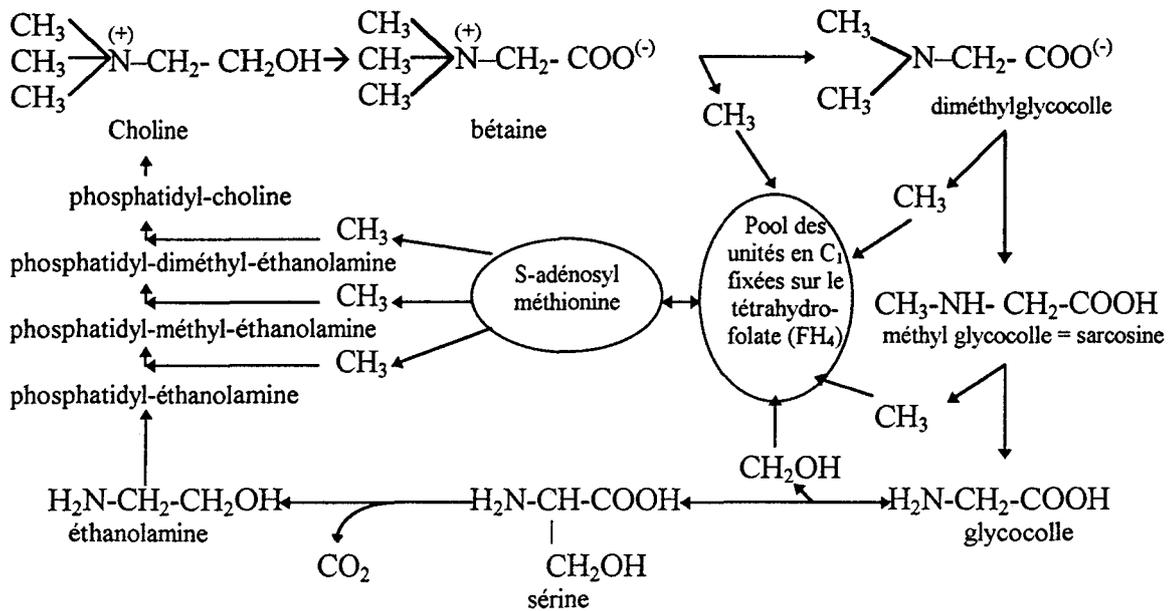
Tableau 92. Recherche d'amines tertiaires susceptibles d'être produites ou réduites.

N°tube	Produit testé	<i>S. putrefaciens</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. mirabilis.</i>	<i>A. communis</i>
25	Bétaine	5 à 26	5,5 à 29	2 à 15	1 à 3
26	DL alanine	0	1,3 à 3	0	0
27	β alanine	0	1,4 à 12	0	0
28	Choline	tr à 2	tr à 1,4	6 à 11	tr à 2,5
29	Glycérophosphorylcholine	tr à 1,4	0 à 1,4	0 à 1,4	0 à 1,4
30	Phosphorylcholine	tr à 9,7	1,4 à 2	1,4 à 65	tr à 2,8
31	Phosphatidylcholine	0	11,6 à 16,6	tr à 17,2	0 à 6,6
32	Phosphatidyléthanolamine	0	0 à 6,6	0 à 5	0

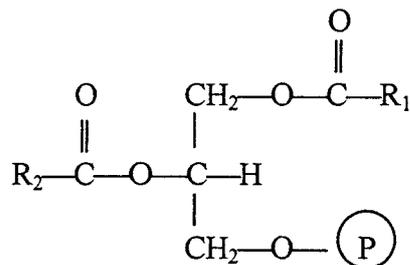
Taux de "TMA" en mg d'azote pour 100 ml de culture ; tr : traces.

Les résultats montrent d'une part que des amines tertiaires (TMA ou autres) peuvent être produites à partir d'acides aminés ou à partir de "phospholipides" (figure 29). La variation des résultats indique que ces amines tertiaires sont très mal dosées par la technique de microdiffusion.

Figure 29. Quelques relations entre ces différents composés testés (Weil, 1990)



Les glycérophospholipides qui ne sont pas repris dans ce schéma ont pour base (l'acide L- α -phosphatidique) :



R_1 et R_2 sont deux acides gras. La choline, la sérine, l'éthanolamine viennent se greffer sur le phosphate

Les acides aminés, au même titre que les produits de dégradation des phospholipides (choline, éthanolamine... libérées par les phospholipases D et/ou C) doivent être méthylés par le tétrahydrofolate et/ou la S-adénosyl-méthionine pour former par réduction des amines tertiaires. Cette méthylation ne semble pas spécifique à ces produits mais à l'ensemble des groupements NH_2 libres puisqu'on retrouve de la TMA à partir de méthylamine et DMA.

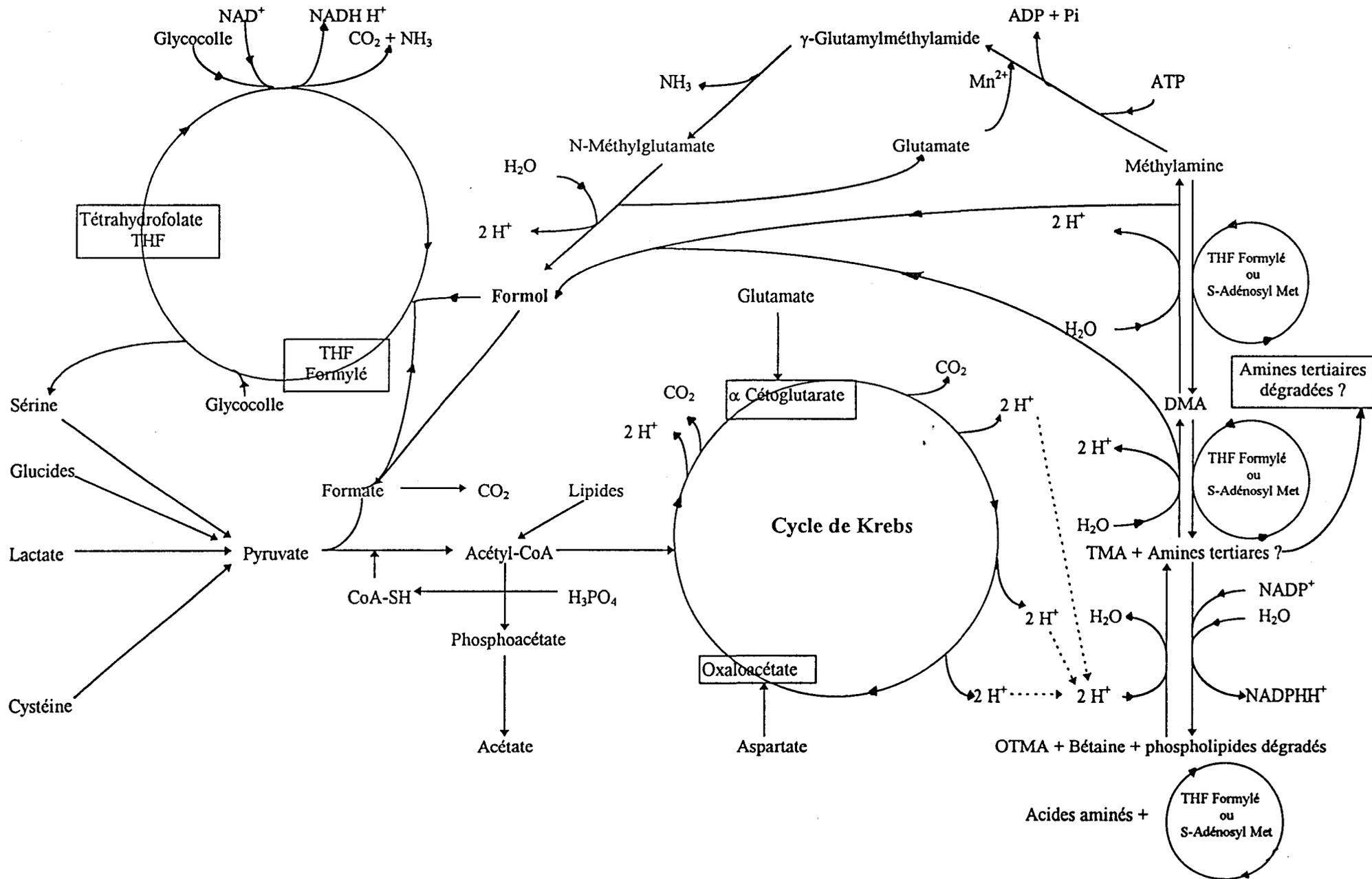
Ceci nous amène à compléter la voie de réduction des amines tertiaires (figure 30 p.190). Le formol apparaît donc comme un "carrefour métabolique". Il probable que d'autres molécules interviennent dans cette voie de réduction (Sphingomyélines par exemple).

