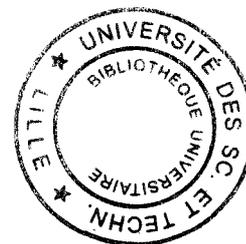


N° d'ordre :

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE

THESE

présentée par



Guillaume DUFLOS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPECIALITE : BIOCHIMIE

Recherche de marqueurs chimiques précoces et mise
au point de techniques pour l'évaluation de l'altération du
tissu musculaire de poissons marins.

Soutenue le 13 octobre 1999 devant la commission d'examen :

M. S. BOUQUELET	Professeur à l'U.S.T. Lille	Président
M. M. MOREL	Directeur du centre IFREMER Boulogne sur Mer	Rapporteur
M. JM. FREMY	Directeur de recherches à l'AFSSA Paris	Rapporteur
Mme. C. DERVIN	Chargée de recherches à l'INRA Paris	Examineur
M. J. LEMOINE	Maître de conférences à l'U.S.T. Lille	Examineur
M. P. MALLE	Directeur de l'AFSSA Boulogne sur Mer	Examineur

*A Nathalie,
à mes parents.*

Ce travail a été réalisé à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments de Boulogne sur mer (AFSSA, ex CNEVA) et au laboratoire de chimie biologique (UMR 111) de Villeneuve d'Ascq.

Cette thèse a été cofinancée par le Conseil Régional du Nord-Pas de Calais et par l'AFSSA.

Ce travail a été réalisé sous la codirection du Dr Pierre Malé, directeur de l'AFSSA Boulogne sur mer et du Professeur Stéphane Bouquet. Je tiens particulièrement à les remercier pour leurs conseils, leur confiance, leur disponibilité et les moyens qu'ils ont mis à ma disposition.

J'exprime mes plus vifs remerciements au Conseil Régional Nord-Pas de Calais et à l'AFSSA qui ont cofinancé cette thèse.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury de l'honneur qu'il me font en acceptant de juger ce travail.

Mes remerciements vont aussi à Mademoiselle Cécile Laהלlec, directeur du département hygiène et qualité des aliments de l'AFSSA et à Monsieur Jacques Lapate, directeur scientifique du CNEVA.

Je tiens aussi à remercier Philippe Timmerman et Yves Luoy du laboratoire de chimie biologique pour leur aide en GC/MS mais aussi Catherine Durin de l'INRA pour ses conseils et son travail en statistique.

Je me souviens par ailleurs de l'abolition de l'AFSSA
de Boulogne sur mer et surtout Guennade DUPHIN à qui je
souhaite bon vent pour sa thèse

Un petit clin d'œil à tous mes amis pour leurs
encouragements ininterrompus.

Je m'efforce surtout pas mes parents qui ont toujours
été en mer et m'ont toujours soutenu depuis toutes ces années,
un grand merci.

Pathologie, sans toi, je n'aurais pu pu réaliser toute ce
travail. Ce n'est pas un aboutissement personnel mais plutôt de
couple dans notre cas. Tu es au me motive, me rassure et
m'accompagne durant ces trois ans. Que tu trouves dans ce
quelques lignes et dans cet ouvrage tout mon respect et
cette thèse est aussi la tienne.

PUBLICATIONS

Atia N., Camoin L., **Duflos G.**, Michalski JC., Weill B. (1998) Human preformed IgG combining with membrane-bound porcine serotransferrin lyse porcine endothelial cells through antibody-dependant cellular cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 3917-3928.

Duflos G., Dervin C., Malle P., Bouquelet S. (1999) Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in Plaice and whiting. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **82 (5)**, 1-5.

Duflos G., Dervin C., Malle P., Bouquelet S. (1999) Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice and whiting. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, in press.

COMMUNICATION ORALE

Duflos G., Malle P. Marqueurs d'altération-conséquence en santé publique. Colloque de la Commission internationale des industries Agro-alimentaires : Produits de la pêche maîtrise de l'hygiène et de la sécurité. Paris, 13-14 Octobre 1998.

COMMUNICATIONS ECRITES

Vallé M., Duflos G., Malle P. Relevance of biogenic amines to evaluation of fish decomposition. Nantes, 12-14 novembre, 1997.

Duflos G., Vallé M., Malle P. Evaluation biochimique de l'altération du poisson. Direction Générale de l'alimentation, aliment demain. Paris, 21-22 octobre 1997.

SOMMAIRE
INDEX TABLEAUX ET
FIGURES
ABREVIATIONS

SOMMAIRE

Index des figures et des tableaux	14
Abréviations	16
Introduction	17
Généralités	
1. IMPORTANCE ÉCONOMIQUE DU POISSON	20
1.1. Le poisson et le commerce extérieur	20
1.2. Boulogne sur mer, importance économique régionale	21
1.3. La maîtrise de la qualité, facteur économique	22
2. CLASSIFICATION	23
2.1. Classification phylogénique	24
2.1.1. Les poissons cartilagineux (Sélaciens)	
2.1.2. Les poissons osseux (Téléostéens)	
2.2. Classification chimique	27
3. COMPOSITION CHIMIQUE DU POISSON	28
3.1. Les lipides	28
3.1.1. Les acides gras:	
3.1.2. Les acides gras ω -3	
3.1.3. Les lipides complexes	
3.2. Les glucides	30
3.3. Les protéines	31
3.3.1. Protéines intracellulaires	
3.3.2. Protéines extracellulaires	
3.4. Les composés azotés non protéiques	35
3.4.1. Les amines biogènes	
3.4.2. Les dérivés nucléotidiques	

3.4.3.	L'OTMA et la TMA	
3.4.4.	L'urée	
3.4.5.	L'ammoniac	
3.5.	Les composés volatils	46
3.5.1.	Approche olfactive	
3.5.2.	Approche technique	
3.5.3.	Approche méthodologique	
3.6.	L'eau	58
3.7.	Les vitamines	59
3.8.	Les minéraux	59
4.	LA FLORE DU POISSON	60
4.1.	Origine et localisation	60
4.2.	Composition de la flore	61
5.	LES MODIFICATIONS POST-MORTEM DU POISSON	62
5.1.	Evolution au niveau biochimique	62
5.2.	Evolution de la flore	62
6.	LES MODES DE CONSERVATION	64
6.1.	La température	64
6.1.1.	Le froid	
6.1.2.	Le chauffage	
6.2.	Les agent chimiques	65
6.2.1.	Le salage	
6.2.2.	Le fumage	
6.2.3.	Les phosphates et polyphosphates	
6.2.4.	Les nitrates et les nitrites	
6.2.5.	Les conservateurs autorisés	
6.3.	Le conditionnement	68
6.4.	L'ionisation	69
7.	LES FACTEURS DE DÉGRADATION EXTÉRIEURS AU POISSON	69
7.1.	La pêche	69
7.2.	La transformation des produits	70
7.3.	L'eau	70
7.4.	Le transport	71
8.	CARACTERISATION DE LA FRAICHEUR	71

8.1. Les méthodes sensorielles (Indice de fraîcheur)	71
8.2. Les méthodes microbiologiques	73
8.3. Les méthodes chimiques	74
8.4. Les méthodes physiques	75

Matériels et méthodes

1. DÉRIVES NUCLÉOTIDIQUES	78
1.1. Solutions	
1.2. Matériels	
1.3. Méthodes	
2. DOSAGE DU COLLAGÈNE	79
2.1. PAR DIGESTION ENZYMATIQUE PAR LA PAPAÏNE	79
2.1.1. Réactifs	
2.1.2. Matériels	
2.1.3. Protocole	
2.2. PAR DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE	80
2.2.1. Réactifs	
2.2.2. Matériels	
2.2.3. Protocole	
3. AZOTE BASIQUE VOLATIL TOTAL (ABVT) ET TMA	82
3.1. Matériel	
3.2. Méthodes	
4. AMINES BIOGÈNES	83
4.1. Solutions	
4.2. Matériel	
4.3. Méthode	
4.4. Gradient	
4.5. Test organoleptiques	
4.6. Outil informatique	
5. COMPOSÉS VOLATILS	87

5.1. Chromatographie gazeuse	
5.1.1. Matériel	
5.1.2. Méthode	
5.2. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	88

Résultats

1^{ère} partie : les dérivés nucléotidiques

1. ETUDE SUR DES SOLUTIONS STANDARDS	91
1.1. Identification des différents témoins	92
1.2. Variation du débit de tampon	93
1.3. Variation du pourcentage en acétonitrile	93
1.4. Essais de gradient en acétonitrile	94
1.5. Variation de la température au niveau de la colonne	95
1.6. Variation du pH du tampon	96
1.7. Protocole et conditions retenus	97
2. DÉTERMINATION DES DROITES DE RÉGRESSION	99
2.1. Méthode utilisée	
2.2. Droites de régressions	
3. ANALYSE D'ÉCHANTILLONS	100
3.1. Dosage des dérivés nucléotidiques	
3.2. Analyses et interprétations	
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	104

2^{ème} partie : les dérivés protéiques

1. LE COLLAGENE	105
1.1. Gamme étalon	105
1.2. Essais de protocole et mise au point de la méthode	106
1.3. Essais préliminaires	108
1.3.1. Etude de la reproductibilité	
1.3.2. Etude préliminaire de l'évolution de l'hydroxyproline dans le muscle du Tacaud	
1.4. Suivi d'altération sur du Tacaud frais	109
1.5. Conclusion	110
2. LES AMINES BIOGÈNES	111
2.1. Dosage de solutions standards d'amines, étude de la réactivité	111
2.2. Détermination des droites de régression des amines en solution	113
2.3. Détermination des droites de régression dans un échantillon de poisson	115
2.3.1. Considération des particularités du substrat et minimisation de "l'effet matrice"	
2.3.2. Méthodologie des ajouts dosés	
2.3.3. Reproductibilité analytique	
2.4. Comparaison des droites étalons obtenues sur solutions standards et par ajouts dosés	119
2.5. Evolution des droites de régression en fonction de l'altération et de l'espèce	121
2.6. Droites de régression globales	124
2.7. Conclusion préliminaire	124
2.8. Utilisation des amines biogènes dans la détermination d'un indice de qualité sur du merlan et du carrelet	125
2.8.1. Plan d'échantillonnage	
2.8.2. Détermination de l'indice d'amines	
2.8.3. Indice de fraîcheur, effet notateur	
2.8.4. Evolution de l'indice (IA') en fonction de l'indice de fraîcheur (IF)	
2.9. Application : dosage des amines biogènes dans la farine de poisson	134
2.9.1. Dosage de l'agmatine	
2.9.2. Droites de régressions des amines biogènes dans la farine	
2.10. Conclusion	137
2.11. Perspectives	138

3^{ème} partie : les composés volatils

1. CARACTÉRISATION DU DOSAGE D'ABVT PAR GC ET GC-MS	139
1.1. Analyse par chromatographie de phase gazeuse	140
1.2. Identifications par spectrométrie de masse	141
1.3. Conclusion	142
2. COMPARAISONS DE DIFFÉRENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION	142
2.1. Application directe du système HS sur de la chair	143
2.1.1. Conclusion sur l'application directe du système HS	
2.2. Distillation sous vide	145
2.2.1. Etude préliminaire sur du cabillaud	
2.2.2. Etude sur du maquereau	
2.2.3. Etude sur du hareng	
2.2.4. Conclusion sur la distillation sous vide	
2.3. Utilisation de sacs stomacher	151
2.4. Extraction à partir de solvants	152
2.5. Application directe du système SPME sur de la chair	154
2.5.1. Etude préliminaire sur du lieu noir	
2.5.2. Etude sur du cabillaud et du merlan	
2.6. Conclusion intermédiaire sur la comparaison des méthodes d'extraction	162
3. RECUPÉRATION EN SPME	163
3.1. Protocole de récupération	163
3.2. Chromatogramme référence	164
3.3. Identifications par spectrométrie de masse	166
3.4. Conclusion intermédiaire sur la SPME	169
4. EXTRACTION PAR LE DICHLOROMÉTHANE	170
4.1. Protocole d'extraction	170
4.2. Mise au point du solvant	171
4.3. Matériel	172
4.4. Echantillonnage	173
4.5. Applications du protocole 2	173
4.5.1. Séparation sur la colonne LMW amine	
4.5.2. Séparation sur la colonne SPB-1	
4.5.3. Conclusion intermédiaire	

4.6. Identifications par spectrométrie de masse	176
4.6.1. Chromatogramme référence	
4.6.2. Analyses en spectrométrie de masse	
4.7. Recherche d'un étalon interne	182
4.7.1. Essais préliminaires	
4.7.2. Détermination de la quantité d'Ehtylcaprylate	
4.7.3. Utilisation de l'éthylcaprylate dans un échantillon	
4.8. Optimisation du protocole 2	185
4.8.1. Echantillon	
4.8.2. Temps de contact avec le dichlorométhane	
4.8.3. Temps de broyage	
4.8.4. Concentration en sel	
4.8.5. Volume de dichlorométhane	
4.9. Applications	190
4.10. Comparaison entre la SPME et l'extraction au dichlorométhane - conclusion	192

Conclusion	195
-------------------	------------

Bibliographie	199
----------------------	------------

Annexes	211
----------------	------------

INDEX TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Commerce extérieur des produits de la pêche.	20
<u>Tableau 2</u> : Composition moyenne du muscle de poisson en %.	27
<u>Tableau 3</u> : Composition moyenne du muscle de poisson en % pour différentes espèces.	27
<u>Tableau 4</u> : Composants protéiques du tissu musculaire du poisson.	31
<u>Tableau 5</u> : Les cinq principaux types de collagène.	33
<u>Tableau 6</u> : Identification et caractérisation de composés volatils issus de poissons.	48
<u>Tableau 7</u> : Composition en vitamines pour le cabillaud, le hareng et pour le bœuf sur 100g de chair.	59
<u>Tableau 8</u> : Composition en minéraux (ppm) de la chair de quelques poissons.	59
<u>Tableau 9</u> : Evolution de la flore de la peau de cabillaud (<i>Gadus morhua</i>) conservé sous glace.	63
<u>Tableau 10</u> : Liste des conservateurs autorisés dans les produits de la pêche.	68
<u>Tableau 11</u> : Extrait du règlement n° 2406/96 du conseil du 26 novembre 1996.	72
<u>Tableau 12</u> : Valeur seuils de référence de l'ABVT en mg pour 100 g de muscle.	75
<u>Tableau 13</u> : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques.	92
<u>Tableau 14</u> : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction du débit.	93
<u>Tableau 15</u> : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction de gradients isocratiques.	93
<u>Tableau 16</u> : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques à 1,5% d'acétonitrile.	94
<u>Tableau 17</u> : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction du gradient.	95
<u>Tableau 18</u> : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction du gradient.	95
<u>Tableau 19</u> : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction de la température.	96
<u>Tableau 20</u> : Coefficients des droites de régression des dérivés nucléotidiques.	100
<u>Tableau 21</u> : Evolution des dérivés nucléotidiques de la chair de hareng.	101
<u>Tableau 22</u> : Gamme étalon de l'hydroxyproline.	106
<u>Tableau 23</u> : Etude de la reproductibilité.	108
<u>Tableau 24</u> : Résultats d'analyse sur du tacaud à trois niveaux d'altération(J+1, J+3, J+8).	109
<u>Tableau 25</u> : Dosage de l'hydroxyproline au cours d'un suivi d'altération tacaud.	110
<u>Tableau 26</u> : Etude des temps de rétention et des rapports de pics des amines placées seules ou en mélange.	112
<u>Tableau 27</u> : Conditions de préparation des solutions d'amines biogènes.	114
<u>Tableau 28</u> : Estimation des différents paramètres.	114
<u>Tableau 29</u> : Etude de la reproductibilité des dosages.	119
<u>Tableau 30</u> : Variation des pentes des droites de régression en fonction de la nature du substrat.	120
<u>Tableau 31</u> : Evolution du coefficient directeur au cours de l'altération du merlan et du carrelet.	122
<u>Tableau 32</u> : Coefficients directeurs globaux (déterminés à trois niveaux d'altération).	124
<u>Tableau 33</u> : Valeurs de l'indice d'amine et de l'indice de fraîcheur de deux échantillons de poisson.	131
<u>Tableau 34</u> : Coefficients directeurs utilisés pour la farine de poisson.	136
<u>Tableau 35</u> : Identification des composés de l'ABVT en spectrométrie de masse.	141
<u>Tableau 36</u> : Séparation par chromatographie gazeuse sur de la chair de poisson.	144
<u>Tableau 37</u> : Séparation par chromatographie gazeuse des fractions de solution mère avant distillation sous vide.	146
<u>Tableau 38</u> : Séparation par chromatographie gazeuse des fractions de distillat après distillation sous vide.	147
<u>Tableau 39</u> : Importance de la concentration en NaOH et en NaCl pour la séparation par chromatographie gazeuse.	149
<u>Tableau 40</u> : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de cabillaud.	151
<u>Tableau 41</u> : Séparation par chromatographie gazeuse d'échantillons de cabillaud par SPME.	156
<u>Tableau 42</u> : Séparation par chromatographie gazeuse d'échantillons de merlan par SPME.	161
<u>Tableau 43</u> : Identification par spectrométrie de masse des composés extraits par le SPME.	167
<u>Tableau 44</u> : Identification par spectrométrie de masse des composés extraits par le dichlorométhane.	179
<u>Tableau 45</u> : Temps de rétention de différents produits sur SPB-1.	182

Tableau 46 : Détermination de la quantité d'éthylcaprylate.	184
Tableau 47 : Répartition échantillon / eau (p/p).	186
Tableau 48 : Détermination du temps optimal de broyage.	187
Tableau 49 : Détermination du temps optimal d'extraction.	188

INDEX FIGURES

Figure 1 : Evolution du prix moyen du kilogramme de poisson.	21
Figure 2 : Evolution des quantités de poisson débarquées au port de Boulogne/mer.	22
Figure 3 : Voies de formation des différentes amines biogènes à partir des protéines.	37
Figure 4 : Réduction de l'OTMA en TMA.	44
Figure 5 : Différentes voies de dégradation de la TMA par Meiberg et Harder.	45
Figure 6 a : Réaction de la lipoxigénase sur l'acide eicosapentanoïque.	49
Figure 6 b : Réaction d'autooxydation sur l'acide eicosapentanoïque.	49
Figure 7 : Réaction de rétroaldolisation sur des acides gras insaturés.	50
Figure 8 : Localisation de la flore sur le poisson par ordre d'importance.	61
Figure 9 : Représentation schématique du système de prélèvement des composés volatils.	88
Figure 10 : Les différentes parties d'un spectromètre de masse couplé à la chromatographie gazeuse.	89
Figure 11 : Schéma d'une source par impact électronique.	90
Figure 12 : Chromatogramme à pH 4,6.	98
Figure 13 : Chromatogramme à pH 6.	98
Figure 14 : Chromatogramme à pH 6.	98
Figure 15 : Evolution de l'IMP et de l'inosine au cours d'un suivi d'altération de hareng.	102
Figure 16 : Evolution des rapports H et K' au cours d'un suivi d'altération de hareng.	103
Figure 17 : Schématisation du mode opératoire du dosage des amines biogènes par ajouts dosés.	117
Figure 18 : Utilisation des droites d'ajouts dosés comme étalons.	118
Figure 19 : Représentation des opérations de traitement des échantillons.	126
Figure 20 : Représentation des droites de régression relatives au carrelet pour les notateurs 2*, 3 ● et 4 ◇.	129
Figure 21 : Représentation des droites de régression relatives au merlan pour les notateurs 2*, 3 ● et 4 ◇.	130
Figure 22 : Représentation de l'indice d'amine (IA') en fonction de l'indice de fraîcheur (IF), pour deux espèces de poisson.	132
Figure 23 : Evolution de l'IF en fonction de l'IA' au cours de l'altération du merlan + et du carrelet ●.	133
Figure 24 : Chromatogramme d'identification de l'agmatine.	135
Figure 25 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un extrait de distillat d'ABVT.	140
Figure 26 : Séparation par chromatographie gazeuse de la fraction d2 avec de la soude.	148
Figure 27 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de hareng.	150
Figure 28 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de poisson.	153
Figure 29 : Séparation par chromatographie gazeuse du témoin toluène.	153
Figure 30 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de lieu noir par SPME.	155
Figure 31 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de cabillaud J+1 par SPME.	157
Figure 32 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de cabillaud J+7 par SPME.	158
Figure 33 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan J+1 par SPME.	159
Figure 34 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan J+7 par SPME.	159
Figure 35 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan par SPME	
Partie I.	164
Figure 36 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan par SPME	
Partie II.	165
Figure 37 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan par SPME	
Partie III.	165

<u>Figure 38</u> : Analyse par chromatographie gazeuse du dichlorométhane utilisant le protocole 2.	171
<u>Figure 39</u> : Analyse par chromatographie gazeuse du dichlorométhane distillé utilisant le protocole 2.	172
<u>Figure 40</u> : Analyse par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan utilisant le protocole 2 avec la colonne LMW amine.	174
<u>Figure 41</u> : Analyse par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan utilisant le protocole 2 avec la colonne SPB-1.	175
<u>Figure 42</u> : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan après extraction au dichlorométhane. Partie I.	176
<u>Figure 43</u> : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan après extraction au dichlorométhane. Partie II.	177
<u>Figure 44</u> : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan après extraction au dichlorométhane. Partie III.	177
<u>Figure 45</u> : Analyse par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan avec l'étalon interne.	184
<u>Figure 46</u> : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de cabillaud après extraction au dichlorométhane.	191
<u>Figure 47</u> : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de hareng après extraction au dichlorométhane.	191

ABREVIATIONS

ABVT : Azote Basique Volatil Total
ADP : Adénosine DiPhosphate
AMP : Adénosine MonoPhosphate
ATP : Adénosine TriPhosphate
Cad. : cadavérine
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
DO : Densité Optique
EC : Ethylcaprylate
GMP : Guanosine MonoPhosphate
GC : Chromatographie de phase Gaz
GC-MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point
Hist. : histamine
Hx : hypoxanthine
HxR : inosine
IA' : Indice d'amine
IF : Indice de Fraîcheur
IMP : Inosine MonoPhosphate
MA : MéthylAmine
OH-Pro : hydroxyproline
Put. : putrescine
qsp : Quantité Suffisante Pour
Spd : spermidine
Spm : spermine
SPME : Solid Phase Micro-Extraction
TMA : TriMéthylAmine
Tyr. : tyramine
ufc : unité formant colonie
v/v : volume à volume

INTRODUCTION

Il y a quelques décennies, «le poisson du vendredi » avait encore dans l'esprit du consommateur une connotation de privation. Les comportements ont profondément évolué, et depuis quelques années le poisson a acquis l'image d'un aliment à la fois noble et sain. Pour conforter cette image sur une denrée particulièrement altérable, la fraîcheur ne peut en aucun cas être quelconque, c'est ainsi que s'est développé le besoin d'outils objectifs permettant de la mesurer. La nécessité de disposer de méthodes performantes d'analyses s'est présentée dans le domaine de la transformation où le choix des matières premières est essentiel. Dans la filière pêche, la qualité qui était surtout à l'origine une préoccupation de scientifiques ou d'inspecteurs vétérinaires est aujourd'hui la préoccupation de celui qui produit, de celui qui commerce et de celui qui consomme. Les travaux développés dans cette thèse et dans la thématique de l'AFSSA Boulogne sur mer s'inscrivent dans cette démarche qui fait de la qualité un objectif stratégique pour la filière.

Pour répondre à cette attente, les recherches se sont orientées vers des méthodes sensorielles, microbiologiques et chimiques pour caractériser la fraîcheur. Les deux premières ont pu montrer leurs limites et c'est tout naturellement que nous nous sommes tournés vers la recherche de marqueurs chimiques précoces. Pour cela, nous nous intéressons à différents types de molécules (protéines, dérivés nucléotidiques et composés volatils) qui pourraient évoluer significativement avec l'altération du tissu musculaire du poisson.

La recherche de marqueurs chimiques précoces nous a conduit à aborder ces trois familles de molécules :

- *tout d'abord les amines biogènes en approfondissant la technique de dosage par CLHP afin de déterminer les possibilités d'applications de cette méthode,*
- *les dérivés nucléotidiques de l'ATP en mettant au point une méthode de séparation et de quantification par CLHP,*
- *enfin les composés volatils par la mise en place d'une méthodologie de récupération et de séparation permettant d'étudier l'évolution de ces produits au cours de l'altération.*

Ces trois sujets sont présentés de manière indépendante compte tenu des techniques différentes permettant de les détecter et de les doser.

Dans les résultats, la quasi-totalité des démarches qui ont été engagées est présentée, ce qui permet d'avoir une vision globale de la problématique et de disposer des éléments nécessaires pour suivre et critiquer les orientations scientifiques décidées.

GENERALITES

1. IMPORTANCE ECONOMIQUE DU POISSON :

1.1. Le poisson et le commerce extérieur :

Toutes les récoltes de poissons ne sont pas destinées au seul marché français. En effet nous ne consommons pas tout, une partie des produits est destinée à l'exportation mais la France en importe également. Le tableau 1 ci-dessous présente les chiffres des importations et exportations des produits de la mer en 1997.

Tableau 1 : Commerce extérieur des produits de la pêche (Tarin, 1999).

	EXPORTATIONS				IMPORTATIONS			
	volume	valeur	volume	valeur	volume	valeur	volume	valeur
Poissons	275698	3719	-3%	+18%	452390	8426	-3%	+10%
Crustacés, mollusques	47469	1423	+16%	+40%	173301	5042	+4%	+11%
Préparations conserves	53870	1195	+16%	+27%	174994	4068	-5%	+3%
Total		6336		+24%		17536		9%

Volumes en tonnes, valeurs en millions de francs et évolution 1997 par rapport à 1996 en %.

On peut ajouter quelques commentaires et quelques précisions à ces valeurs. En 1997, les exportations ont connu une progression de 24% avec un chiffre d'affaire de 6,4 milliards de francs et les importations une progression de 9% pour un montant de 17,5 milliards de francs (déficit de la balance commerciale 11,1 milliards de francs). On peut illustrer ceci avec l'exemple de Boulogne sur mer, dont la position de plus grand centre européen de transformation des produits de la pêche nécessite d'importer beaucoup de produits. Pour les exportations, les poissons entiers constituent à eux seul 50,2% du marché avec une prédominance pour le thon, la sole et l'anchois. Les clients privilégiés sont surtout l'Espagne

avec l'anchois et le merlu, l'Italie avec la sole mais aussi la Belgique et le Luxembourg. Par contre, les principaux fournisseurs de la France sont le Royaume-Uni avec le saumon et la Norvège avec le saumon mais aussi avec le cabillaud.

1.2. Boulogne sur mer, importance économique régionale :

Depuis de nombreuses années, le port de Boulogne sur mer est non seulement le premier port de pêche français mais aussi le premier centre de transformation au niveau européen par ses nombreuses activités et sa position géographique. On peut citer deux chiffres très significatifs pour la région Nord - Pas de Calais : **7 000 personnes** ont une activité directement liée à la pêche et **14 000 emplois** sont induits.

Depuis quelques années, l'activité de Boulogne sur mer se modifie et évolue. Les quantités pêchées diminuent progressivement mais la valeur ajoutée des produits augmente, ce qui est illustré par les figures ci-dessous.

Figure 1 : Evolution du prix moyen du kilogramme de poisson (Chégaray, 1999).

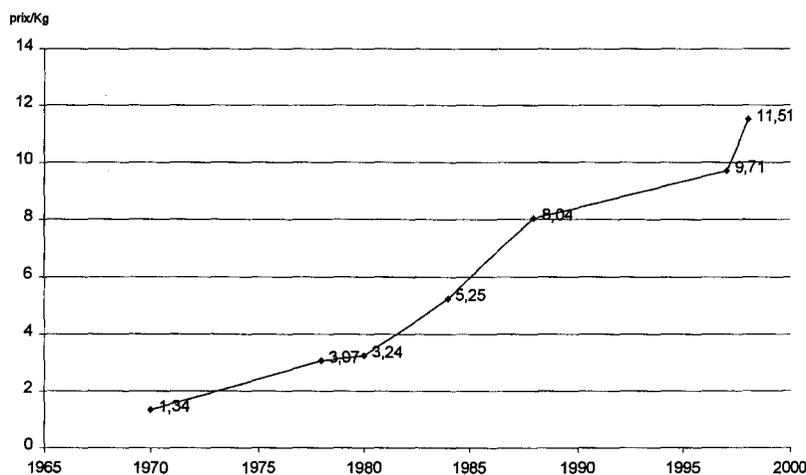
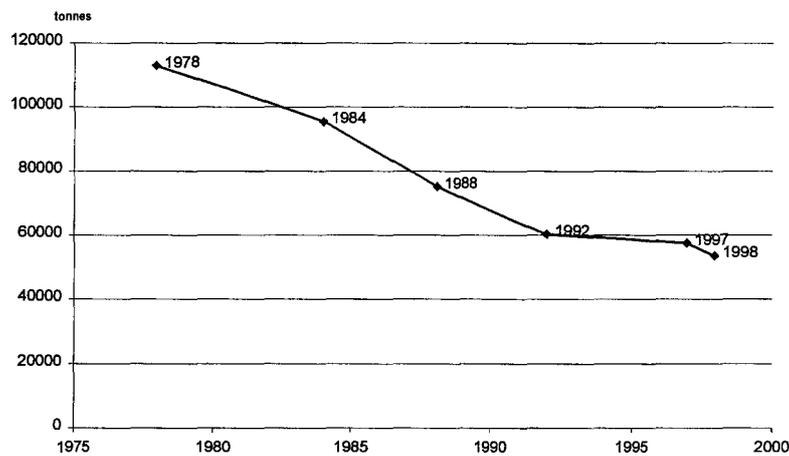


Figure 2 : Evolution des quantités débarquées au port de Boulogne sur mer (Chégaray, 1999).