Nous venons de montrer que l'obtention d'amine tertiaire ou d'oxyde d'amine tertiaire est variée. D'autre part, par expérience on sait que les dosages d'ABVT et de TMA ne sont pas d'une grande fiabilité : nous l'avons observé dans nos expérimentations aussi bien en microbiologie qu'en biochimie.

En effet, ces dosages d'amines "volatiles" sont difficilement exploitables sur des poissons gras (riches en phospholipide). Les taux d'ABVT chez les Sélaciens sont plus élevés. Ces remarques nous indiquent qu'il faut être relativement prudent sur l'utilisation des dosages de TMA et de l'ABVT. Ceci est probablement l'explication de la variabilité observée lors des différentes modélisations.

Toutefois l'évolution des taux d'ABVT ou de TMA est relativement fiable lorsque le poisson reste consommable. Par contre, lorsque le poisson n'est plus consommable, ces dosages peuvent fluctuer. Il apparaît donc que le rapport P semble plus intéressant car il tient compte de ces variations.

Figure 30. Dégradation des amines tertiaires en anaérobiose par les bactéries d'altération du poisson.



CONCLUSION

CONCLUSION

Les études microbiologiques que nous avons réalisées ont permis de mettre en évidence l'importance et l'intérêt de l'ensemencement au Spiral (NF V08-100) qui permet d'obtenir les meilleurs dénombrements quelle que soit la flore recherchée (et non en masse, NF ISO 4833).

Les températures optimales d'incubation sont différentes suivant les flores : 25°C pour la flore H₂S, 20°C pour la flore à Gram négatif et 20°C ou 25°C suivant le milieu de culture pour la flore totale (et non 30°C NF V08-51). Les flores du muscle des poissons des mers froides ou tempérées sont psychrotrophes ou psychrophiles. Ces flores sont également halophiles (d'origine marine). Elles ont besoin en moyenne de 1,5 % (p/v) de NaCl pour un développement optimal. Ces flores ont également des besoins nutritifs particuliers. En effet, la flore totale est mieux dénombrée sur TSA 1,5 % ou sur PCA-H₂S 1,5 % (et non sur PCA, NF V08-51). Le milieu PCA-H₂S 1,5 % permet également un dénombrement optimal et simultané de la flore H₂S. La flore à Gram négatif est mieux dénombrée sur TSA 1,5 %. Les flores semblent peu influencées par le pH de ces milieux qui sont proches de la neutralité.

Les modélisations des dénombrements de chaque flore sur leurs milieux respectifs ne peuvent être regroupées en un seul modèle commun. Nous avons montré que l'espèce, les saisons de pêche et les modes de conservation ont une influence importante sur l'évolution microbiologique de l'altération du poisson. Ces facteurs influent sur la flore présente en début d'altération, il est donc probable qu'une modélisation réalisée sur un poisson de mer chaude soit différente de celle obtenue de mer froide.

Les modélisations des dénombrements en fonction de l'I.F. n'ont pas de phase de latence de développement et elles se regroupent au niveau de l'indice 3 de fraîcheur. Ceci nous montre d'une part, que les temps de conservation sont réduits par des traitements que subissent les poissons lors de pêches industrielles et d'autre part, à partir d'un protocole de prélèvement bien défini on peut réduire la variabilité analytique des dénombrements. Nous pouvons donc estimer qu'un poisson altéré possède des dénombrements supérieurs à : 100.000 ufc/g pour la flore totale, 10.000 ufc/g pour la flore H₂S et 45.000 ufc/g pour la flore à Gram négatif. Ces seuils ne sont valables que pour nos conditions expérimentales.

Les bactéries à Gram négatif et plus particulièrement les bactéries productrices d'H₂S jouent un rôle important dans l'altération. La flore H₂S est principalement constituée de *Shewanella putrefaciens*. Les dénombrements de la flore à Gram négatif sont variables, même si les modélisations sont similaires suivant les espèces, on ne peut les regrouper en un seul modèle. Il reste donc encore beaucoup d'informations à obtenir de ces flores qui contaminent la chair du muscle. Pour un même lot de poisson, les proportions de ces flores vis à vis de la flore totale ne sont pas reproductibles car elles dépendent du traitement qu'a subi le poisson lors de sa capture (écrasé, éraflé...).

Nous avons également montré que la flore totale serait capable de réduire l'OTMA dans des conditions d'anaérobiose ou de micro-aérobiose. Ces conditions sont de plus en plus utilisées pour conserver le poisson : sous vide ou en atmosphère modifiée. Ces conditions se rencontrent également à l'intérieur du muscle de poisson. Un milieu de culture modifié nous permet d'évaluer la capacité bactérienne (la flore du poisson) à réduire l'OTMA en 24 h. Un poisson altéré ayant des dénombrements (obtenus entre 48 et 72 h de culture) supérieurs à ceux indiqués à la page précédente a une activité bactérienne de réduction de l'OTMA supérieure à 36mg d'azote pour 100 ml de culture.

Les études biochimiques que nous avons réalisées ont permis d'établir et de montrer l'intérêt de nouvelles techniques d'évaluation d'altération du poisson par le dosage d'amines biogènes et volatiles et de groupements d'aminés libres.

La technique de dosage des amines biogènes et volatiles par C.L.H.P. mise au point est rapide (1 h) et simple à mettre en oeuvre. L'étude des différentes étapes du protocole a permis de montrer que les amines du poisson ont des liaisons particulières avec le muscle, ce qui modifie leur récupération (la majeure partie des techniques d'analyses de dosage des amines biogènes ont été mises au point à partir de solutions commercialisées). Les amines sont sensibles à la chaleur aussi bien pour l'extraction, pour le marquage avec le chlorure de dansyl que pour la conservation. Il est préférable de travailler à froid (-20°C).

Un nouveau rapport, l'indice d'altération regroupant l'ensemble des amines détectées par C.L.H.P. permet de suivre l'altération des poissons. Les modélisations de ce rapport en fonction de l'altération permet de montrer l'importance de l'espèce, de la saison de pêche et du mode de conservation comme nous l'avons obtenu pour les dénombrements bactériens. Cet indice d'altération dépend donc de la flore d'altération, on ne peut donc pas actuellement établir un seul "seuil" général pour un poisson altéré.

La détection des dérivés de dégradation de l'ATP est réalisée par une technique C.L.H.P. simple. Elle permet un dosage de nucléotides en 45 min. Par contre, il apparaît que la dégradation des dérivés de l'ATP étudiés (H, K ou K') ne soit pas exploitable sur l'ensemble des espèces. D'autres dérivés nucléotidiques (de dégradation de l'ATP) interviendraient dans l'évaluation de la fraîcheur du poisson.

Une technique dérivant d'une méthode (adaptée au poisson) de dosage du formol par le réactif de Hantzsch permet le dosage des groupements aminés libres. Ce dosage est rapide (30 min) et permet de suivre d'une façon générale l'altération du poisson. En effet, ce dosage dépend de la dégradation des substances azotées (protéines, acides aminés, les triméthylamines...)

Les modélisations de ce dosage en fonction de l'altération montrent des variations importantes qui traduisent d'une part, un manque de précision de l'analyse et d'autre part, que le mode de conservation influence la modélisation. On peut considérer qu'un poisson consommable a des groupements aminés libres supérieurs à 25 % et un poisson inconsommable a des groupements aminés libres inférieurs à 10 %. Les variations sont probablement dues au protocole qui peut encore être optimisé et aux manques de résultats.

Des études de modélisations ont permis de proposer un rapport des groupements aminés libres sur l'indice d'amines : l'indice des groupements libres. Les modélisations de l'évolution de cet indice pour deux espèces différentes et conservées de façon différente peuvent être regroupées. Ce rapport permet de suivre l'évolution de l'altération des poissons : on peut considérer qu'un poisson consommable a un indice des groupements libres supérieur à 18 mais des variations existent.

Nous avons également montré que la production d'amines tertiaires ou TMA peut provenir de la "dégradation" de certains phospholipides et acides aminés dans des conditions d'anaérobiose ou de micro-anaérobiose par toutes les souches bactériennes testées. Mais nous n'avons actuellement pas plus d'information sur les mécanismes exacts de ce catabolisme.