On peut analyser facilement les figures 1 et 2 ci-dessus en donnant le chiffre d'affaire de 1978, 347 millions de francs et celui de 1998, 615 millions de francs. On comprend bien que la baisse des quantités pêchées n'affecte pas beaucoup l'économie locale mais lui impose une adaptation (il faut signaler toutefois que les chiffres ne tiennent pas compte de l'inflation). De plus, on peut souligner aussi comme autre évolution depuis juin 1997, l'apparition de bases de pêche avancées en mer du Nord car les zones de pêche se trouvent de plus en plus éloignées.

1.3. La maîtrise de la qualité, facteur économique :

Les chapitres 1.1 et 1.2 montrent bien l'évolution du marché du poisson avec une orientation vers des produits de meilleure qualité qui ont une valeur ajoutée plus importante. On peut proposer plusieurs raisons de rechercher des marqueurs d'altération visant à caractériser la fraîcheur et la qualité du poisson :

- Avec l'augmentation croissante du prix du poisson au kilogramme, les professionnels ont besoin de maîtriser de plus en plus la qualité de leurs produits et surtout de la caractériser.

- Aussi, les échanges commerciaux se font de plus en plus à distance. Il est donc nécessaire de pouvoir préciser le niveau de qualité sur des bases objectives à des fins de négociations commerciales.

- Enfin, les produits destinés à la transformation doivent répondre à des cahiers des charges de plus en plus stricts et contraignants.

L'intérêt d'avoir des marqueurs chimiques précis et reconnus apparaît de plus en plus évident et indispensable au vu de ces trois exemples.

2. CLASSIFICATION :

Le poisson, ou plutôt les poissons sont des animaux regroupés sous la même appellation mais pouvant être très différents selon :

- leur milieu de vie : poissons de mer ou d'eau douce.
- leur constitution : poissons cartilagineux (Sélaciens) ou osseux (Téléostéens).

On peut noter aussi des différences relatives à leur composition chimique qui dépend de leur état physiologique (période de reproduction, jeûne...), ou relatives à leur flore qui diffère entre les poissons des mers chaudes et ceux des mers froides. Il est nécessaire de présenter et de préciser un peu la complexité du substrat sur lequel tout ce travail va s'appuyer.

Ne seront traités dans cette partie que les poissons de mer.

Comme il a été souligné précédemment, il est intéressant de pouvoir situer l'importance de ces groupes pour pouvoir a posteriori mieux la percevoir et la comprendre. On peut citer, pour mieux se rendre compte de la disparité des espèces regroupées sous la même appellation de poisson, le Professeur Collignon : *«Il ne faut pas oublier que requins et Téléostéens sont aussi éloignés zoologiquement qu'un reptile l'est d'un mammifère et que Clupéidés et thons sont aussi différents les uns des autres que porcs et chiens sont dissemblables».*

2.1. Classification phylogénique :**2.1.1. Les poissons cartilagineux (Sélaciens) :**

GROUPES	FAMILLES	ESPECES
Requins	Scyliorhinidés	Petite roussette
		Grande roussette
	Mustelidés	Emissole
		Carcharhinidés
Raies	Squalidés	Aiguillat
		Raie bouclée
	Raie brunette	
	Raie papillon	
	Raie ponctiée	
	Raie étoilée	

2.1.2. Les poissons osseux (Téléostéens) :**2.1.2.1. Les poissons osseux jugulaires :**

FAMILLES	ESPECES	
Lophiidés	Baudroie	
Trachinidés	Grande vive	
	Petite vive	
Pleuronectidés	Turbot	
	Barbue	
	Fausse limande	
	Cardine	
	Limande – sole	
	Limande	
	Flet	
	Plie ou carrelet	
	Flétant	
	Sole	
	Gadidés	Eglefin
		Cabillaud
		Capelan
Lieu		
Merlan		
Merlu		
Lingue		
Mostelle		
Motelle		
Brosme		

2.1.2.2. Les poissons osseux abdominaux :

FAMILLES	ESPECES
Engraulidés	Anchois
Clupéidés	Sardine
	Alose
	Hareng
	Sprat
Scombrocidés	Orphie
Salmonidés	Eperlan
	Saumon
Athérinidés	Athérine
Mugilidés	Mulet

2.1.2.3. Les poissons osseux apodes :

FAMILLES	ESPECES
Congridés	Congre
Anguillidés	Anguille
Murénidés	Murène
Anarhichadidés	Poisson loup
Ammodytidés	Langon
	Equille

2.1.2.4. Les poissons osseux thoraciques :

FAMILLES	ESPECES
Bérycidés	Béryx
Zeidés	Saint-pierre
Mulidés	Rouget
Ammodytidés	Lançon
	Equille
Labridés	Vieille
	Coquette
	Crénilabre
	Girelle
Scorpénidés	Rascasse
Sparidés	Dorade
	Pagre
	Denté
	Acarné
	Pageot
	Marbré
	Bogue
	Saupe
	Oblade
	Puntazzo
	Sargue
	Sparaillon
Serranidés	Bar
	Mérou
	Serrans
Carangidés	Chinchard
	Liches
Scienidés	Ombrine
	Courbine
	Corb
Triglidés	Grondins
	Malarmat
Scombridés	Pélamide
	Palomète
	Maquereau
	Thonine
	Listao
	Germon
	Albacore
	Patudo
	Thon

2.2. Classification chimique :

Au vu des différences phylogéniques, on peut proposer un autre type de classification basé sur la composition chimique propre du poisson (tableau 2).

Tableau 2 : Composition moyenne du muscle de poisson en % (Jacquot, 1961 ; Stanby, 1962 ; Murray, 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

De nombreux facteurs peuvent faire varier de manière importante, les teneurs citées ci-dessus, les différences entre espèces, les différences anatomiques (taille, sexe...), mais aussi les variations physiologiques, les modifications alimentaires et les saisons. En effet, le tableau 3 ci-dessous permet de constater des variations de composition qui sont propres aux différentes espèces.

Tableau 3 : Composition moyenne du muscle de poisson en % pour différentes espèces (Legrand, 1981).

Poisson	Eau	Protéines	Lipides	Cendres
Eglefin	81	18,5	0,2	1,5
Hareng	69	17,5	11,5	2
Cabillaud	81	17,5	0,1	1,2
Saumon	65	22	13,5	1,5
Albacore	66	25,5	7,5	1,5
Thon	71	25	3,5	1,4

A ces variations d'espèces, viennent bien sûr s'ajouter des variations individuelles. Les variations les plus courantes portent sur la teneur en graisse et en eau. On peut prendre l'exemple de la chair de maquereau pouvant être constituée à une même période d'un taux

allant de 62,7 à 78,6 % d'eau et 2,2 à 16,4 % de graisse. De plus, intrinsèquement au poisson, on localise des variations anatomiques qui sont dues tout d'abord à la différence entre les muscles rouges et les muscles blancs et également à la position du muscle sur le corps. Il faut savoir par exemple pour le germon (*Thunnus alalunga*) que le muscle ventral est plus riche en graisse (26%) que le muscle dorsal arrière (4%) ou le muscle rouge (5%). Pour terminer sur les variations, on trouve celles d'origine sexuelle où il n'y a pas de grandes règles mais globalement les réserves lipidiques sont à leur maximum avant le frai et à leur minimum après, pour les femelles (Jacquot, 1961).

3. COMPOSITION CHIMIQUE DU POISSON :

3.1. Les lipides :

On retrouve dans le poisson tous les types de lipides allant de l'acide gras le plus simple jusqu'aux sphingolipides en passant par les glycérophospholipides. Néanmoins, la particularité par rapport à la viande est que la nature des acides gras est différente par leurs niveaux d'insaturation. Les lipides ou matières grasses se localisent principalement sous la peau (graisse sous-cutanée) (40%), dans le muscle blanc (35%), la paroi abdominale (10%) et le foie (5%) (exemple du maquereau, Ackman, 1980). Il faut noter toutefois que chez les poissons maigres les muscles rouges et le foie sont proportionnellement les plus riches en lipides (Brody, 1965). Comme on a pu le montrer précédemment, il est difficile de généraliser précisément sur la composition en lipides car elle dépend beaucoup de l'état physiologique du poisson (Kaitaranta, 1980 ; Labuza, 1971).

3.1.1. Les acides gras :

Globalement, avec quelques différences selon les auteurs, les acides gras saturés représentent 15 à 35 % des lipides totaux et les acides gras insaturés 45 à 60 % des lipides

totaux (Tsuchiya, 1961). Au contraire des graisses animales et des huiles végétales, les lipides de poisson contiennent peu ou pas d'acides linoléiques (C18:2), et linoléiques (C18:3). Par contre, il y a une forte quantité d'acides hexa, penta et tétraénoïques qui sont peu présents dans la viande et les végétaux. Les poissons acquièrent ces acides gras par prédation des diatomées qui en sont riches (Notevarp, 1961). Parmi les acides gras saturés, toute la série linéaire depuis l'acide caprylique (C8) jusqu'à l'acide tétraécosanoléique (C24) sont présents mais jamais simultanément. Pour les acides gras insaturés, on trouve une gamme allant de C10 à C28 avec une prédominance de C18, C20 et C22. Le plus répandu est l'acide oléique (C18:1). La composition en acides gras des poissons est donc très complexe et dépend essentiellement de leur alimentation.

3.1.2. Les acides gras ω -3 :

On ne peut pas traiter des acides gras sans mentionner les ω -3, et surtout leur intérêt au niveau diététique et médical. Ce sont des acides gras polyinsaturés où la première insaturation se trouve sur le carbone n-3 (c'est à dire sur le 3ème carbone à l'opposé de la fonction carboxylique). On peut soupçonner que les ω -3 participent aux phénomènes de coagulation et de thrombose. En effet, Hoffman (1996 cité par Boisseau, 1996) présente une voie possible d'interaction entre les ω -3 et le facteur VII. De plus, les triglycérides riches en ω -3 joueraient un rôle important dans la diminution de l'artériosclérose par l'intermédiaire de l'apo C-III (Fruchart, 1996). Duriez (1996) propose une association entre les ω -3 et la vitamine E afin de diminuer les risques de cette pathologie. Les recherches se tournent actuellement aussi vers les ω -6 et leur rôle physiologique chez l'homme.

3.1.3. Les lipides complexes :

Nous allons énumérer pour information les lipides complexes sans entrer dans des détails de compositions très fluctuantes. A côté des triglycérides (acides gras + glycérol), on

trouve des lipides complexes comme les phospholipides, c'est-à-dire les glycérophosphatides avec les céphalines (α -phosphatidyl-éthanolamine) et avec les lécithines (α -phosphatidyl-choline). Les deux derniers composés sont aussi appelés les phosphoaminolipides. Il y a aussi des sphingolipides où le glycérol est remplacé par la sphingosine (Notevarp, 1961).

Il est bon de citer aussi les lipides insaponifiables qui ne représentent pas plus de 2 % des lipides. On trouve les isoprénoïdes :

- Squalène (précurseur du cholestérol)
- Pristane
- Zamène
- Gadusène
- Hèpène

Il ne faut pas oublier non plus les stéroïdes, les « alcoxyglycérols » mais qui sont très minoritaires (Sainclivier, 1983).

3.2. Les glucides :

Contrairement aux algues marines, les poissons sont pauvres en glucide. Ceci s'explique par le fait que les poissons ont une digestibilité faible des glucides complexes due à une quasi-absence de l'activité cellulastique, mis en évidence chez les Téléostéens par Kausik (1997). De plus la rapidité de glycogénolyse rend les mesures difficiles. La majeure partie des glucides est retrouvée sous forme de glycogène stocké dans le foie et les muscles. Selon Ikéda (1980), le muscle rouge contient plus de glycogène que le muscle blanc, environ 1% de la masse musculaire. Rapidement après la mort (après une fatigue intense lors de la pêche), le peu de réserve glucidique est consommé en quasi-totalité. Seules quelques traces de glucose peuvent être retrouvées par déphosphorylation du glucose-6-phosphate qui entre dans les voies de la glycolyse. Le produit final de la dégradation anaérobie est l'acide lactique qui va augmenter en début d'altération.

3.3. Les protéines :

Quantitativement, ce sont les composés majeurs du tissu musculaire. On classe les protéines selon leur site d'action (ci-après, tableau 4) en :

- protéines intracellulaires
- protéines extracellulaires.

Tableau 4 : Composants protéiques du tissu musculaire du poisson (Sainclivier, 1983).

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 faible poids moléculaire.	riches en groupements -SH libres.	forte teneur en acides aminés apolaires : leucine, valine, proline, glycocolle, hydroxyproline, isoleucine. la kératine possède de nombreux ponts disulfures (cystéine).

3.3.1. Protéines intracellulaires :

Il y a peu de travaux sur ces protéines. Dans tous les cas, aucune ne semble avoir de grande particularité ni d'intérêt chez les poissons. La fraction hydrosoluble est surtout représentée par les protéines sarcoplasmiques : myoglobines, albumines et globulines (Jacquot, 1961 et Dyer, 1961). L'autre fraction est définie par les protéines de structure, partie majeure du tissu musculaire : la myosine et l'actine accompagnées des protéines régulatrices (tropomyosine, troponine et protéine C).

3.3.2. Protéines extracellulaires :

Ce sont les protéines de soutien ou protéines du tissu conjonctif (grossièrement on les caractérise « insolubles ») comme le collagène, l'élastine, la kératine et la connectine. A titre de comparaison, le taux de protéines extracellulaires est naturellement plus faible dans le poisson que dans la viande (17%) : - 3 % chez les poissons osseux,

- 10 % chez les poissons cartilagineux.

Nous allons nous attarder sur le collagène, protéine majeure dont l'intérêt économique n'est pas négligeable.

3.3.2.1. Structures et fonctions du collagène :

Le collagène représente une famille de glycoprotéines fibreuses de la matrice extracellulaire. Il existe de nombreuses variétés de collagène qui se différencient par des formes et des fonctions diverses. On peut aussi bien trouver du collagène dans l'os ou la dent, constructions très rigides, que dans la cornée de l'œil. Ces protéines sont les plus abondantes car elles représentent jusqu'à 25 % des protéines chez les Vertébrés.

Le collagène est une protéine spécialisée du tissu conjonctif ; elle est non élastique et assure la cohésion des cellules (cartilages, peau). Les fibres de collagène servent à renforcer et à organiser cette matrice. Son rôle de soutien se caractérise par une structure bien particulière en forme de câble.