Toutes les représentations biochimiques d'altération montre une phase de latence. Elle peut être imputée à la flore d'altération qui doit avoir une activité significative d'altération après une phase de multiplication et d'adaptation. On ne peut donc étudier l'altération du poisson sans réaliser des études microbiologiques et biochimiques simultanées.

Perspectives :

Nos travaux permettent de mieux comprendre et évaluer l'altération du muscle de poisson et d'envisager certaines orientations de recherches.

Nos travaux microbiologiques montrent l'importance de la flore H₂S dans la flore d'altération. Mais cette flore n'explique pas à elle seule la production d'amine, la disparition des groupements aminés libres ou la production d'amines tertiaires. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de la flore d'altération (à Gram négatif) et de chercher à identifier certaines souches bactériennes responsables de ces dégradations. Ceci peut être réalisé simplement à partir de souches référencées mais il faudra impérativement une étude appliquée sur le poisson pour regarder l'effet des différents facteurs pouvant intervenir pendant l'altération.

Il faut également noter que nos études se sont bornées à quelques facteurs intervenant dans l'altération. Le travail est à compléter afin de pouvoir établir avec plus d'exactitude les différents "seuils" de dégradation microbiologique et biochimique de poisson ou éventuellement en déterminer d'autres. Il serait intéressant de travailler avec d'autres espèces de poissons (entre autres des Sélaciens et des poissons de mer chaude), en intégrant d'autres saisons de pêche et d'autres modes de conservation (filet, congélation, sous vide...) et de pouvoir ainsi réaliser de nouvelles modélisations qui permettront de regrouper ou différencier les espèces ou modes de conservation...

Un travail similaire serait à réaliser sur la mise au point de milieux de culture (besoins en sel et nutritifs) des flores des poissons d'eau douce et des poissons fumés.

Il serait intéressant de travailler sur la normalisation de protocoles pour les prélèvements d'échantillons de chair de poisson. En effet, les prélèvements apparaissent comme les principales sources de variation.

Deux exemples peuvent exprimer le risque encouru :

- un poisson frais entier peut avoir sur la peau 10.000 à 100.000 ufc/ cm² alors que sa chair en contient moins de 1.000 ufc/g,

- un filet (100-400 g) de poisson congelé met moins de 3 h à décongeler à 20°C par contre il lui faudra plus de 12 h à 20°C s'il fait partie d'un bloc de filets de 10 kg.

Pour notre part, nous avons montré qu'en nettoyant les poissons entiers avant de réaliser les prélèvements de l'ensemble des filets (afin d'avoir une évaluation globale de l'altération) cela réduisait considérablement les variations. En ce qui concerne la décongélation, elle peut être rapide (2 min de -20 à 0°C) si elle est réalisée par des appareils de décongélation à hautes fréquences sans risque d'altération organoleptique et microbiologique mais dont le coût reste encore élevé.

En ce qui concerne les recherches biochimiques, elles ont été très riches mais nous n'avons qu'effleuré certains problèmes d'altération. Par exemple, nous n'avons pas étudié les enzymes responsables de la production des amines biogènes, des amines volatiles et des amines tertiaires. D'autre part, l'étude des dérivés de dégradation de l'ATP reste encore incomplète.

La TMA et l'ABVT dosées par les techniques de Conway ou de Billon ne sont donc pas spécifiques. Il faut plutôt utiliser le terme d'amine tertiaire pour le dosage de la TMA. D'autre part, les modélisations des évolutions de dénombrements des flores en fonction de l'ABVT ou P % ont montré une plus grande variabilité que celles réalisées avec l'I.F, ce qui confirme les démonstrations des paragraphes précédents.

L'étude de la voie de dégradation des composés pouvant donner des molécules dosables par la méthode de Conway ou de Billon nous permet de mieux comprendre les problèmes de dosages de "TMA" et d'ABVT rencontrés. En effet, il apparaît clairement que la quantité d'OTMA dans le poisson ne semble pas si importante que la bibliographie semble le laisser croire car cette quantité a été déterminée par les mêmes techniques de dosages (Conway ou Billon). Cette voie permet également de mieux comprendre les doses élevées de "TMA" ou d'ABVT chez les Sélaciens (contenant beaucoup de triméthylamines), et montre que ces dosages ne sont pas exploitables sur les poissons gras (lipides plus complexes) et que pour un même lot on peut avoir des variabilités de mesures (alimentation, états physiologiques différents...). L'origine de la "TMA" est donc variée et il serait intéressant de la déterminer avec plus de précision par d'autres méthodes d'analyses : par exemple la chromatographie en phase gaz couplé à un spectrophotomètre de masse pour déterminer avec précision les composés volatils formés.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Abdalla M.A., Hassan I.M., Shalaby A.R., and Naguib K., 1989. Correlation between biogenic amines, chemical changes and stability of sea bream fish during storage at -18°C. Grasas y Aceites (sevilla) 40,6 : 406-412.

Ackman R.G. 1980. Fish lipids. Part I. in : *Advances in Fish Science and Technology*. Ed. Fish. News Books Lim. Farnham, England 86-103.

Adams R., Farber L., and Lerke P., 1964. Bacteriology of spoilage of fish muscle, II-Incidence of spoilers during spoilage. Appl. Microbiol. 12,3 : 277-279.

Agustsson I., and Strom R., 1981. Biosynthesis and turnover of trimethylamine oxide in the teleost cod, *Gadus morhua*. J. Biol. Chem. 256,15 : 8045-8049.

Akande, G.R., Knowles, M.J., and Taylor, K.D., 1991. Rancidity and changes in fatty acid composition of salted dried and salted smoked mackerel cakes. Trop. Sci. 31 : 55-63.

Anderson P.M., 1995. Urea cycle in fish : molecular and mitochondrial studies. Fish Physiol. 14 : 57-83.

Angel S. and coll. 1977. A study of the decomposition of three popular varieties of fish in Israel with a view towards further processing. J. Food Technol. 12,1 : 27-35

A.O.A.C., 1984. Official methods of analysis (14th edition). Formaldehyde in maple sirup, spectrophotometric method : 599.

Austin B., 1983. Bacterial microflora associated with a coastal, marine fish-rearing unit. J. Mar. Biol. Ass. UK 63 : 585-592.

Austin B., and Al-Zahrani A.M.J., 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R. J. Fish. Biol. 33 : 1-14.

Austin B., and Mc Intosh D., 1988. Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow trout *Salmo gairdneri* R. J. Fish. Dis. 11 : 275-277.

Babitt J.K., Crawford D.L., and Law D.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. 20,5 : 1052-1054.

Barile L.E., Milla A.D., Reilly A., and Villadsen A., 1985. Spoilage patterns of mackerel (*Rastrelliger faughii matsui*) 2. Mesophilic and psychrophilic spoilage. J. Osean Food. 1 : 121-127.

Barett E.L., and Kwan H.S., 1985. Bacterial reduction of trimethylamine oxide. Ann. Rev. Microbiol. 39 : 131-149.

Baumann L., Baumann P., Mandel M., and Allen R.D., 1972. Taxonomy of aerobic marine Eubacteria. J. Bacteriol. 110,1 : 402-429.

Beatty S.A., and Gibbons N.E., 1937. The measurement of spoilage in fish. J. Biol. Bd Can. 3,1 : 77-91.

Beatty S.A. and Collins V.K., 1939. Studies of fish spoilage 6. The breakdown of carbohydrates, proteins and aminoacids during spoilage of cod muscle press juice. J. Fish. Res. Bd Can. 4 : 412-423.

Bedford R.H., 1933. Marine bacteria of the northern pacific ocean : the temperature range of growth. Contribs. Can. Biol. Fish. 7 : 433.

- Bell G.R., Hoskins G.E., and Hodgkiss W., 1971. Aspect of the characterization, identification, and ecology of the bacterial flora associated with the surface of stream-incubating Pacific salmon (*Oncorhynchus*) eggs. J. Fish. Res. Bd. Can. **28** : 1511-1525.
- Beltran A., and Moral A., 1990. Keeping quality of vacuum-packaged smoked sardine fillets : biochemical and organoleptic aspects. Lebensm. Wiss. Technol. **23** : 255-259.
- Beltran A., and Moral A., 1991 (a). Changes in fatty acid composition of fresh and frozen sardine (*Sardina pilchardus* W.) during smoking. Food Chem. **42** : 99-109.
- Beltran A., and Moral A., 1991 (b). The effects of fat content and storage temperature on the storage life of smoked fillets (*Sardina pilchardus* W.) prepared from frozen sardine. Food Chem. **42** : 347-356.
- Bilinski E., Jonas R.E.E., and Peters M.D., 1983. Factors controlling the deterioration of the spiny dogfish *Squalus acanthias* during iced storage. J. Food Sci. **48** : 808-812.
- Billon J., Ollieuz N., and Tao S.H., 1979. Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'azote basique volatile total pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. R.T.V.A. **149** : 13-17.
- Bonde G.J., 1977. Bacterial indication of water pollution. In Adv. in aquatic microbiol. Ed. M.R. Roop Acad. Press. Londres : 273-364.
- Borgstrom G., 1962. Shellfish protein. Nutritive aspects. In : "Fish as Food" Borgstrom. Ed. Acad. Press New-York II : 115-148.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F., et Zucca J., 1988. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires. in : Microbiologie Alimentaire. Ed. Lavoisier Paris.
- Boyle J.L., Lindsay R.C., and Stuber D.A., 1991. Adenine nucleotide degradation in modified atmosphere chill-stored fresh fish. J. Food Sci. **56,5** : 1267-1270.
- Bravo M., Eran H., Zhang F.X., and Mac Kenna C.E., 1988. A rapid ,sensitive high-performance liquid chromatography analysis of ammonia and methylamine for nitrogenase assays. Anal. Biochem. **175** : 482-491.
- Bramstedt F. and coll. 1961. The spoilage of fresh-water. in : Fish as Food. Brogstrom. Ed. Acad. Press. New York 1 : 613-638.
- Bremner H.A. and Statham J.A. 1983. Spoilage of vacuum-packed chill-stored scallops with added *lactobacilli*. Food Technol. Austr. **35,6** : 284-287.
- Burt J.R., 1977. Hypoxanthine : a biochemical index of fish quality. Process Biochem. **12** : 32-35.
- Buttiaux R., 1968. Le déversement en mer des eaux résiduaires. Bull. INSERM **23,3** : 623-638.
- Buttiaux R., Beerens H., et Tacquet A., 1974. Manuel de techniques bactériologiques. in : Médecine, Sciences. Ed. Flammarion, Paris.
- Cahill M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: Rev. Microbiol. Ecol. **19** : 21-41.
- 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. Ed. Tropical Products Institute London : 377-394.
- Cann D.C. and coll., 1971. The bacteriology of campi (*Nephrops norvegicus*). J. Food Technol. **6,2** : 153-161.
- Castell C.H., 1950. The influence of trimethylamine oxide on the bacterial reduction of redox indicators. J. Fish. Res. Bd. Can. **7,10** : 567-575.
- Castell, C.H. Neal, W.E., and Dale, J. 1973. Comparison of changes in trimethylamine, dimethylamine and extractable protein in iced and frozen gadoid fillets. J. Fish. Res. Bd. Can. **30**, 1246-1248.

Cheftel J.C., et Cheftel H., 1984. Vol. 1. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. in : Biochimie et Technologie des aliments (Vol. 1 et 2). Ed. Tech. et Doc., Lavoisier Paris.

Colwell R.R., 1962. The bacterial flora of Puget Sound fish. J. Appl. Bacteriol. **25** : 147-158

Conway, E.J., 1962. Determination of volatile amines. in: E.J. Conway microdiffusion analysis and volumetric error. 5th Ed. Crosby Lockwood, London : 195-603.

Crepey J.R., 1972. Pollution et protection de la chaîne alimentaire. In : Les nuisances dans les activités rurales. Ed. Guy Le Prat paris: 173-246.

Cruickshank E.M., 1962. Fat soluble vitamins. in : Fish as Food Borgstrom. 2nd Ed. Acad. Press New-York : 175-203.

Debevère J.M., and Voëts J.P., 1974. A rapid selective medium for the determination of trimethylamine-oxide-reducing bacteria. Z. Allgem. Mikrobiol. **14** : 655-658.

Deckert W., 1961. Simple test for the degree of putrefaction of raw fish. Chemiker. Ztg. **85** : 224-227.

De Koning A.J., and Mol T.H., 1990. Rates of free fatty acid formation from phospholipids and neutral lipids in frozen cape hake (*Merluccius spp*) mince at various temperatures. J. Sci. Food Agric. **50** : 391-398.

Dey I., Buda C., Halver J.E., and Farkas T., 1993. Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and fresh water fish in relation to temperature. Biochem. **90** : 7498-7502.

Dingle, J.R., Keith R.A., and Lall B., 1977. Protein instability in frozen storage induced in minced muscle of flatfishes by mixtures with muscle of red hake. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. **10** : 143-146.

Dunajski E., 1979. Texture of fish muscle. J. Texture Studies **10,4** : 301-318.

Dyer W.J., and coll., 1961. Fish proteins with special reference to freezing. In : Fish as Food Borgstrom. 1st Ed. Acad. Press. New-York 1 : 275-328.

Easter M.C., Gibson D.M., and Ward F.B., 1982. A conductance method for the assay and study of bacterial trimethylamine oxide reduction. J. Appl. Bacteriol. **52** : 357-365.

Edmunds W.J., and Eitenmiller R.R., 1975. Effect of storage time and temperature on histamine content and histidine decarboxylase active of aquatic species. J. Food Sci. **40** : 516-519

Eerola S., Hinkkanen R., Lindfors E., and Hirvi T., 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. J.A.O.A.C. Int. **76,3** : 575-577.

Ehira S., and Uchiyama H., 1974. Freshness-lowering rates of cod and sea bream viewed from changes in bacterial count, total volatile base, and trimethylamine-nitrogen, and ATP related compounds. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **40,5** : 479-487.

Eskin N.A.M., Henderson H.M. and Townsend R.J., 1971. The biodegradation of foods. in : Biochemistry of foods. Ed. Academic Press, London.

Fellers C.R., and Harvey E.W., 1940. Effect of the benzoated brine dips on the keeping quality of fish fillets. Food Res. **5** : 1.

Fernández-Salguero, J., and Mackie, I.M. 1987. Compositive rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and herring (*Clupea herengus*) as determined by the formation of non-volatile and volatile amines. Int. J. Food Sci. Technol. **22**, 385-390.

Fischer J.H., 1995. Specific determination of nucleotides, creatine phosphate, and their derivatives from tissue samples in a simple, isocratic, recycling, low-volume system. L.C.-G.C. Int. **8,5** : 254-264.

- Forget P., and Pichinoty F., 1965. Le cycle tricarboxylique chez une bactérie dénitrifiante obligatoire. Ann. de Inst. Past. **108** : 364-377.
- Fujii Y., Shudo K., Nakamura K., Ishikawa S., and Okada M., 1973. Relation between the quality of canned fish and its content of ATP-breakdown -III. ATP-breakdowns in canned albacore and skipjack in relation to the organoleptic inspection. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **39**, 69-84.
- Geiger E. and coll., 1962. Fish protein- Nutritive aspects. in : fish as food. Borgstrom. Ed. Acad. Press. New-York II : 29-114.
- Gennaro M.C., Mentasti E., Sarzanini C., and Porta V., 1988. Aliphatic monoamines, diamines, polyamines : an HPLC method for their identification and separation factors in homologous series. J. Chromatogr. **25**, 117-124.
- Georgala D.L., 1957. Changes in the skin flora of cod after washing and icing. J. Appl. Bacteriol. **20**,1 : 23-29.
- Gilbert J., and Knowles, M.E., 1975. The chemistry of smoked foods: a review. J. Food Technol. **10** : 245.
- Gill T.A., Keith R.A., and Smith-Lall B., 1979. Textural deterioration of red hake and haddock muscle in frozen storage as related to chemical parameters and changes in the myofibrillar proteins. J. Food Sci. **44** : 661-667
- Gillepsie B., 1975. The Bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage. J. Appl. Bacteriol. **39** : 91-100.
- Gillepsie B., and Macrae, I.C. 1975. The bacterial flora of some queensland fish and its ability to cause spoilage. J. Appl. Bacteriol. **39** : 91-100.
- Gilmour A., Mac Callum M.F., and Allan M.C., 1976. A study of the bacterial types occurring on the skin and in the intestines of farmed plaice, *Pleuronectes platessa*. Aquaculture **7** : 161-172
- Giordano G., Violet M., Medani C.-L., and Pommier J., 1984. A common pathway for the activation of several molybdoenzymes in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Acta **798** : 216-225.
- Goldspink G., 1995. Adaptation of fish to different environmental temperature by qualitative and quantitative changes in gene expression. J. Therm. Biol. **20** : 167-174
- Gonzalez-carrero and coll., 1979. Contenido de fluor en moluscos y peces de la ría de arosa (Galicia, España). La lapa (*Parella vulgata*) como indicador biológico. Rev. Agroquim. Technol. Alim. **19**,3 : 378-384
- 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. Océanis **15** : 599-604.
- Govindan T.K., 1969. Studies on salting and drying of fish with special reference to changes in nitrogenous constituents. Indian Food Packer : 18-22.
- Gram L., Trolle G. Huss H.H., 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. Int. J. Food Microbiol. **4** : 65-72.
- Greene D.H., and Barnett-Burne E.I., 1990. Adenosine triphosphate catabolites as flavor compounds and freshness indicators in pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and pollock (*Theragea chalcogramma*). J. Food Sci. **55**, 1 : 257-258/
- Guth H., Hofmann T., Schieberle P., and Grosch W., 1995. Model reactions on the stability of disulfides in heated foods. J. Agric. Food Chem. **43** : 2199-2203.
- Harada K., 1975. Studies of enzyme catalysing formation of formaldehyde and dimethylamine in fishes and shells. J. Shimonoseki Univ. Fish. **23** : 165-241.