Le collagène ou tropocollagène est composé de 3 hélices polypeptidiques gauches enroulées pour former une superhélice droite, d'où son aspect de corde. Les hélices polypeptidiques primaires sont enroulées en sens inverse de celui de la superhélice, ceci confère une très grande rigidité et résistance au collagène. En général, une fibre de collagène a 300 nm de long et 1,5 nm de diamètre (Alberts, 1992).

Sa structure primaire est formée d'unités tripeptidiques se répétant n fois :

(- Gly - X - Y -)_n où l'on retrouve 1/3 de glycine et 1/4 d'hydroxyproline et d'hydroxylysine (Sainclivier, 1983). X et Y sont composés majoritairement par de la proline et de l'hydroxyproline (Rawn, 1995). En fait, deux espèces d'hélices, $\alpha 1$ et $\alpha 2$, sont décrites pour représenter les différents types de collagènes.

Tableau 5 : Les cinq principaux types de collagène.

Type	Formule moléculaire	Composition	Origine
I	($\alpha 1$) ₂ $\alpha 2$	peu d'hydroxylysine peu de glucide fibrilles épaisses	tendons, os, peau, ligaments cornée, organe internes. (90 % du collagène des vertébrés)
II	($\alpha 1$) ₃	beaucoup d'hydroxylysine beaucoup de glucide fibrilles minces	cartilage, humeur vitrée de l'oeil, disque intervertébral
III	($\alpha 1$) ₃	beaucoup d'hydroxylysine beaucoup d'hydroxyproline peu de glucide	vaisseaux sanguins, peau, organes internes.
IV	($\alpha 1$) ₃	beaucoup d'hydroxyproline beaucoup de glucide	membranes basales glomérules rénaux.
V	($\alpha 1$) ₂ $\alpha 2$	beaucoup d'hydroxylysine beaucoup de glucide	en grande quantité dans de nombreux tissus

(D'après Rawn, 1995 ; Bailey, 1980 cité par Sikorski, 1984)

Plusieurs raisons expliquent la résistance du collagène :

- les liaisons hydrogènes intermoléculaires dans le tropocollagène favorisées par les groupements hydroxyles des résidus d'hydroxyproline,
- les liaisons covalentes entre résidus allysines et entre résidus allysine et lysine (le collagène ne contient pas de résidus cystéine et cystine),
- l'arrangement décalé des superhélices du tropocollagène en faisceaux,
- la grande quantité de glycocolle qui par leur petite taille permettent un repliement et une compacité de l'hélice.

Le collagène est une glycoprotéine : le motif oligosaccharidique couramment retrouvé dans le collagène est un disaccharide (Glc α 1,2 Gal) lié O-glycosidiquement par une liaison β -glycosidique sur des résidus d'hydroxylysine. Le rôle de ces substituants est méconnu à ce jour (Rawn, 1995).

3.3.2.2. *Le collagène dans le poisson :*

Le collagène joue un rôle important dans l'intégrité du muscle et des filets de poisson. Il contribue à la qualité des produits. Il a un pouvoir émulsifiant et liant (hachis de poissons, «fish emulsion») (Sainclivier, 1983). Le muscle du poisson se compose de segments parallèles appelés myotomes. Chaque myotome est entouré de membranes basales qui sont constituées de fibrilles de collagène. La taille des fibres musculaires diminue vers la queue, on va retrouver proportionnellement une quantité supérieure de collagène dans le tissu musculaire au niveau de la partie caudale. La quantité de collagène dans le poisson est plus faible que dans la viande (17%) : environ 3% des protéines chez les Téléostéens et environ 10% chez les Sélaciens (Sikorski, 1984).

Il est intéressant de noter que durant les périodes de jeûne, le collagène n'est pas utilisé. Seules les protéines myofibrillaires sont dégradées (Love, 1976).

Le collagène a une bonne solubilité dans des solutions salines et principalement dans les tampons citrate à pH=3,5 comme l'a montré Yamagushi (1976). De plus, la solubilité du collagène peut varier en fonction des saisons, à cause d'une modification des liaisons intermoléculaires (Love, 1976).

L'augmentation de température en milieu humide entraîne une dénaturation des fibres qui peuvent se raccourcir jusqu'à un quart de leur longueur initiale. Ceci va induire un changement de viscosité et la formation de gélatine. Gustavson (1954) a pu mettre en évidence une relation entre la température de dénaturation et la composition en

hydroxyproline (Exemple : 40°C pour 7,7% d'hydroxyproline ; 53°C pour 9,8% d'hydroxyproline).

3.3.2.3. *Le catabolisme du collagène :*

Plusieurs travaux traitent du turnover du collagène dans différents modèles, comme chez le rat où Mc Anulty montre en 1987 par radio-marquage ^{18}O que la régénérescence se ferait très rapidement. Ces travaux ne font pas l'unanimité car ils sont en désaccord avec des travaux plus anciens.

En ce qui concerne la dégradation, il apparaît que les composés principalement libérés seraient de l'hydroxyproline libre (90%) et de l'hydroxyproline liée à de petits peptides (Imberman, 1982). Il est intéressant de noter que des recherches sont faites sur les applications que pourraient avoir les produits de dégradation du collagène au niveau médical (Buczko, 1980).

Il est bon de noter que la composition en acides aminés du collagène est très proche entre les poissons d'eau douce et les poissons de mer (Sainclivier, 1983 et Legrand, 1981).

3.4. Les composés azotés non protéiques :

3.4.1. *Les amines biogènes :*

Ces amines proviennent d'une part de l'action autolytique des enzymes tissulaires et d'autre part de la décarboxylation enzymatique bactérienne des acides aminés au cours de la putréfaction. Chimiquement, Davidek (1995) définit les amines biogènes comme étant des bases organiques aliphatiques, cycliques ou hétérocycliques de faible poids moléculaire ayant une action sur le système nerveux central ou vasculaire.

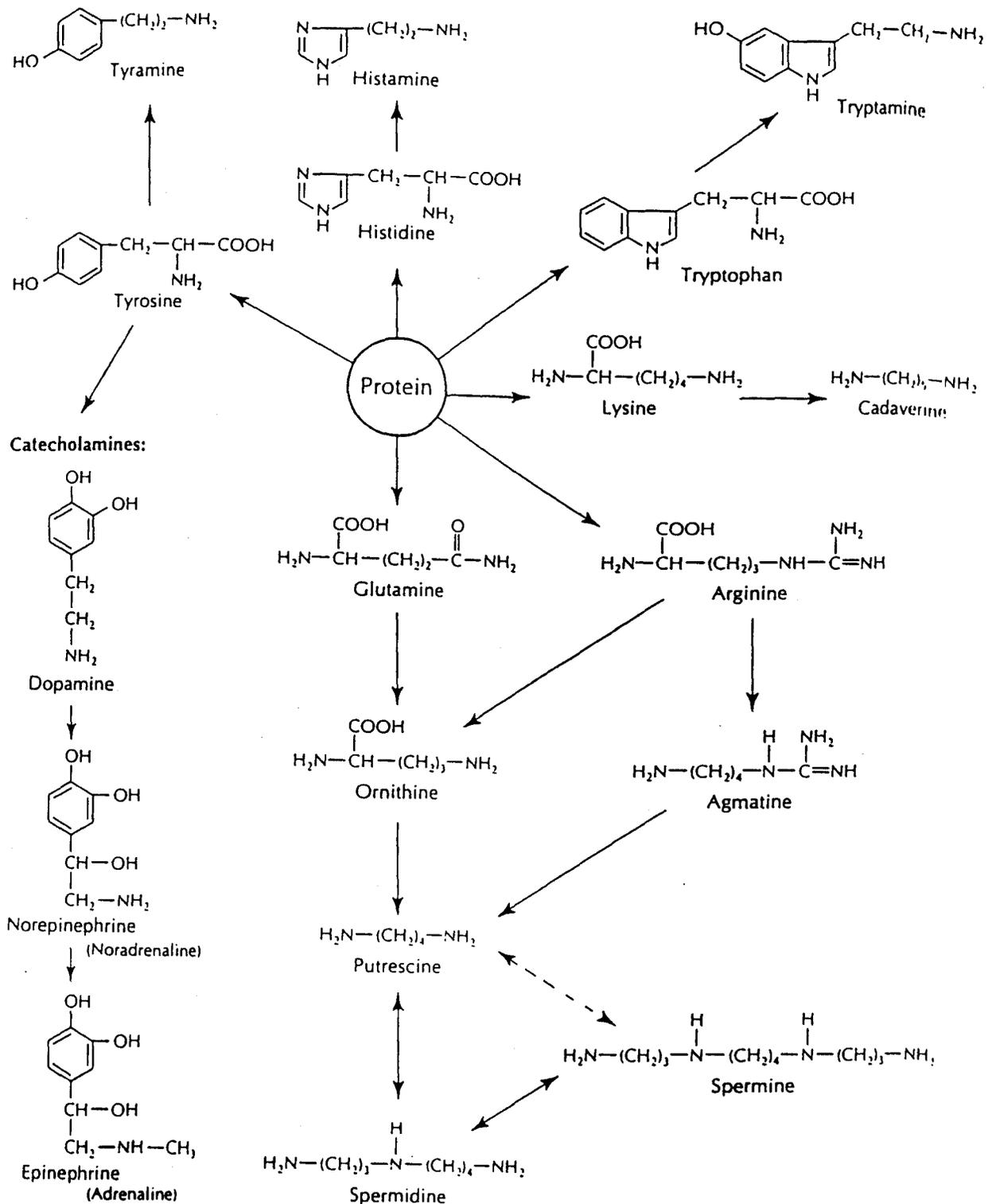
3.4.1.1. *Les bactéries responsables :*

On peut souligner que la production endogène (autolyse par les enzymes tissulaires) de ces amines est beaucoup moins importante que la voie exogène bactérienne (figure 3) (Wendakoon, 1992).

Un grand nombre de bactéries est responsable de la formation d'amines biogènes à partir d'acides aminés libres. Par exemple pour la production d'histamine on trouve *Pseudomonas fluorescens*, *Morganella morganii* (*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, 1994 ; Roig-Sagues, 1996).

Parmi les bactéries qui catabolisent les amines biogènes, Bourgeois (1988) cite notamment *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Clostridium* et *Klebsiella*.

Figure 3 : Voies de formation des différentes amines biogènes à partir des protéines.



Le rôle biologique des amines biogènes (ce type d'amines a des fonctions biologiques bien précises et indispensables) :

- d'une part spermine et spermidine forment un complexe avec les acides nucléiques par des liaisons non covalentes et permettent de stabiliser les charges négatives des résidus d'acides phosphoriques (Tabor, 1976) ;
- d'autre part la formation de liaisons covalentes entre résidus de cadavérine et de putrescine avec les peptidoglycannes semble nécessaire à la croissance de certaines bactéries (Kamio, 1986 cité par Rawles, 1996).

3.4.1.2. Intérêt particulier pour l'histamine :

Les recherches se sont tournées très tôt vers les amines biogènes et principalement sur l'histamine qui est souvent incriminée dans les intoxications alimentaires appelées « empoisonnement scombroid ». Cette dénomination s'explique par le fait que cette intoxication a été observée lors de l'ingestion de poissons de la famille des scombridés tels que le maquereau ou le thon. Ce type de poissons contient à l'état naturel une quantité importante d'histidine qui va permettre une libération élevée d'histamine au cours de l'altération. Les symptômes cliniques décrits par Taylor (1986) et Hugues (1991) sont des troubles gastro-intestinaux, des maux de tête, de l'hypotension, de la tachycardie, des constriction bronchiques et des signes allergiques cutanés. La stabilité thermique de l'histamine ne permet pas de diminuer les risques à la cuisson (Ijomah, 1992).

D'autres amines ont attiré l'attention dans ce phénomène d'altération comme la putrescine, la cadavérine et la tyramine qui joueraient le rôle d'inhibiteur des enzymes catabolisant l'histamine au niveau intestinal comme l'histamine-N-méthyltransférase, la

diamine oxydase (Taylor, 1986 et Crahay, 1996) et la monoamine oxydase (Brink, 1990). Elles favorisent les réactions allergiques de l'histamine.

En effet, l'ingestion directe et seule de l'histamine à taux normalement toxique n'entraîne aucun symptôme (Arnold, 1978 et Taylor, 1986), alors que l'ingestion du mélange histamine et cadavérine à un cobaye donne une réaction positive mettant en avant l'action synergique de ces amines avec l'histamine (Klausen, 1986).

Deux autres amines, l'agmatine issue de l'arginine et la phényléthylamine issue de la phénylalanine ont également fait l'objet de quelques études récentes, mais sans résultat concluant ou exploitable car on les trouve en faible quantité, même sur des produits altérés (Hwang, 1997 et Veciana-Nogues, 1995 et 1997).

A partir de là, l'évolution des différentes amines biogènes au cours de l'altération du poisson a été étudiée et pour cela différentes techniques ont été mises au point avec les avantages et les inconvénients exposés ci-dessous.

3.4.1.3. Les différentes techniques de dosage :

Il est historiquement intéressant avant de décrire chaque type de technique, de mentionner que les premières méthodes se basaient sur l'observation des contractions de l'iléon de cobaye pour évaluer la présence d'histamine (Barsoum et Gaddum, 1935).

Chromatographie de couche mince : Spinelli a proposé en 1974 une méthode permettant de déterminer de faibles quantités de spermidine, putrescine, cadavérine et histamine en dérivant les résidus avec du chlorure de dansyl. Cette idée a été reprise récemment par Naguib (1995) avec une séparation bidimensionnelle des composés.

Chromatographie liquide haute performance : Il existe une multitude de techniques avec différents types de supports, de dérivations (pré ou postcolonne), de détection. Nous allons ne citer que les principaux travaux qui font référence dans le domaine. Tout d'abord, Mietz et Karmas (1977) qui ont travaillé sur le thon et ont mis au point un protocole de CLHP en phase inverse avec une détection de dansyl-dérives à 280 nm (modifié par Hui et Taylor en 1983). Dans la suite de leurs travaux, ils ont proposé un rapport :

$$\text{« Biogenic Amine Index » (B.A.I)} = (\text{Hist} + \text{Put} + \text{Cad}) / (1 + \text{Spm} + \text{Spd})$$

Walters (1984) utilise un autre système : séparation sur une colonne échangeuse de cations, dérivation post-colonne avec l'O-phthalaldehyde et détection par fluorescence (modifié par Vidal Carou en 1990 et par Veciana-Nogues en 1995) (Busto, 1996).

On peut énumérer d'autres méthodes plus originales utilisant la CLHP : Couplage avec le chlorure de dansyl (Lin, 1990), 9-fluoronylméthylchloroformate (Kirchbaum, 1994), réaction enzymatique et chimiluminescence (Kamei, 1989).