- Hayman A.R., Gray D.O., and Evans S.V., 1985. New High-Performance Liquid Chromatography system for the separation of biogenic amines as their Dns derivatives. J. Chromatogr. **325**, 462-466.
- Herbert R.A., 1975. Microbial ecology of fish spoilage. Process Biochem. **10** : 9-11.
- Herbert R.A., Ellis J.R., and Shewan J.M., 1975. Isolation and identification of the volatile sulphides produced during chill-storage of north sea cod (*Gadus morhua*). J. Sci. Food Agric. **26** : 1187-1194.
- Herborg L., and Villadsen A., 1975. Bacterial infection / invasion in fish flesh. J. Food Technol. **10**, 507-513.
- Hess F., 1942. Studies on saltfish. J. Fish. Res. Bd Can. **6** : 1.
- Higashi H., 1961. Vitamins in fish-with special reference to edible parts. in : Fish as Food. Borgstrom. 1st Ed. Acad. Press New-York.: 411-486.
- Hillig F., Shelton Jr., Loughrey J.H., and Eisner J., 1958. Chemical indices of decomposition in cod. J. Assoc. Off. Agric. Chem. **41** : 763-776.
- Hobbs G., 1983. Microbial spoilage of fish. In Food Microbiol. in : Adv. and Prospects. Ed. Robert T.A. and Skinner F.A. Academic Press : 217-229.
- Hobbs G., and Hodgkiss W., 1982. The bacteriology of fish handling and processing. in : Food microbiol Davis R. Ed. Appl. Sci. Processing. Dev. : 71-117.
- Hollingworth T.A., Wekell M.M., Sullivan J.J., Torkelson J.D., and Tchrom H.R., 1990. Chemical indicators of decomposition for raw surimi and flaked artificial crab. J. Food Sci. **55** : 349-352.
- Horie S., Okuzumi M., Kimura M., Akahori M., and Kawamae M., 1972. Studies on psychrophilic spoilage bacteria of chilled sea fish bacterial flora in the spoilage of raw fish. J. Food Hyg. Soc. Jap. **13** : 410-421.
- Horsley R.W., 1973. The bacterial flora of the atlantic salmon (*Salmo salar*) in relation to its environment. J. Appl. Bacteriol. **36** : 377-386.
- Horsley R.W., 1977. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analyses. J. Fish Biol. **10** : 529-553.
- Horst K., 1984. Danerkonserven aus blauem wittling. Ed. Arbeiten Inst. Biochem. and Technol. 1.
- Huang Y.W., Koehler P.E., Eitenmiller R.P., and Lillard D.A., 1992. Effects of film overwrapping, vacuum packaging and vacuum skin packaging on psychrotrophic counts and chemical changes of iced channel catfish. J. Food Process. Preserv. **16,3** : 205-213.
- Hui J.Y., and Taylor S.L., 1983. High-Pressure Liquid Chromatographic determination of putrefactive amines in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66** : 853-857.
- Huss H.H., 1988. Le poisson frais : Qualité et altération de la qualité. Rome : Collection F.A.O. : Pêches n°29.
- Huss H.H., and Asenjo I., 1976. Storage life of gutted and ungutted white fish. Annual report, Technological Laboratory, Ministry of Fisheries, Denmark : 32-37.
- Ikeda S., 1980. Other organic components and inorganic components. in : Advances in fish science and technology Connell J.J. Ed. Fishing News Books Ltd Farnham, England : 111-124.
- Ishimoto M., and Shimokawa O., 1978. Reduction of trimethylamine N-oxide by *Escherichia coli* as anaerobic respiration. Z. Allgem. Mikrobiol. **18,3** : 173-181.
- Jacquot R., 1961. Organic constituents of fish and other aquatic animal foods. in : Fish as Food Borgstrom. 1st Ed. Acad. Press. New-York : 146-192.
- Jay J.M., 1970. Modern food microbiology. Ed Reinhold book Corporation - New York : 81-86.

- Joosten H.M. and Northolt L.J., 1989. Detection, growth, and amine-producing capacity of *Lactobacilli* in cheese. Appl. Environ. Microbiol. : 2356-2359.
- Jouve J.L., Dromigny E., and Vincent P., 1991. Physiologie des organes animaux. in : La conserve appertisée. Ed. 1 Sciences et techniques agro alimentaires. Lavoisier. Paris : 45-61.
- Jones N.R., Murray J., 1964. Rapid measures of nucleotide dephosphorylation in iced fish muscle. Their values as indices of freshness and of inosine 5'-monophosphate concentration. J. Sci. Food Agric. 15 : 684.
- Jorgensen B.R., and Huss H.H., 1989. Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. Int. J. Food Microbiol. 9 : 51-62.
- Kalkowski I., and Conrad R., 1991. Metabolism of nitric oxide in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa* and nitrate-respiring *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 82 : 107-112.
- Karmas E., 1981. Biogenic amines as indicators of seafood freshness. Lebensm. Wiss. Technol. 14 : 273-275.
- Kawabata T., 1953. Studies on the trimethylamine oxide-reductase. I. Reduction of trimethylamine oxide in the dark muscle of pelagic migrating fish under aseptic conditions. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 19 : 505-512.
- Kikuchi S., and Ishimoto M., 1980. Nitrate respiration of *Klebsiella pneumoniae* on amino acids, especially on serine. Z. Allgem. Mikrobiol. 20,6 : 405-413.
- Kim K.E., and Chang G.W., 1974. Trimethylamine oxide reduction by *Salmonella*. Can. J. Microbiol. 20 : 1745-1748.
- Klausen N.K., and Lund E., 1986. Formation of biogenic amines in herring and mackerel. Z. Lebensm. Unters. Forsh. 182 : 459-463.
- Knowles M.E., 1975. Phenols in smoked cured meats. Phenolic composition of commercial liquid smoke preparations and derived bacon. J. Sci. Food Agric. 26,3 : 189-196.
- Koizumi C., Ohshima T., and Wada S., 1990. A comparison of the deterioration in quality of freeze dried flesh of halibut (*Hippoglossus stenolepis*) during storage in air and nitrogen at low water activities. J. Sci. Food Agric. 52 : 561-572
- Krizek A.R., Smith J.S. and Phebus R.K., 1995. Biogenic amine formation in fresh vacuum-packaged beef stored at -2°C for 100 days. J. Food Protect. 58,3 : 284-288.
- Kuehn R.L., Berlin K.D., Hawkins W.E., and Ostrander G.K., 1995. Relationships among petroleum refining, water and sediment contamination, and fish health. J. Toxicol. and Environ. Health. 46 : 101-116.
- Labuza T.P., 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. Critical Reviews in Food Technol 10 : 355-403.
- Lannelongue M., Finne G., Hanna M.O., Nickelson R., and Vanderzant C. 1982. Microbial and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO₂-enriched atmospheres. J. Food Protect. 45,13 : 1197-1203.
- Laycock R.A., and Regier L.W., 1971. Trimethylamine-producing bacteria on haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) fillets during refrigerated storage. J. Fish. Res. Bd Can. 28,3 : 305-309.
- Leclerc H., and Mossel D.A.A., 1989. Microbiologie le tube digestif l'eau et les aliments. Ed. Doin Paris.
- Lee J.V., Gibson D.M. and Shewan J.M., 1977. A numerical taxonomic study of some *Pseudomonas*-like marine bacteria. J. General Microbiol. 98 : 439-451.
- Lee, Y.C., Singh, R.P., and Haard, N.F., 1992. Changes in freshness of chilipper rockfish (*Sebastes goodei*) during storage as measured by chemical sensors and biosensors. J. Food Biochem. 16 : 119-129.