Vallé (1996) a mis au point une méthode de séparation avec l'utilisation d'un étalon interne (le 1,3-diaminopropane). Cette méthode appliquée au poisson est dérivée de celle de Smith (1985) appliquée aux plantes. Il propose le rapport suivant (Vallé, 1997) :

$$\text{(Indice d'Amine) I.A.} = \frac{\text{NH}_4^+ / 1000 + \text{Put} + \text{Cad} + \text{His} + \text{Tyr} + \text{Tryp}}{\text{NH}_4^+ / 1000 + \text{Put} + \text{Cad} + \text{His} + \text{Tyr} + \text{Tryp} + \text{Met} + \text{Spd} + \text{Spm}} \times 100$$

Chromatographie de phase gazeuse (GC) : Yamamoto (1982) a réussi à séparer putrescine, cadavérine, spermidine et spermine sous forme d'(éthoxy)carbonyl dérivés, ces travaux font

suite à ceux de Staruszkiewicz (1981) utilisant des perfluoropropionyl-dérivés et une extraction des amines par le méthanol.

Electrophorèse capillaire : Wang (1994 cité par Rawles, 1996) présente la première technique de séparation des amines biogènes en électrophorèse capillaire. Elle a ensuite été modifiée et adaptée par Rodriguez (1996) en système « Micellar Electrokinetic Chromatography » qui permet une séparation en 15 min.

Système enzymatique : La majeure partie de ces techniques ont été mises au point pour détecter l'histamine. Elles utilisent toutes des enzymes immobilisées comme la monoamine oxydase. La seule différence est la détection des produits formés. Certains auteurs (Lerke, 1983 ; Lopez-Sabater, 1993 et Rodriguez-Jerez, 1994) utilisent la formation de peroxyde d'hydrogène comme révélateur de la présence d'amines biogènes et la détection se fait par spectrophotométrie à 580 nm grâce à une peroxydase tandis que d'autres auteurs vont mesurer la diminution de la quantité d'oxygène consommé par l'oxydase à l'aide d'une électrode (Gouygou, 1992 et Cheminitius, 1996).

3.4.2. Les dérivés nucléotidiques :

On définit par dérivés nucléotidiques principalement ceux issus du catabolisme de l'ATP. En effet dans le muscle, il représente 90 % des nucléotides totaux (Ikeda, 1980). Après la mort du poisson, on observe un phénomène d'autolyse de l'ATP qui est déterminant dans l'apparition de la « rigor mortis » (Sainclivier, 1983). Ensuite, la dégradation est accélérée par l'activité bactérienne qui fait apparaître une augmentation significative de l'inosine et de l'hypoxanthine (Mulchandani, 1989 et Williams, 1991) au détriment de l'IMP qui joue un rôle dans la saveur du poisson.

3.4.2.1. Voies de dégradation de l'ATP :

ATP → ADP → AMP → IMP → Inosine → Hypoxanthine → Xanthine → Acide urique → Urée

↓
XMP
↓
GMP
↓
Guanosine
↓
Guanine

ATP : Adénosine 5' triphosphate
 ADP : Adénosine 5' diphosphate
 AMP : Adénosine 5' monophosphate
 IMP : Inosine 5' monophosphate
 XMP : Xanthosine 5' monophosphate
 GMP : Guanosine 5' monophosphate

La quasi-totalité des auteurs n'utilisent que la voie de dégradation de l'ATP à l'urée pour leurs recherches méthodologiques ou leurs calculs d'indice. Il ne faut pourtant pas oublier que le catabolisme de l'IMP peut aboutir aussi à la formation de XMP, GMP, Guanosine et Guanine (Fischer, 1995). **Nous soulignons cette deuxième voie de dégradation parce qu'elle va nous inciter à rechercher une nouvelle technique de séparation.**

3.4.2.2. Les différentes techniques de séparation :

En dehors des séparations des dérivés nucléotidiques par chromatographie, la majeure partie des techniques fait appel aux systèmes enzymatiques.

Les différentes enzymes intervenant dans la dégradation sont utilisées sous forme immobilisée ; comme par exemple la xanthine oxydase qui transforme, en présence d'oxygène, l'hypoxanthine en xanthine en libérant du peroxyde d'hydrogène qui peut être ainsi mesuré à l'aide d'une électrode (Mulchandani, 1989 et 1990 ; Nguyen, 1990 ; Luong, 1991 et 1992).

D'autre part, Karube (1984) a mis au point sur le même principe le dosage de l'IMP, de l'hypoxanthine et de l'inosine par l'intermédiaire de la 5'-nucléotidase, nucléoside phosphorylase, xanthine oxydase.

La CLHP est un bon moyen de séparation car la détection est facilitée par une absorbance des dérivés nucléotidiques dans l'ultra-violet proche. On peut trouver de nombreuses références bibliographiques qui se basent essentiellement sur les mêmes modes d'extraction mais se différencient simplement par la séparation chromatographique en fonction des différents supports commerciaux (Fischer, 1995 ; Ohasi, 1991 ; Murray, 1983).

3.4.2.3. *Recherches sur les indices*

L'évaluation de l'altération par les dérivés de l'ATP a été déterminée pour la première fois par Saito en 1959 par la détermination du 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. (1992),

$$H = \frac{Hx}{IMP + HxR + Hx}$$

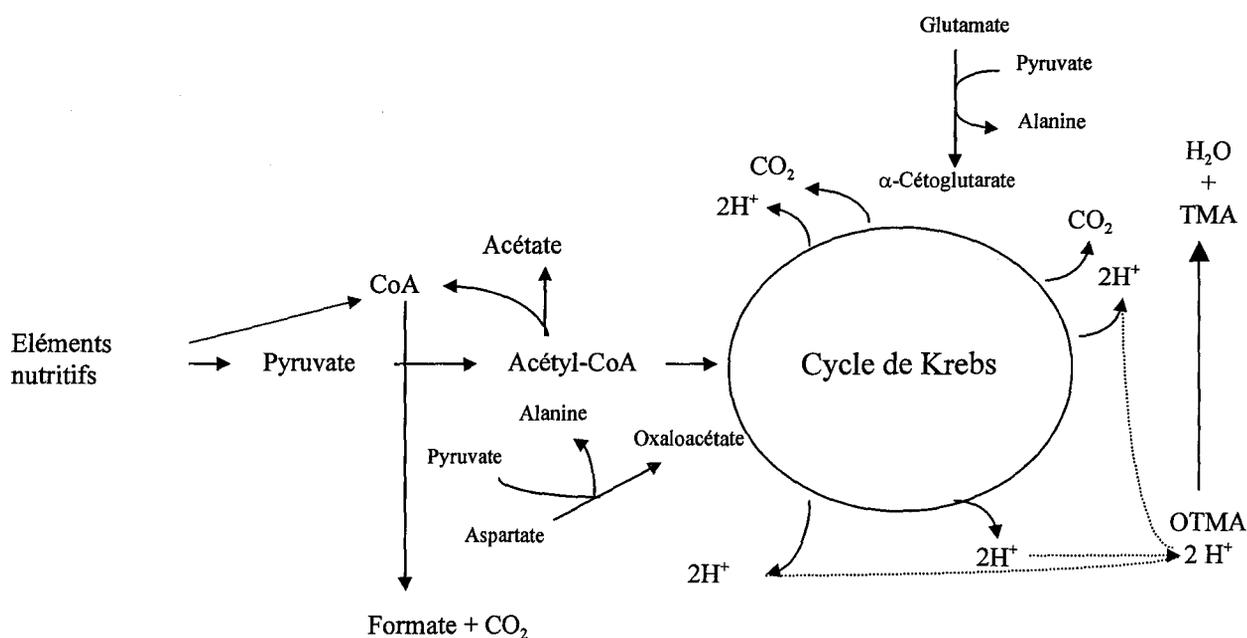
3.4.3. *L'OTMA et la TMA :*

L'OTMA (Oxyde de TriMéthylAmine) est un composé caractéristique du poisson. On peut en trouver de 0,5 à 1 % dans le tissu musculaire des poissons marins. La quantité importante s'explique par une production métabolique propre à l'individu à partir de la choline

et aussi par un apport alimentaire important des algues (Ikeda, 1980). Son rôle n'est pas négligeable puisqu'il participe à la régulation osmotique (Simidu, 1961).

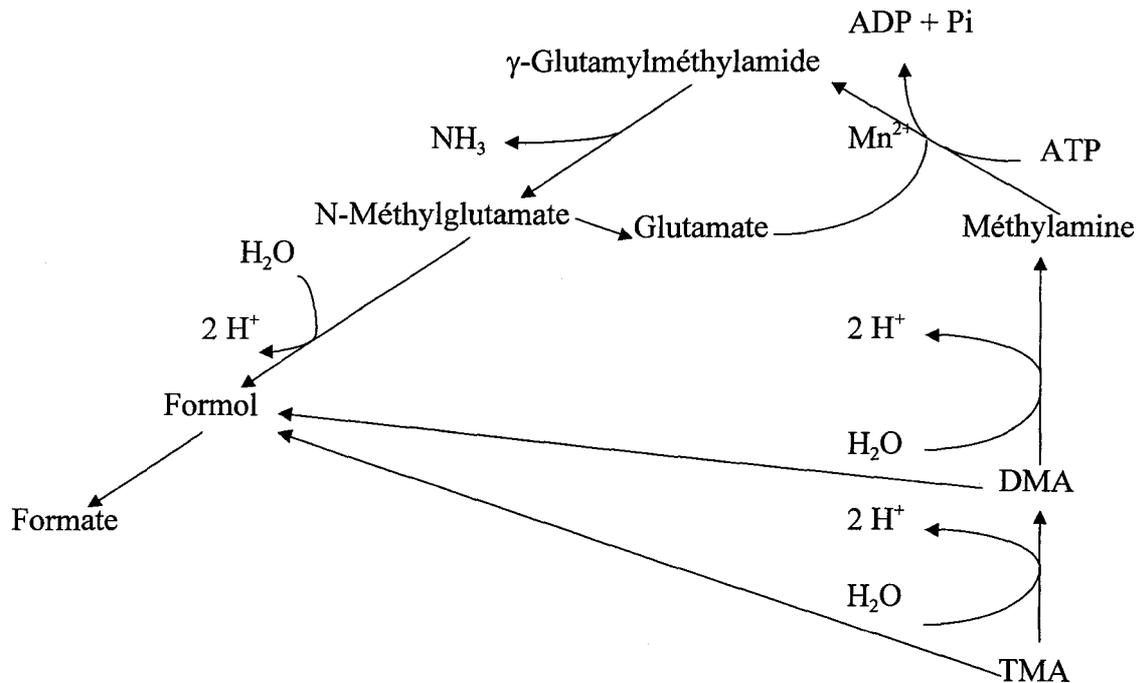
Pour comprendre le catabolisme, on peut prendre comme référence la figure 4 proposée par Ringo (1984) qui présente une voie de réduction de l'OTMA en TMA (TriMéthylAmine) avec la participation du cycle de Krebs en milieu anaérobie pour *Shewanella putrefaciens*. Sainclivier (1983) étend le rôle d'accepteur d'hydrogène pour l'OTMA aux entérobactéries, aux *Achromobacter*, aux *Pseudomonas* et certains *Clostridium*. Barrett (1985) propose de nombreuses références quant à la réduction de l'OTMA par les bactéries. Il élargit la liste aux genres *Vibrio*, *Campylobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodospirillum* et *Rhodopseudomonas*. Par contre, il élimine dans les entérobactéries *Erwinia* et *Shigella*.

Figure 4 : Réduction de l'OTMA en TMA (Ringo, 1984).



D'autre part la dégradation de la triméthylamine suit la voie décrite par Meiberg (1978) dans la figure ci-dessous.

Figure 5 : Différentes voies de dégradation de la TMA par Meiberg et Harder (1978).



La triméthylamine est reprise dans le dosage de l'ABVT (Azote Basique Volatil Total) qui reflète un niveau de contamination bactérienne et permet de caractériser des seuils de rejet en fonction du type de poisson (Malle, 1983). Plusieurs méthodes sont utilisées pour doser les amines volatiles comme la technique de microdiffusion (Conway, 1962) ou celle d'entraînement à la vapeur (Billon, 1979). Au dosage d'ABVT, on a pu associer celui de la triméthylamine seule pour effectuer des comparaisons d'évolution (Malle, 1987 et 1989). Pour Liston (1980), les composés majeurs de l'ABVT sont la triméthylamine, l'ammoniac et la diméthylamine.

3.4.4. L'urée :

L'urée est le métabolite final de la dégradation de l'ATP. Chez les Sélaciens, elle est formée essentiellement dans le foie selon le cycle ornithine-urée permettant sa détoxification. L'élimination peut se faire sous forme d'acide urique, d'allantoïne et de créatine. On trouve environ 2% d'urée dans le muscle des Sélaciens et seulement 0,015 % chez les Téléostéens car l'azote est surtout excrété par l'OTMA. L'urée intervient dans la régulation de la pression osmotique des fluides dans le poisson.

3.4.5. L'ammoniac :

L'ammoniac résulte essentiellement de tous les phénomènes de désamination comme ceux des dérivés puriques, des acides aminés par des enzymes endogènes, et par ailleurs on le retrouve dans le cycle de l'urée. Il est présent à l'état naturel entre 5 à 20 mg pour 100 g de chair. Ce taux va très nettement augmenter durant l'altération, par production importante des désaminases bactériennes (Sainclivier, 1983).

3.5. Les composés volatils :

3.5.1. Approche olfactive :

Il apparaît évident que le poisson est un aliment qui a une odeur caractéristique évoluant avec l'altération. Certains auteurs (Josephson, 1983 ; Hirano, 1992 cités par Olafsdottir, 1997) définissent, par exemple, l'odeur du poisson à l'état frais comme ressemblant en partie à celle du concombre. Ceci reflète la présence de nombreux éléments comme des chaînes hydrocarbonées insaturées et des alcools.

Au cours de l'altération du tissu musculaire du poisson, il y a des modifications complexes et mal connues du substrat en tant que tel. Ces différents mécanismes vont donc induire la formation de composés volatils qui pourraient être révélateurs d'un niveau de dégradation et donc d'un niveau de fraîcheur.

Les travaux relatifs à l'étude de la flaveur du poisson peuvent se résumer en utilisant la classification de Lindsay (1990) qui définit cinq catégories :

- l'odeur du poisson frais,
- l'odeur due à la dégradation bactérienne,
- l'odeur d'oxydation,
- l'odeur due au procédé,
- l'odeur due à la contamination environnementale.

3.5.1.1. L'odeur du poisson frais :

Il faut différencier les odeurs des poissons de mer, de celles des poissons d'eau douce et de celles des « euryhaline fish »(que nous nommerons poissons mixtes comme le saumon qui vit en eau salée mais qui pond en eau douce) (Kawai, 1996). Dans le premier cas, ce sont des composés azotés qui constituent principalement l'odeur du poisson comme l'ammoniac, la triméthylamine, la diméthylamine ; viennent ensuite des acides (acétique, formique, propanoïque) et des composés soufrés (diméthyl sulfide, thiométhane, H₂S) (Hirano, 1989). Depuis 1976, Kikuchi note l'importance non pas d'un de ces composés mais de la combinaison de ces différents produits cités précédemment en fonction du pH. En ce qui concerne les poissons d'eau douce, quatre produits se trouvent majoritaires et mis en avant : la triméthylamine, l'éthanal, la pipéridine et la pyrrolidine chez la truite et la carpe. Ces deux derniers sont issus de la cyclisation respective de la cadavérine (1,5-diaminopentane) et de la putrescine (1,4-diaminobutane) (Shimakura, 1991 ; Yamanaka, 1987). Enfin, il existe quelques changements chez les poissons mixtes qui sont dus à la modification de leur osmorégulation et à l'étape de maturation pour préparer la ponte. Comme le montre Josephson (1991), le saumon en eau douce comporte 36 composés, essentiellement des alcools et des

chaînes insaturées de trois à neuf atomes de carbones de l'éthanol et de l'acide acétique alors que le saumon de mer n'est constitué que d'éthanol et d'alcools à 8 atomes de carbone.

Tableau 6 : Identification et caractérisation de composés volatils issus de poissons (Josephson, 1991).

Composés	Odeur	Seuil de détection (ppb)
2-pentenal	pomme, verdure	-
1-penten-3-one	solvant	1,3
1-pentanol	vin, éther	120
1-penten-3-ol	herbe, verdure	400
Hexanal	herbe, aldéhyde	4,5
2-hexenal	herbe	17
3-hexenal	herbe, pomme	0,25
Hexanol	herbe, graisse	500
3-hexen-1-ol	herbe, feuille	70
3-octanone	résine, éther	50
1-octen-3-one	champignon	0,09
1,5-octadien-3-one	feuille de géranium	0,001
3-octanol	champignon	18
1-octen-3-ol	champignon	10
1,5-octadien-3-ol	champignon, terre	10
2-octen-1-ol	graisse, rance	40
2, 5-octadien-1-ol	terre, champignon	10
2-nonenal	concombre, carton	0,08
3-nonenal	pastèque	0,08
6-nonenal	melon	-
2, 6-nonadienal	zeste de concombre	0,01
2, 6-nonadienal	pastèque	-
2-nonen-1-ol	herbe, melon jaune	-
6-nonen-1-ol	herbe, melon jaune	-
2, 6-nonadien-1-ol	herbe sèche, concombre	-
3, 6-nonadien-1-ol	concombre	10

Josephson (1991) a proposé une liste de différents composés que l'on peut obtenir dans les produits de la mer auxquels est attribuée une odeur caractéristique (tableau 6). De plus, il explique la formation de certains d'entre eux par différentes voies métaboliques :

- réaction de la lipoxygénase sur l'acide eicosapentanoïque (figure 6 a),
- réaction d'autooxydation sur l'acide eicosapentanoïque (figure 6 b),
- réaction de rétroaldolisation sur des acides gras insaturés (figure 7).

Figure 6 a : Réaction de la lipooxygénase sur l'acide eicosapentanoïque (Josephson, 1991 et Kawai, 1996).

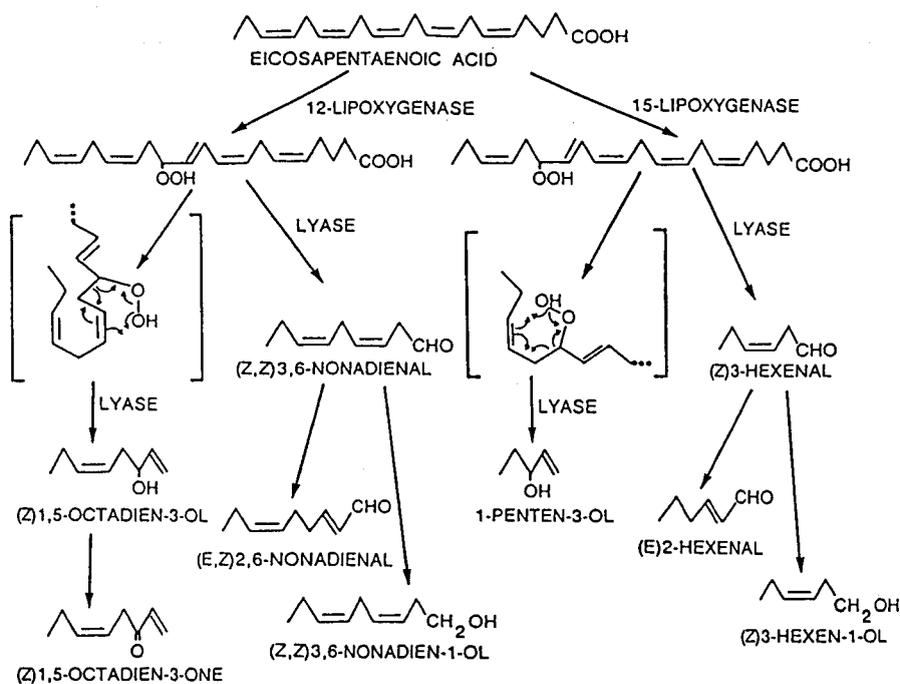


Figure 6 b : Réaction d'autooxydation sur l'acide eicosapentanoïque (Josephson, 1991 et Kawai, 1996).

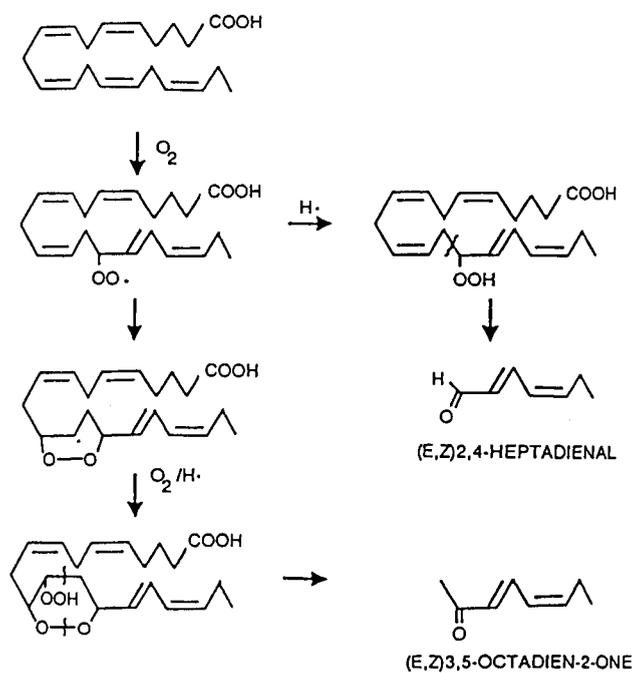
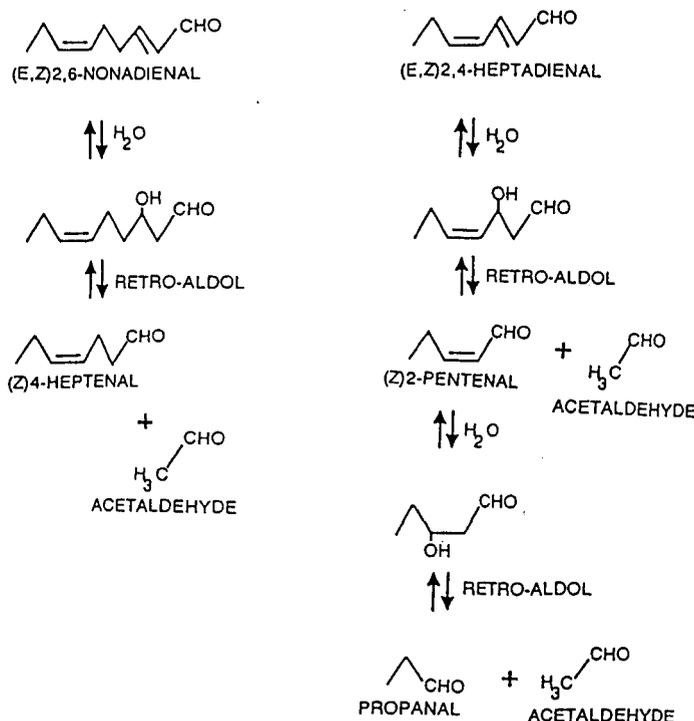


Figure 7 : Réaction de rétroaldolisation sur des acides gras insaturés (Josephson, 1991 et Kawai, 1996).



Hsieh (1989) a aussi mis en évidence la production de composés volatils, par l'action de la lipoxigénase sur l'acide eicosapentanoïque et arachidonique, comme par exemple le 2-nonenal, 3-nonenal, 2-octen-1-ol., 1-octen-3-ol, 1,5-octadien-3-ol et le 2, 5-octadien-1-ol.

Des composés d'un autre genre, dérivés du bromophénol, ont été mis en évidence dans plusieurs produits comme le saumon ou les crevettes. Ils seraient responsables de « l'odeur de mer et d'iode » (Boyle, 1992). En effet, des analyses sur des poissons d'eau douce n'ont pas révélé la présence de bromophénol. Certains auteurs, comme Whitefield (1997), supposent qu'il s'agirait de l'accumulation de ce produit en fin de chaîne alimentaire.

3.5.1.2. *L'odeur due à la dégradation bactérienne :*

Comme le cite Olafsdottir (1997), on trouve comme odeur due à la dégradation bactérienne principalement des alcools, des petites chaînes carbonées, des amines simples et cycliques, des composés soufrés, aromatiques, et enfin quelques acides. Parmi les alcools, l'éthanol a été suggéré pour servir d'indicateur d'altération dans le poisson en conserve (Kelleher, 1983), et aussi dans le poisson congelé avec en plus du butanol et du 3-méthyl-1-butanol (Lindsay, 1986). En ce qui concerne les amines, on retrouve normalement la triméthylamine, la diméthylamine et l'ammoniac, issues de la dégradation de l'oxyde de triméthylamine, qui sont notamment pris en compte dans le dosage d'ABVT (Azote Basique Volatil Total) par entraînement à la vapeur (Malle, 1989). La formation des composés soufrés est due principalement à la dégradation bactérienne de la cystéine et de la méthionine (Herbert, 1975) et aboutit à la formation de méthyl mercaptan, de méthyl sulfide, de diméthyl disulfide et d'hydrogène sulfide. Pour Shewan (1976), ce sont ces produits qui engendreraient l'odeur de putréfaction du poisson, mais de façon nuancée en fonction de leur concentration. Par exemple, le méthyl mercaptan n'aurait pas d'odeur en dessous de 0,05 ppb, une odeur aigre-acide à 0,5 ppb, puis une odeur de chou à 50 ppb pour finir en une odeur métallique à 100 ppb. Quant à la formation des acides (acide formique, acétique), elle ferait suite à la dégradation des acides aminés et des lipides. La présence de ces acides modifie la volatilité de la triméthylamine apportant une modification indirecte de l'odeur (Olafsdottir, 1997).

3.5.1.3. *L'odeur d'oxydation :*

Cette odeur proviendrait d'aldéhydes insaturés, comme le 2,4,7-décatriénel, qui sont formés par autooxydation de longues chaînes d'acides gras (incluant la formation de radicaux libres). Très tôt, C4-heptanal a été mis en avant par Mc Gill (1974), mais il semblerait qu'on lui accorde moins d'importance dans des travaux plus récents.

3.5.1.4. L'odeur due aux procédés de fabrication :

Le poisson peut être préparé de différentes manières : cuit, fumé, salé, à l'huile, au vinaigre. Toutes ces méthodes de préparation vont apporter de nouvelles odeurs. De nombreux auteurs ont étudié les composés volatils de ces produits (Baek, 1996 ; Shimoda, 1996 ; Triqui, 1995), mais nous ne rentrons pas dans le détail car les identifications sont vraiment spécifiques des différents procédés de fabrication. Déjà en 1990, Sakakibara a présenté une longue liste de composés volatils pouvant être présents chez les poissons. On y trouve des alcools, des aldéhydes, des cétones de quatre à huit atomes de carbone principalement mais aussi des hydrocarbures, des éthers, des phénols, des lactones, des dérivés furaniques et des acides.

3.5.1.5. L'odeur due à la contamination environnementale :

Si nous envisageons l'incidence de l'environnement, c'est qu'il ne faut pas confondre composés volatils issus de la dégradation propre du poisson et ceux issus de la contamination exogène liée aux zones de pêche. Par exemple, Pearson (1975) et Murray (1973) s'intéressaient déjà au dérivés chlorés que l'on pouvait trouver dans la chair de poisson. Des études ont été aussi réalisées sur le méthyl sulphide retrouvé en quantité élevée sur du saumon, du maquereau et du hareng de la Baltique qui donnerait une odeur de pétrole provenant indirectement du plancton (Motohiro T., 1962 ; Ackman, 1972 cités par Olafsdotir, 1997). Lockhart (1988) a mis également en évidence la présence de dérivés benzéniques provenant d'une contamination par des dérivés de pétrole que le poisson bioaccumule.

3.5.2. Approche technique :

Cette deuxième partie sur les composés volatils concerne les différents moyens techniques qui peuvent être mis en oeuvre pour les séparer et les identifier. Nous allons passer

en revue les deux grandes méthodes qui sont les plus utilisées : **l'headspace (espace de tête) et l'extraction-distillation.**

3.5.2.1. Headspace statique (HSS) :

Le principe est de volatiliser les produits de l'échantillon et de les injecter directement en chromatographie gazeuse. L'avantage de cette technique est de limiter les artefacts de préparation comme ceux apparaissant lors de l'utilisation de solvants ou de matériels complexes. De plus sa simplicité permet un gain de temps, une utilisation en routine et un équipement modéré. Par contre, cette méthode ne permet pas l'obtention de seuils de détection bas. Pour favoriser la volatilité, il faut modifier le coefficient de répartition entre la phase liquide et la phase vapeur. Pour cela, il faut prendre en compte la matrice sur laquelle on travaille et faire jouer les paramètres température et concentration en sel (Seto, 1994).

Erickson (1994) a utilisé cette méthode au plus simple en mettant 1,5 g de poisson dans un tube de 5 mL chauffé à 90°C pendant 15 min ; puis en prélevant 1,5 mL en headspace. Il réussit à mettre en évidence trois produits : l'acétaldehyde, le propanal et l'hexanal. Pour augmenter la volatilité des composés aminés (triméthylamine, diméthylamine), Fiddler (1991) ajoute de la soude avant le chauffage. Olafsdottir (1997) a adapté l'headspace statique à des sacs plastiques scellés à température ambiante durant 30 min et où la prise de gaz se fait par l'intermédiaire d'un septum. La mesure des composés se fait par des capteurs sensoriels (nez électronique) et permet notamment la mise en évidence de dérivés soufrés.