Legrand G., Adrian J. and Frangne. 1981. Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition. Ed. Lavoisier Technique et documentation. Paris.

Leisner J.J., Millan J.C., Huss H.H., and Larsen L.M., 1994. Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish. J. Appl. Bacteriol. 76 : 417-423.

Len, P.P., 1987. Mesophilic spoilage of marine fish : bay trout (*Arripis trutta*), bream (*Acanthopagrus butcheri*) and mullet (*Aldrichetta forsteri*). Food Technol. Aust. 39 : 277-282.

Lerke P., Adams R., and Farber L., 1965. Bacteriology of spoilage of fish muscle III. Characterization of spoilers. Appl. Microbiol. 13,4 : 625-630.

Lescure J.P., et Geruy G.R., 1990. Possibilités et limites du dosage du formol dans les sucres et sirops. I.A.A. juillet / août : 639-643.

Lin J.-K., and Lai C.-C., 1980. High performance liquid chromatographic determination of naturally occurring primary and secondary amines with dabsyl chloride. Anal. Chem. 52 : 630-635.

Lindsay G.J.H., 1986. The significance of chitinolytic enzymes and lysozymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence. Aquaculture. 51 : 169-173.

Liston J. 1980. Microbiology in fishery science. in : Advances in fish Science and Technology. Ed. J.J.Connell, Fishing News Book Ltd Farnham, Surrey, England.

Liston J. 1982. Recent advances in the chemistry of iced fish spoilage. in : Chemistry and Biochemistry of marine food products Ed. AVI Pub. Cy, Westport, Connecticut. : 27-37.

López-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., Roig-Sagues, A.X., and Mora-Ventura, M.T., (1994). Bacteriologie quality of tuna fish (*Threnmus thymus*) destined for canning : effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. J. Food Protect. 57,4 : 318-323.

Ludorff W., und Meyer V., 1973. Fische und Fischerzeugnisse. Ed. Paul Parey, Berlin.

Luong J.H.T., Male K.B., and Huynh M.D., 1991. Applications of polarography for assessment of fish freshness. J. Food Sci. 56 : 355-340.

Luong J.H.T., Male K.B., Masson C., and Nguyen A.L., 1992. Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes. J. Food Sci. 57 : 77-81.

Mac Donell M.T., and Colwell R.R., 1985. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, Listonella and shewanella. System. Appl. Microbiol. 6 : 171-182.

Mac Farlane R.D., Mac Laughlin J.J., and Bullock G.L., 1986. Quantitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal marine environments. J. Wildlife Dis. 22 : 344-348.

Mackie J.M., and 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.

Mac Meekin T.A., Hulse L., and Bremner H.A., 1982. Spoilage association of vacuum packed sand flathead (*Platycephalus bassensis*) fillets. Food Technol. Austr. 34,6 : 278-282.

Magnusson H. and Traustadottir K., 1982. The microbiol flora of vacuum packed smoked herring fillets. J. Food Technol. 17 : 695-702.

Malins D.C., and Ostrander G.K., 1994. Aquatic toxicology : Molecular, biochemical, and cellular perspectives. Ed. Chelsea, MI : Lewis.

Malle P., 1992. Microbiologie des poissons marins evaluation experimentale de l'alteration. These n°964, U.S.T. Lille I.

Malle P., 1994. Microflores bactériennes des poissons marins et évaluation de l'altération. Rec. Méd. Vét. 2 : 147-157

Malle, P., and Tao, H. 1987. Rapid quantitative determination of triméthylamine using steam distillation. J. Food Protect. 5, 756-760.

Malle P., and Poumeyrol M., 1989. A new chemical criterion for the quality control of fish : triméthylamine/total volatile basic nitrogen (%). J. Food Protect. 52 : 419-423.

Malle P., Eb P., et Tailliez R., 1981. Etude expérimentale de l'action antiseptique de la fumée sur *Escherichia coli*. Rev. Ind. Alim. Agric. 98,3 : 175-180.

Malle P., Eb P., and Tailliez R., 1986. Determination of the quality of fish by measuring triméthylamine oxide reduction. Int. J. Food Microbiol. 3 : 225-235.

Malle P., Nowogrocki G., et Tailliez R., 1983. Corrélation entre l'indice d'altération et l'azote basique volatil total pour divers poissons marins. Sci. Alim. 3 : 311-322.

Malle P., Vallé M. and Bouquelet S., 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. J. A.O.A.C. Int. 79,1 : 43-49.

Martin R.E., Gray R.J., and Pierson M.D., 1978. Quality assessment of fresh fish and the role of naturally occurring microflora. Food Technol. 32,5 : 188.

Meiberg J.B.M., and Harder W., 1978. Aerobic and anaerobic metabolism of triméthylamine, diméthylamine and méthylamine in *Hyphomicrobium* sp. J. Gen. Microbiol. 106 : 265-276.

Melnick D., Luckman F.H. and Gooding C.M., 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. VI. Metabolic degradation of sorbic acid in cheese by molds and the mechanism of mold inhibition. Food Res. 19 : 44.

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.

Mountney G.J., and Gould W.A., 1988. Practical food microbiology and technology. 3th edition. Ed. An Avi Book Van Nostrand Reinhold Company New-York.

Mudarris M., and Austin B., 1988. Quantitative and qualitative studies of the bacterial microflora of tubot, *Scophthalmus maximus* L., gills. J. Fish. Biol. 32 : 223-229.

Mulchandani, A., Luong, J.H.T., and Male, K.B.. (1989). Development and application of a biosensor for Hypoxanthine in fish extract. Anal. Chimica Acta 221, 215-222.

Mulchandani, A., Male, K.B., and Luong, J.H.T.. (1990). Development of a biosensor for assaying postmortem Nucleotide degradation in fish tissues. Biotechnol. Bioengineer. 35, 739-745.

Murray I., and Burt J.R., 1969. The decomposition of fish. Torry advis. 38 Note, Aberdeen.

Murray C.K., and Fletcher T.C., 1976. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L) tissues. J. Fish Biol. 9 : 329-334.

Newman J.T., Cosenza B.J., and Buck J.D., 1972. Aerobic microflora of the bluefish (*Pomatomus saltatrix*) intestine. J. Fish. Res. Bd Can. 29 : 333-336.

Nieto T.P., Toranzo A.E., Barja J.L., 1984. Comparaison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the north-west of Spain. Aquaculture. 42 : 193-206.