3.5.2.2. Headspace dynamique (HSD) :

Suite aux remarques antérieures, l'intérêt d'utiliser l'headspace dynamique est de pouvoir diminuer les seuils de détection. Overton en 1995 (cité par Jensen, 1997) a pu montrer que cette technique était jusqu'à cent fois plus sensible. Dans cette technique, les produits volatils sont tout d'abord collectés et concentrés sur une fibre (le plus souvent du tenax) puis

sont alors désorbés en bloc le plus souvent par augmentation de la température pour être introduits dans le chromatographe. Il est bon de noter qu'Easley (1981) ajoute une étape de sonification aux échantillons avant de les soumettre au système de « purge and trap ». Olafsdottir (1995) a mis en évidence que l'augmentation de la sensibilité se faisait au détriment des possibilités de reproductibilité. En effet, l'headspace dynamique peut être caractérisé comme une méthode qualitative principalement.

Il est intéressant de souligner qu'aucune des méthodes suivantes n'est appliquée aux poissons frais. Les seules références font appel aux produits transformés ou aux sous-produits.

3.5.2.3. Extraction-distillation simultanées (SDE) :

La SDE se pratique dans beaucoup de travaux à l'aide de l'appareil de Likens-nickerson (Likens, 1964). Chung (1993) nous donne un exemple avec la chair de crabe. L'extraction est réalisée pendant 2 h avec cet appareil sur 500 g de chair à laquelle on ajoute 2 L d'eau, un standard interne et 50 mL de dichlorométhane. Les produits sont ensuite concentrés en évaporant les solvants sous flux d'azote. Sur les 80 composés séparés, quatre semblent avoir leur importance dans l'odeur du poisson : le 2,3-butanedione, le 4-heptenal, le 2-acétyl-1-pyrroline et le 3-(méthylthio)propanal. On peut retrouver la SDE dans les travaux de Baek (1996) sur des sous-produits d'écrevisse mettant en évidence surtout la présence de pyrazines.

Comme le souligne à juste titre Barbieri (1994), qui a comparé l'headspace et la SDE non pas sur du poisson mais sur du fromage, la SDE n'est pas exclusivement représentative des composés volatils mais de produits possédant des chaînes carbonées plus longues car l'extraction se fait par un chauffage continu.

3.5.2.4. Distillation sous vide :

Triqui (1995) a appliqué cette méthode sur 200 g d'anchois broyés pendant une minute dans 200 mL d'eau. Ensuite, il a réalisé une extraction sur 200 mL de distillat au dichlorométhane. Il a pu mettre en avant la présence d'alcool et de cétone à huit atomes de carbone ainsi que des chaînes insaturées allant jusqu'à dix atomes de carbone mais aussi le 2,6-nonadiénal responsable de l'arôme de concombre et de plante. Grosh (1993) et Widder (1991, 1994 et 1997) ont travaillé sur cette méthode d'extraction des arômes, mais essentiellement sur les catabolites des composés lipidiques.

3.5.2.5. Microextraction en phase solide (SPME), Extraction liquide supercritique (SFE).

Il existe peu de références sur ces deux types de méthodologies qui sont assez récentes mais il est nécessaire de les citer.

La SPME a été mise au point dans les années 1990 avec une application principale pour les prélèvements environnementaux. Ce n'est qu'un peu plus tard que la mise au point a été effectuée pour des produits biologiques. Raoul (1997) a utilisé la SPME pour mettre en évidence la présence de nitrosamine dans des sauces (le principe résulte de l'interaction entre les produits volatils et des groupes fonctionnels fixés sur une fibre). On peut citer aussi d'autres travaux plus généraux de Zhang (1995 et 1996) sur des composés halogénés de points d'ébullition variant de -24 °C à 149 °C .

On peut également noter pour mémoire l'utilisation de la cocrystallisation et de la concentration cryogénique par Misharina (1992) qui donnent, après comparaison, les mêmes résultats que la SDE.

3.5.3. Approche méthodologique :

Dans cette approche méthodologique, nous allons présenter différents paramètres physicochimiques qui peuvent influencer la volatilité des produits comme par exemple la

température et la concentration saline des échantillons. Pour cela nous allons nous référer essentiellement aux travaux de Seto (1994).

3.5.3.1. *La théorie :*

On peut tout d'abord s'appuyer sur la loi de Henry modifiée, qui définit la répartition des produits entre la phase liquide et la phase gazeuse après équilibre thermodynamique en milieu clos :

$$\Leftrightarrow C_{L_0}V_L = C_L V_L + C_G V_G \quad (I)$$

où : C_{L_0} : concentration du produit avant équilibre dans la phase liquide
 C_L et C_G : concentration du produit après équilibre dans les phases liquide et gazeuse
 V_L et V_G : volume des phases liquide et gazeuse.

Sachant que le coefficient de répartition (k) et le ratio de phase (β) sont définis respectivement par C_L/C_G et V_G/V_L , l'équation (I) devient alors :

$$\Leftrightarrow C_G = C_{L_0}/(k+\beta) \quad (II)$$

On peut donc constater que la concentration dans la phase gazeuse dépend maintenant de trois facteurs. k apparaît comme étant le plus important car il varie en fonction de la température et en fonction de l'état de la matrice sur laquelle on travaille. Par contre, C_{L_0} et β sont préétablis par la quantité initiale dans l'échantillon et par le type de flaconnage utilisé (5-20 mL).

3.5.3.2. *Effet d'ajout de sels :*

Il est bien connu que l'ajout de sel modifie la solubilité des produits et ceci par le procédé de « salting out ». En ce qui concerne la volatilité, selon les produits, l'augmentation de la concentration saline modifierait la valeur de k . Il s'agirait aussi d'un phénomène électrostatique, les sels perturberaient les liaisons ioniques entre l'eau et les composés, entraînant une compétition qui faciliterait leur libération. Jones (1984) et Bassette (1969)

(cités par Seto, 1994) ont montré qu'il existait une diminution significative du facteur k pour les aldéhydes, les alcools et les cétones en présence de sulfate de sodium.

3.5.3.3. Effet de la température :

L'augmentation de la température induit une diminution du facteur k : on peut noter une relation linéaire entre le logarithme de k et la température (Przyjazny, 1983 cité par Seto, 1994). De manière générale, plus les composés sont solubles, plus la température aura une influence. Dans la quasi-totalité des travaux cités précédemment, les auteurs utilisent des températures de chauffage supérieures à 60 °C. Comme nous le verrons ultérieurement, un chauffage excessif pourrait générer des produits ne se trouvant pas à l'état naturel dans les échantillons.

3.5.3.4. Effet de la matrice :

Comme dans toutes analyses biologiques, il est important de prendre en compte la matrice. En effet, celle-ci peut interférer puisque le tissu musculaire de poisson a une composition complexe et variable. Il est évident que l'on ne peut pas tenir compte de chaque interaction, mais il faut plutôt les globaliser en «un effet matrice» pour pouvoir mieux interpréter et surtout pour pouvoir envisager une quantification. Hiatt (1995) présente dans ces travaux différents types de matrice simple sur lesquels il a effectué une distillation sous-vide et mis en évidence des différences de pourcentage de récupération.

3.5.3.5. Artefacts :

Chaque étape d'extraction, de purification peuvent être le siège d'une contamination exogène en apportant ou en favorisant la formation de composés qui ne sont pas naturellement présents. La séparation des produits fait appel à leur volatilité, et à leur affinité envers des solvants ou des polymères. Comme nous l'avons vu précédemment, les techniques les plus utilisées sont la distillation, le système headspace et l'extraction par des solvants (SDE). Ces

méthodes peuvent provoquer des artefacts par le chauffage ou amener des contaminants par l'utilisation de solvants.

En ce qui concerne la température, Tressl (1979) (cité par Etievant, 1996) a décrit qu'il y avait au cours du chauffage des modifications générales des acides aminés, des acides phénoliques, des acides gras insaturés, des sucres et des caroténoïdes. Il est intéressant de remarquer qu'Hardy (1974) a mis en évidence la production de cis-hepten-4-al au cours de la distillation de chair de morue. Un autre exemple concerne la SDE, où Mottram (1978) a constaté l'apparition de 2-méthylbut-2-ene lors de l'ajout d'oxyde d'azote lié à des impuretés retrouvées dans le diéthyl éther et le pentane.

Dans le cas de l'utilisation de solvant, la nécessité absolue est d'effectuer des « blancs d'analyse » pour justement visualiser les contaminants possibles. Il faut bien sûr utiliser des solvants très purs et si besoin est, les distiller sur colonne vigreux. Il ne faut pas non plus oublier les possibilités de réaction chimique entre les solvants et les produits à analyser : le méthanol et l'éthanol utilisés pour isoler les composés polaires peuvent interagir avec d'autres alcools par réaction de déshydratation, avec les acides par estérification et avec les aldéhydes par acétalisation.

Il faut aussi prendre garde, dans notre cas, aux différents contaminants environnementaux que nous avons soulignés précédemment dans le paragraphe 3.5.1.5.

3.6. L'eau :

Par comparaison avec la viande (environ 70%), le poisson contient une plus grande quantité d'eau environ 75 à 80 %. Cette eau joue un rôle important dans la texture mais aussi dans l'altération bactérienne car le tissu musculaire possède une activité de l'eau élevée (a_w) (Sainclivier, 1985). On distingue l'eau liée qui participe aux édifices moléculaires et qu'on trouve au niveau des protéines et aussi l'eau libre qui reste totalement accessible.

3.7. Les vitamines :

Le tableau 7 donne la composition en vitamines du cabillaud et du hareng. Les valeurs attribuées au bœuf sont données à titre de comparaison.

Tableau 7 : Composition en vitamines pour le cabillaud, le hareng et pour le bœuf sur 100 g de chair (Artemis, 1995).

	Cabillaud	Hareng	Bœuf
Vitamine A (µg)	2,00	34,00	Tr
Vitamine D (µg)	Tr	25,00	Tr
Vitamine E (mg)	0,44	0,30	0,29
Thiamine (mg)	0,08	Tr	Tr
Riboflavine (mg)	0,06	0,18	0,36
Niacine (mg)	1,90	4,00	6,40
Vitamine B6 (mg)	0,41	0,39	0,33
Vitamine B12 (µg)	2,00	8,00	2,00
Acide folique (µg)	10,00	7,00	17,00
Acide pantothénique (mg)	0,25	0,60	0,90
Biotin (µg)	3,00	7,00	Tr
Vitamine C (mg)	Tr	Tr	0

Tr : trace

3.8. Les minéraux :

Des auteurs (Ludorff, 1973 et Ikeda, 1980) ont décrit et quantifié la composition en minéraux mais avec de légères différences. Les données les plus récentes (Kausik, 1997) sont décrites dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 : Composition en minéraux (ppm) de la chair de quelques poissons.

	Ca	P	Mg	Na	K	Fe	Zn	Mn	Cu	I
Anchois	20-480	180-350	30-50	70-150	260-510	8-49	15	0,007	0,8-5	0,8
Cabillaud	9-20	9-240	20-25	60-180	270-460	3-43	9-53	0-0,5	0,2-6	0,2-5
Hareng	21-460	130-740	30-46	49-183	25-512	0-31	2	< 0,2	0,1-2	1,2-3
Sole	12	150	24	110	226	2	4	0,1	0,2	< 0,1
Thon	6-90	190-760	50	30-190	250-520	3-80	1	0,1-0,5	0,1	0,2-0,4

4. LA FLORE DU POISSON :

On peut d'ores et déjà citer Proctor et Nickerson (1935) : le muscle du poisson vivant est normalement stérile.

Il apparaît évident que l'on ne peut pas dissocier altération du tissu musculaire et flore bactérienne. En effet, dans un premier temps, les enzymes tissulaires sont responsables de la dégradation mais le relais est rapidement pris par les enzymes bactériennes. La flore bactérienne est impliquée dans un ensemble de phénomènes qu'il est nécessaire de décrire.

4.1. Origine et localisation :

Le poisson va être contaminé par les bactéries présentes dans son environnement. La qualité bactériologique de l'eau de mer va être fortement influente. La flore varie qualitativement et quantitativement :

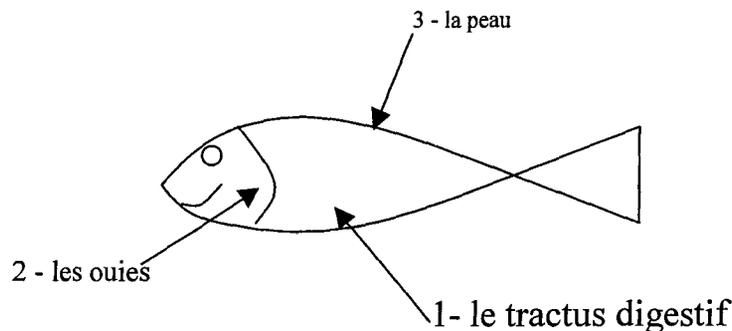
- en fonction de la proximité du littoral,
- si l'on est dans une mer froide ou chaude,
- selon la profondeur,
- selon la saison de pêche.

Dans les eaux proches du littoral, il s'ajoute à la flore naturelle de la mer celle d'eau douce qui provient des effluents. Cette dernière est très nombreuse à cause des rejets domestiques, industriels et ruraux (Shewan, 1971 et Bonde, 1977). Elle renferme souvent des germes pathogènes pour l'homme (*Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*) (Soudan, 1965).

Dans les mers froides, les bactéries à Gram négatif psychrophiles et psychrotrophes sont majoritaires alors que dans les mers chaudes ce sont des bactéries mésophiles à Gram positif.

D'autre part, la quantité de bactéries diminue avec la profondeur. Ainsi, on peut trouver quelques centaines de bactéries par mL en surface de l'eau alors qu'il n'y en aura plus qu'une dizaine à 200 m de fond.

Figure 8 : Localisation de la flore sur le poisson par ordre d'importance.



4.2. Composition de la flore :

Nous nous intéresserons exclusivement à la flore des mers froides, en rapport avec les lieux de pêche et les espèces de poissons étudiés.

La flore intestinale est composée de bactéries de types respiratoires divers, notamment des genres *Vibrio*, *Aeromonas* et *Clostridium* (Shewan, 1977), alors que la flore de surface de la peau contient des bactéries aérobies (aérobies strictes et aérobies-anaérobies facultatives) appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* et *Vibrio* (Shewan, 1971 et Hobbs, 1983).

Lors de l'évolution du poisson, la microflore d'altération dominante sera aérobie stricte. Il a été démontré que des bactéries aérobies strictes comme les *Pseudomonas* sont capables de se multiplier dans les conditions d'anaérobiose du muscle en cours d'altération en fournissant elles-mêmes l'oxygène par réduction de l'OTMA (Barett, 1985).