- Niven C.F., Jeffrey M.B., and Corlett D.A., 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine producing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **41**,1 : 321-322.
- Notevarp O., 1961. Recent findings in fatty acid composition of marine oils. in : Fish of Food Borgstrom. 1st Ed. Acad. Press. New-York. : 259-274.
- Ohashi E., Okamoto M., Ozawa A. and Fujita T., 1991. Characterization of common squid using several freshness indicators. J. Food Sci. **56**,1 : 161-163.
- Okuma H., Takahashi H., Yazawa S., Sekimukai S., and Watanabe E., 1992. Development of a system with double enzymz reactors for the determination of fish freshness. Anal. Chimica Acta **260** : 93-98.
- Okuzumi M., Horie S., Kimura M., Akahori M., and Kawamae M., 1973. 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. J. Food Hygien. Soc. Jap. **14** :81-89.
- Oteng-Gyang K., 1984. Intruduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. in : Technique et Documentation. Ed. Lavoisier, Paris.
- Owusu-Ansah Y.J. and Hultin H.O., 1987. Effect of in situ formaldehyde production on solubility and cross-linking of proteins of minced red hake muscle during frozen storage. J. Food Biochem. **11** : 17-39.
- Parkin K.L., Wells M.J., and Brown W.D., 1981. Modified atmosphere storage of rockfish fillets. J. Food Sci. **47** : 181-184.
- Peleteiro M.C., and Richards R.H., 1985. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish. Dis. **8** : 161-172.
- Perez-Villarreal B., and Pozo R., 1990. Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunga*). J. Food Sci. **55**,3 : 678-682.
- Proctor R.E., and Nickerson J.T.R., 1935. An investigation of the sterility of fish tissues. J. Bacteriol. **30** : 377.
- Rachidi A., Jana M., et Dalal A., 1995. Evaluation de l'état de fraîcheur des produits de la pêche. II. Intérêts et limites de l'examen bactériologique et chimique de poisson frais. Revue Méd. Vét. **146**, 7 : 485-490.
- Read L.J., 1968. Urea and trimethylamine oxide levels in elasmobranch embryos. Biol. Bull. **135** : 537-547.
- Reichelt J.L., and Baumann P., 1974. Effect of sodium chloride on growth of heterotrophic marine bacteria. Ach. Microbiol. **97** : 329-345
- Rice S.L., and Koehler P.E., 1976. Tyrosine and histidine decarboxylase activities of pediococcus cerevisiae and lactobacillus species and the production of tyramine in fermented sausages. J. Milk Food Technol. **39**,3 : 166-169.
- Rice T., Buck D.H., Gorden R.N., and Tazik P.P., 1984. Microbial pathogens and human parasites in an animal waste polyculture system. Prog. Fish-Cult. **46** : 230-238.
- Ringo E., Stenberg E., and Strom A., 1984. Amino acid and lactate catabolism in trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735. Appl. Environ. Microbiol. **47**,5 : 1084-1089.
- Ritchie A.H. and Mackie, I.M. 1980. The formation of diamines and polyamines during storage of mackerel (*Scomber scombus*). in : Advances in fish science and technology Connell J.J. Ed. Fishing News Books Ltd Farnham, England :489-494.
- Rodriguez-Ariza A., Diaz-Mendez F.M., Navas J.I. Pueyo C., Lopez-Barea J., 1995. Metabolic activation of cacinogenic aromatic amines by fish exposed to environmental pollutants. En. Mol. Mut. **25** : 50-57
- Roig-Sagues A.X., Hernandez-Herrero M., Lopez-Sabater E.I., Rodriguez-Jerez J.J., and Mora-Ventura M., 1996. Histidine decarboxylase activity of bacteria Isolated from raw and ripened Salchichón, a spanish cured sausage. J. Food. Protect. **59**, 5 : 516-520.

- Rossero A., De Brito M.D., et Jouve J.L., 1987. Appréciation rapide de la qualité microbiologique des viandes hachées par bio-luminescence ATP. Sci. Alim. 7 : 49-65.
- Ryser E.T., Taylor S.L., and Marth E.H., 1984. Amine production during associative growth of Gram-négative bacteria in tuna fish infusion broth. Syst. Appl. Microbiol. 5 : 545-554
- Sainclivier M., 1983. L'industrie alimentaire halieutique, vol. 1 : Le poisson matière première. Ed. Sciences Agronomiques E.N.S.A., Rennes.
- Sainclivier M., 1985. L'industrie alimentaire halieutique Vol 2 : Des techniques ancestrales à leurs réalisations contemporaines. Ed. Sciences Agronomiques E.N.S.A., Rennes.
- Sainclivier M., 1988. L'industrie alimentaire halieutique Vol 3 : La conservation par des moyens physiques. Ed. Sciences Agronomiques E.N.S.A., 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.
- Sakagushi M., and Kawai A., 1978. Psesence of b- and c-type cytochromes in the membrane of *Escherichia coli* induced by trimethylamine N-oxide. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 44 : 999-1002.
- Scott D.N., Fletcher G.C., Hogg M.G., and Ryder J.M., 1986. Comparison of whole with headed and gutted Orange Roughy stored in ice : sensory, microbiology and chemical assessment J. Food Sci. 51,1 : 79-83.
- Scott D.N., Fletcher G.C., Charles J.C., and Wong R.J., 1992. Spoilage changes in the deep water fish, smooth oreo dory during storage in ice. Int. J. Food Sci. Technol. 27 : 577-587.
- Sen N.P., Smith D.C., Schwinghammer L. and Howsam B., 1970. Formation of nitrosamines in nitrate heated fish. Can. Inst. Food Technol. J. 3 : 66.
- Shetty T.S. and Shetty T.M.R., 1990, Bacteriology of indian oil sardine (*Sardinella longiceps Valenciennes*) Stored in chilled sea water. Fish. Technol. 27, 2 : 141-144.
- Shewan J.M., 1949. Some bacteriological aspects of handling, processing and distribution of fish. J. Roy. Sanit. Inst. 59 : 349.
- Shewan J.M., 1961. The microbiology of sea-water fish. in : Fish as food. Borgstrom 1fst Ed. Fish and Food 1, Academic Press, New-York. : 487-560.
- Shewan J.M., 1962. The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. Recent Adv. Food Sci. 1 : 167-193.
- Shewan J.M., 1971. The microbiology of fish and fishery products - a progress report. J. Appl. Bacteriol. 34,2 : 299-315.
- Shewan J.M., 1976. The biochemistry and microbiology of low temperature spoilage. Food Technol. Austr. 409-410.
- 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. Ed. Tropical Products Inst., London : 51-57.
- Shewan J.M., and Murray C.K., 1979. The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrotrophiles. in : Cold-tolerant microbes in spoilage and the environment Ed. Académic Press Russel A.D. and Fuller R.. 117-136.
- Silvestro A., Pommier J., and Giordano GR., 1986. Molybdenum cofactor: a compound in the in vitro activation of both nitrate reductase and trimethylamine-N-oxide reductase activities in *Escherichia coli* K12. Biochim. Biophys. Acta 872 : 243-252

Silvestro A., Pommier J., Pascal. M.-C., and Giordano G., 1989. The inducible trimethylamine N-oxide reductase of *Escherichia coli* K12: its localization and inducers. Biochim. Biophys. Acta **999** : 208-216.

Simidu W., 1961. Non protein nitrogenous compounds. in : Fish as Food Borgstrom. Ed. Acad. Press. New York. 1 : 353-384.

Simidu U., Kaneko E., and Aiso K., 1969. Microflora of fresh and stored flatfish, *Kareius bicoloratus*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **35** : 77-82.

Simmonds C.K., and Lamprescht E.C., 1980. Spoilage patterns of wet and thawed frozen cape hake during chilled storage. in : Advances in fish science and technology. Ed. Connel J.J. Fishing News Books Ltd, Farnham, Surrey, England.

Skovgaard, N., 1979. Bacterial association of and metabolic activity in fish in north western Europe. Archiv. Lebensm. **30**, 106-109.

Smith P.B., Hancock G.A., and Rhoden D.L., 1969. Improved medium for detecting deoxyribonuclease producing bacteria. Appl. Microbiol. **18** : 991-993.

Smith M.A., and Davies P.J., 1985. Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. Plant Physiol. **78** : 89-91.

Somero G.N., 1986. From Dogfish to dogs : Trimethylamines protect proteins from urea. News in Physiol. Sci. **1** : 9-12

Sotelo C.G., Piñeiro C., and Pérez-Martin R.I., 1995. Denaturation of fish proteins during frozen storage role of formaldehyde. Z. Lebensm. Unters. Forsh **200** : 14-23.

Soudan F., Daknof A., Bazin J., Chapel G., Daspect G., et Seynave R., 1957. Appréciation de l'altération du poisson frais par un examen organoleptique systématique. Annal. Nut. Alim. **11** : 1-24.

Soudan F., Anquez H., et Babezit A., 1965. La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques. Ed. J.B. Baillière et fils Paris.

Spencer R., 1961. The bacteriology of distant water cod landed at hull. J. Appl. Microbiol. **24** : 4.

Spinelli J., 1971. Biochemical basis of fish freshness. Process Biochem. **6,5** : 3-6.

Stammen K., Gerdes D., and Caporasso F., 1990. Modified atmosphere packaging of seafood. Critical Rev. Food Sci. Nut. **29,5** : 301-331.

Stanby M.E., 1962. Proximate composition of fish. in : Fish in nutrition. Heen E., and Kreuzer R. Ed. Fishing News (Ltd) London for the F.A.O. : 50-60.

Stenberg E., Ringo E., and Strom A., 1984. Trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735: Na⁺-stimulated anaerobic transport in cells and membrane vesicles. Appl. Environ. Microbiol. **47,5** : 1090-1095.

Stenström I.M., 1985. Microbial flora of cod fillets (*Gadus morhua*) stored at 2°C in different mixtures of carbon dioxide and nitrogen/oxygen. J. Food. Protect. **48,7** : 585-589.

Stenström I.M. and Molin G., 1990. Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to *Shewanella putrefaciens*. J. Appl. Bacteriol. **68** : 601-618.

Stoknes I., Rustad T., and Mohr V., 1993. Comparative studies of the proteolytic activity of tissue extracts from cod (*Gadus morhua*) and herring (*Clupea harengus*). Comp. Biochem. Physiol. **106,3** : 613-619.

Streitfeld M.M., Hoffmann E.M., and Janklow H.M., 1962. Evaluation of extracellular deoxyribonuclease activity in *Pseudomonas*. J. Bacteriol. **84** : 77-80.

- Strom A.R., and Larsen H., 1979. Anaerobic fish spoilage by bacteria I. biochemical changes in herring extracts. J. Appl. Bacteriol. **46** : 531-543.
- Strom A.R., Olafsen J.A., and Larsen H., 1979. Trimethylamine oxide: a terminal electron acceptor in anaerobic respiration of bacteria. J. Gen. Microbiol. **112** : 315-320.
- Sugita H., Tsunohara M., Ohkoshi T., and Deguchi Y., 1988. The establishment of an intestinal microflora in developing goldfish (*Carassius auratus*) of culture ponds. Microbiol. Ecol. **15** : 333-344.
- 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. Austr. **36** : 328-329.
- Tabor H., and Tabor C.W., 1973. Quantitative determination of aliphatic diamines and polyamines by automated liquid chromatography procedure. Anal. Biochem. **55** : 457-467.
- Takagi M., Tsuchika T., and Ishimoto M., 1981. Proton translocation coupled to trimethylamine N-oxide reduction in anaerobically grown *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **148,3** : 762-768.
- Tapuhi Y., Miller N., and Karger B.L., 1981. Practical considerations in the chiral separation of Dns-amino acids by reversed-phase liquid chromatography using metal chelate additives. J. Chromatogr. **205** : 325-337.
- Tate III R.L., and Alexander M., 1976. Microbial formation and degradation of dimethylamine. Appl. Environ. Microbiol. **31,3** : 399-403.
- Tomassone R., Dervin C., et Masson J.P., 1993. Biométrie : modélisation de phénomènes biologiques. Ed. Masson, Paris.
- Tremolieres J., et coll.. 1980. Manuel d'alimentation humaine. II. in : Les aliments 8ème Ed. E.S.F. Paris. : 124-135.
- Tsuchiya T., 1961. Biochemistry of Fish oils. in : Fish as Food Borgstrom. Ed. Acad. Press. New-York. 1 : 211-258.
- Uden G., Trageser, and Duchêne A., 1990. Effect of positive redox potentials (> + 400 mV) on the expression of anaerobic respiratory enzymes in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **4** : 315-319.
- Unemoto T., Hayashi M., Miyaki K., and Hayashi M., 1965. Intracellular localization and properties of trimethylamine-N-oxide reductase in *Vibrio parahaemolyticus*. Biochim. Biophys. Acta **110** : 319-328.
- Vallé M., Malle P., and Bouquelet S., 1996. A new index of fish decomposition determined by liquid chromatography. A.O.A.C. Int. Accepted 15-03-96.
- 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. **1,6** : 53-61.
- Van Landschoot A., and De Ley J., 1983. Intra- and intergeneric similarities of the rRNA cistrons of *Alteromonas*, *Marinomonas* (gen. nov.) and some other Gram negative bacteria. J. Gen. Microbiol. **129** : 3057-3074.
- Van Spreekens K.J.A., 1974. The suitability of a modification of long and Hammer's medium for the enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products. Archiv. Lebensm. **10**, 213-219.
- Van Spreekens K.J.A., 1977. Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. **43**, 283-303.
- Vasundhara T.S., and Kumudavally K.V., 1989. Proteolytic and lipolytic degradation products as indicators for quality assessment of canned mutton curry. J. Food Sci. Technol. **26,6** : 314-317.
- Ward D.R., and Baj N.J., 1988. Factors affecting microbiological quality of seafoods. Food Technol. **42,3** : 85-89.

- Ward D.R., Larocco K.A., and Hopson D.J., 1986. Adenosine triphosphate bioluminescent assay to enumerate bacterial numbers on fresh fish. J. Food Protect. **49,8** : 647-650.
- Watson W.D., 1939. Studies of fish spoilage IV The bacterial reduction of trimethylamine oxide. J. Fish Res. Bd. Can. **4,4** : 252-266.
- Weil J.H., 1990. Biochimie générale. 6ème Ed. Masson.
- Williams D.J., Poole S.E., and Petroff M., 1991. Inosine and Hypoxanthine formation in tropical fish and its use in fish species differentiation. Food Austr. **43**, 500-503.
- Wood A.J., and Baird E.A., 1943. Reduction of trimethylamine oxide by bacteria 1. The Enterobacteriaceae. J. Fish Res. Bd. Can. **6,2** : 194-200.
- Wood G., and Hintz L., 1971. Lipid changes associated with degradation of fish tissue. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **54** : 1019-1023.
- Wood G., Hintz L., and Salwin H., 1969. Chemical alterations in fish tissue during storage at low temperatures. J. Ass. Off. Anal. Chem. **52** : 904-910.
- Wray S., and Wilkie D.R., 1995. The relationship between plasma urea levels and some muscle trimethylamine levels in *Xenopus laevis* : A31P and 14N nuclear magnetic resonance study. J. Exp. Biol. **198** : 373-378.
- Yamada K., 1967. Occurrence and origin of trimethylamine oxide in fishes and marine invertebrates. Bull. Soc. Sci. Fish. **33** : 591-603.
- Yamamoto I., and Ishimoto M., 1977. Anaerobic growth of *Escherichia coli* on formate, and trimethylamine N-oxide. Z. Allgem. Mikrobiol. **17** : 235-242.
- Yamamoto I., Okubo N., and Ishimoto M., 1986. Further characterization of trimethylamine N-oxide reductase from *Escherichia coli*, a molybdoenzyme. J. Biochem. **99** : 1773-1779.
- Yamanaka H., Shiomi K., and Kikuchi T., 1989. Cadaverine as a potential index for decomposition of salmonoid fishes. J. Food Hyg. Soc. Jap. **30,2** : 170-174.
- Yancey P.H., and Somero G.N., 1980. Methylamine osmoregulatory solutes of Elasmobranch fishes counteract urea inhibition of enzymes. J. Exp. Zool. **212** : 205-213.
- Ye R.W., Averill B.A., and Tiedje J.M., 1994. Denitrification : production and consumption of nitric oxide. Appl. Environ. Microbiol. **60** : 1053-1058.
- Ye R.W., Ka J.-O., Krishnapillai V., Zimmermann A., Baird C., Tiedje J.M., 1995. Anaerobic activation of entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an Analog of Fnr. J. Bacteriol. **177** : 3606-3609.
- Yoshimizu M., Kimura T., and Sakai M., 1980. Microflora of the embryo and fry of salmonids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **48** : 967-975.
- Zumft W.G., 1993. The biological role of nitric oxide in bacteria. Arch. Microbiol. **160** : 253-264.

ABBREVIATIONS

Abréviations

ABVT	: Azote basique volatil total
OTMA	: Oxyde de triméthylamine
TMA	: Triméthylamine
DMA	: Diméthylamine
P	: $(TMA/ABVT) \times 100$
I.F.	: Indice de fraîcheur
ATP	: Adénosine triphosphate
ADP	: Adénosine diphosphate
AMP	: Adénosine monophosphate
IMP	: Inosine monophosphate
HxR	: Inosine
Hx	: Hypoxanthine
PCA	: Milieu Plate Count Agar
TSA	: Milieu Tryptone Soja Agar
Milieu H ₂ S	: Milieu de Lingby au fer
Flore H ₂ S	: Flore capable de produire de l'hydrogène sulfuré
cv	: cristal violet
C.L.H.P.	: Chromatographie liquide à haute performance
Test-F	: Test de Fisher
Test-t	: Test de Student
d.d.l.	: degré de liberté
u.f.c./g	: unité formant colonie par gramme
A.B.R.	: Acitivité bactérienne de réduction de l'OTMA
I.A.	: Indice d'amines
K	: indice proposé par Saito et coll., 1959 (p.165)
K'	: indice proposé par Jones et Murray, 1964 (p. 165)
H	: indice proposé par Luong et coll., 1992 (p. 165)
G.A.L.	: Groupements aminés libres
I.G.L.	: Indice de groupements libres