5. LES MODIFICATIONS POST-MORTEM DU POISSON :

5.1. Evolution au niveau biochimique :

Tout naturellement après la mort du poisson, le tissu musculaire subit des modifications biochimiques liées tout d'abord à l'action autolytique du tissu lui-même puis dues aux enzymes des bactéries d'altération.

On peut proposer la chronologie suivante dans l'apparition et l'enchaînement des différents phénomènes biochimiques. Tout d'abord, le peu de réserves glucidiques disparaît très rapidement pour être métabolisé en acide lactique. Puis le poisson rentre dans une phase de *rigor mortis* liée à la dégradation de l'ATP qui n'est plus régénéré. Il y a formation au niveau musculaire du complexe protéique d'actomyosine. La *rigor mortis* cesse lorsque la protéolyse commence (Amlacher, 1962 cité par Pedrosa, 1988). Les endoenzymes du poisson comme les protéases, les cathepsines et les peptidases conservent leur action temporairement pour commencer à déstructurer le muscle au niveau du collagène par exemple (Bendall, 1969 cité par Pedrosa, 1988). Dans le même temps, il y a formation d'amines biogènes par décarboxylation des acides aminés libres par les endoenzymes (décarboxylases tissulaires) puis par les exoenzymes (décarboxylases bactériennes). Quant aux lipides, ils sont surtout oxydés en donnant principalement des radicaux libres suivant le modèle d'initiation, propagation et terminaison (autooxydation). Les lipides semblent subir aussi l'action d'une lipoxygénase pour donner de petits catabolites volatils comme des dérivés carbonylés et des alcools (Josephson, 1991 et Hsieh, 1989).

5.2. Evolution de la flore :

Les premières étapes de l'altération microbienne sont conduites par les bactéries du contenu intestinal qui envahissent tout l'abdomen et contaminent le tissu musculaire. Dans un

stade avancé, les bactéries de surface pénètrent à travers la peau relâchée et rentrent en contact avec le muscle. On a pu décrire précédemment les différents genres bactériens que l'on pouvait rencontrer. De nombreux auteurs s'accordent à dire que l'évolution de la flore au cours de l'altération tend vers une dominance des *Pseudomonas* (Spencer, 1961 ; Horie, 1972 ; Shewan, 1971 et 1977 ; Skovgard, 1979 ; Simmonds, 1980 ; Hobbs, 1982, Lannelongue, 1982 cités par Vallé, 1996). Les *Pseudomonas* impliqués dans l'altération du poisson ont un faible pourcentage en « Guanine+Cytidine », ils ont été appelés *Alteromonas* puis *Shewanella* (il s'agit du même genre). Une étude réalisée par Hobbs en 1983 témoigne de cette prédominance (tableau 9).

Tableau 9 : Evolution de la flore de la peau de cabillaud (*Gadus morhua*) conservé sous glace (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

Des travaux récents ont démontré que la bactérie d'altération dominante lors d'un conditionnement sous vide ou sous atmosphère modifiée pouvait être *Photobacterium phosphoreum* (Dalgaard, 1993, 1995 et 1998). Contrairement à *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* ne produit pas d'H₂S, et cette bactérie est très résistante au CO₂.

6. LES MODES DE CONSERVATION :

6.1. La température :

6.1.1. Le froid :

La réfrigération (0 – 5°C) : Elle est le mode de conservation le plus utilisé car elle permet de ralentir la croissance des bactéries donc de freiner la dégradation. Seules les bactéries psychrophyles et psychrotrophes poursuivent leurs activités diminuées à ces températures. Dans la majorité des cas, le poisson frais est transporté dans des caisses avec de la glace pilée ce qui facilite l'échange thermique par l'intermédiaire de l'eau de fusion.

La congélation (-18°C) et la surgélation (< -18°C) : A ces températures, l'eau qui se trouve sous forme de cristaux n'est plus disponible pour les bactéries, ce qui stoppe leur développement. Par contre, on peut observer une modification des structures par éclatements cellulaires diminuant les qualités physiques de texture des produits après décongélation. La seule altération chimique observée durant une congélation prolongée est l'autooxydation des lipides (ce phénomène est inhibé au-dessous de -30°C).

6.1.2. Le chauffage :

La mise en conserve : D'après Sainclivier (1983) plus un poisson est altéré, plus les produits de dégradation augmentent au cours de la stérilisation, ce qui souligne l'importance de la qualité initiale du produit. L'effet de la mise en conserve va conduire à une dénaturation irréversible des protéines inhibant le développement des microorganismes. D'autres composés chimiques vont subir aussi ce chauffage : les lipides vont donner des hydroperoxydes, les sucres vont favoriser la réaction de Maillard et les composés azotés vont être plus facilement libérés (Horst, 1984 cité par Sainclivier, 1983).

6.2. Les agent chimiques :

6.2.1. Le salage :

L'action du sel, chlorure de sodium, consiste essentiellement en une déshydratation des tissus, ce qui diminue la disponibilité de l'eau nécessaire dans les réactions chimiques et enzymatiques d'altération (sauf lyase et ligase). Plusieurs types d'action du sel ont pu être proposées : action létale des ions chlorures sur les protéines cellulaires et diminution de la solubilité de l'oxygène (Zugarramurdi, 1976).

Par contre pour les organismes halophiles, la concentration élevée en sel leur est favorable. Ainsi certaines bactéries (microcoques), levures et moisissures peuvent se développer et participer à l'altération. De plus, certaines bactéries halotolérantes, comme *Clostridium botulinum* et *Staphylococcus aureus*, peuvent se développer à faible concentration en sel.

6.2.2. Le fumage :

La composition de la fumée est bien connue (Gilbert, 1975 et Hamm, 1977) : elle compte plus de deux cents constituants parmi lesquels :

- de l'hydrogène, monoxyde de carbone, du dioxyde de carbone ;
- des phénols avec des dérivés méthylés, des éthers oxydes ;
- des acides : formique, acétique, propionique et butyrique ;
- des composés carbonylés, des furanes ;
- des alcools avec le méthanol et l'éthanol ;
- et des esters.

Ces composés vont jouer un rôle sur la coloration, sur l'arôme et sur la texture :

- la couleur du poisson fumé est due principalement à des réactions de Maillard,
- les phénols participent principalement à l'arôme, comme le syringol (2,6-diméthoxyphénol) et le gaïacol (2-méthoxyphénol).

Ces composés ont également une action chimique et antibactérienne. En effet, en plus de la dénaturation d'une partie des protéines sous l'action de la chaleur, les phénols subiraient des réactions de C-Nitrosation qui seraient en concurrence directe avec les réactions de N-Nitrosation, ce qui diminuerait ces derniers (Knowles, 1975). Les phénols ont aussi une action importante d'antioxydant des lipides. Ils réussissent à arrêter la réaction de propagation en étant accepteur des radicaux libres pour former un radical antioxygène de résonance stable (Sainclivier, 1985). Dans le fumage à chaud, c'est surtout la chaleur qui diminue la charge bactérienne alors que c'est la fumée qui y contribue dans le fumage à froid. Très tôt, Shewan (1961 cité par Sainclivier, 1985) a montré l'action bactériostatique du formol et aussi de la fraction des phénols à bas point d'ébullition. Ils inhibent la croissance bactérienne en prolongeant la durée de la phase de latence. Ceci a été mis en évidence sur *Eberthella thypi* et *Staphylococcus aureus*, avec comme principaux inhibiteurs le gaïacol, le méthyl et propyl gaïacol, les crésols, le catéchol, le méthyl catéchol, les pyrogallol et ses méthylesters (Freitheim, 1980).

Il faut savoir par contre que les levures et les moisissures sont peu sensibles à la fumée.

6.2.3. Les phosphates et polyphosphates :

Ils augmentent la capacité de rétention d'eau de la chair de poisson salé et, par leur effet émulsifiant, en améliorent la consistance. Ils sont utilisés en complément de la salaison. Il en existe de structures très diverses. Ils sont strictement interdits en France, non pas parce qu'ils

sont directement toxiques mais ils participeraient au déséquilibre du rapport phosphocalcique dans l'organisme humain (Sainclivier, 1985).

6.2.4. Les nitrates et les nitrites :

Généralement les nitrites sont utilisés pour leur propriété bactériostatique mais aussi dans la viande pour la stabilisation de la couleur par formation de nitrosomyoglobine. Comme les phosphates, ils sont interdits en France mais pour les raisons suivantes (De Saint-Blanquat, 1980) :

- les nitrites sont des hypotenseurs : par eux même,
- le nitrite de sodium peut inhiber la respiration et la phosphorylation oxydative mitochondriale du muscle,
- et surtout, les nitrites entraînent la formation de N-nitrosoamine carcinogène (diméthylnitrosoamine et diéthylnitrosoamine) (Swann, 1975).

Plusieurs auteurs (Kikuchi, 1980 ; Zunft, 1993 ; Ye, 1994 et 1995) ont montré que les nitrites pouvaient être réduits à la place de l'OTMA par des bactéries à Gram négatif et à Gram positif comme *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter*.

6.2.5. Les conservateurs autorisés :

La directive 95/2/CE fixe, entre autres, les différents conservateurs autorisés que l'on peut lister dans le tableau 10.

Tableau 10 : Liste des conservateurs autorisés dans les produits de la pêche (directive (95/2CE)).

N° CEE	Nom	N° CEE	Nom
E200	Acide sorbique	E226	Sulfite de calcium
E202	Sorbate de potassium	E227	Sulfite acide de calcium
E203	Sorbate de calcium	E228	Sulfite acide de potassium
E210	Acide benzoïque	E251	Nitrate de sodium
E211	Benzoate de sodium	E252	Nitrate de potassium
E212	Benzoate de potassium	E310	Gallate de propyle
E213	Benzoate de calcium	E311	Gallate d'octyle
E220	Anhydride sulfureux	E312	Gallate de dodécyle
E221	Sulfite de sodium	E320	Butylhydroxyanisol (BHA)
E222	Sulfite acide de sodium	E321	Butylhydroxytoluène (BHT)
E223	Disulfite de sodium	E315	Acide érythorbique
E224	Disulfite de potassium	E315	Erythorbate de sodium

6.3. Le conditionnement :

Les conditionnements permettent à eux seuls une meilleure conservation des produits.

On peut citer différentes présentations:

- le conditionnement sous film étirable : les poissons ou leurs préparations sont placés sur une barquette en polystyrène, laquelle est ensuite recouverte d'un film étirable de PVC,
- le conditionnement sous-vide,
- le conditionnement sous atmosphère modifiée : le principe est de remplacer l'air dans lequel se trouve le produit par un mélange gazeux. Les gaz utilisés sont surtout le CO₂ (pour ses propriétés bactériostatiques), l'azote (gaz inerte) et l'oxygène (comme inhibiteur du développement de la flore anaérobie stricte). Beaucoup d'études sont réalisées dans ce domaine mais les résultats sont spécifiques du mélange gazeux, de l'espèce et du rapport entre le produit et le volume de gaz, ce qui explique leur disparité (Malle, 1996).

6.4. L'ionisation :

Les études sur ce sujet sont nombreuses et ont débuté voici une quarantaine d'années. On utilise principalement le Cobalt 60 pour l'ionisation de type γ à des intensités variables définies par Justine (1985 cité par Thourret, 1989) :

- la radurisation (1 à 10 kGy) : réduction des microorganismes d'altération,
- la radicidation (3 à 20 kGy) : destruction de la flore pathogène (forme d'aseptisation),
- la radappertisation (40 à 50 kGy) : destruction des micro-organismes d'altération et pathogènes.

7. LES FACTEURS DE DEGRADATION EXTERIEURS AU POISSON :

Sont développés ci-dessous quelques-uns des facteurs qui peuvent avoir une incidence sur la flore de contamination en accélérant les phénomènes de dégradation.

7.1. La pêche :

L'utilisation de chaluts pour les pêches intensives entraîne souvent des « altérations » physiques des poissons au niveau de la peau car ils sont malmenés et écrasés. Toutes ces blessures permettent la pénétration de la flore de contamination. Ce type de pêche occasionne de nombreuses pertes mais qui sont compensées par les volumes importants pêchés. Le retour à des pêches moins industrielles sur des poissons à haute valeur ajoutée semble être la solution à ce problème.

Les poissons ont une charge bactérienne propre en fonction de leur zone de pêche (éloignement des côtes et courants marins). Les saisons et les profondeurs de pêche sont aussi des facteurs qui modifient la contamination du poisson. On peut noter que les seules bactéries présentes naturellement sur le poisson et pathogènes pour l'homme sont *Clostridium*

botulinum et perfringens, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp, *Listeria monocytogenes* (Liston, 1980 et Huss, 1997).

7.2. La transformation des produits :

Il faut éviter l'apport d'une charge bactérienne supplémentaire au cours du procédé de fabrication, car ceci accélérerait significativement son altération par une flore de contamination. Toutes les étapes de préparation et de transformation sont soumises à une réglementation stricte en matière de conditions sanitaires et d'hygiène (arrêté du 28 décembre 1992 portant sur la réglementation des conditions d'hygiène applicables dans les établissements de manipulation des produits de la pêche). Ceci s'applique aussi bien aux produits frais depuis le filetage jusqu'aux produits transformés conditionnés (mis en conserve, salés ou fumés). Par exemple, l'éviscération qui a pour but d'éliminer la principale source de bactéries contenues dans l'abdomen, doit être effectuée dans de bonnes conditions pour éviter le souillage de la chair de poisson (La charge bactérienne peut être réduite jusqu'à 80 % par une bonne éviscération, Georgala (1957)). Ces étapes ont été très nettement améliorées par la mise en place dans les entreprises de plan HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point).

7.3. L'eau :

L'eau de nettoyage doit avoir une bonne qualité microbiologique. Cela est d'autant plus important pour l'eau utilisée pour la conservation sous-glace. En effet, l'avantage de la glace est de produire de l'eau de fusion qui est directement en contact avec la chair de poisson. Par conséquent, les risques de contamination du produit par de la glace de mauvaise qualité sont importants.

7.4. Le transport :

On peut juste citer ce paragraphe pour mémoire car le maintien de la chaîne du froid est primordial pour un produit comme le poisson pour lequel les variations de température accélèrent très nettement la dégradation.

8. CARACTERISATION DE LA FRAICHEUR :

L'inconvénient majeur d'une denrée alimentaire comme le poisson est que l'on ne peut maîtriser son altération et que l'estimation de son niveau de fraîcheur est très difficile. Nous présentons ci-dessous les méthodes actuelles permettant de caractériser le niveau d'altération du poisson en précisant pour chacune ses avantages et inconvénients.

8.1. Les méthodes sensorielles (Indice de fraîcheur) :

La détermination de l'indice de fraîcheur (IF) se fait à l'aide d'une analyse organoleptique basée sur plusieurs critères. Pour les poissons entiers, ce type d'interprétation de la qualité des produits est la meilleure. En effet, lorsque l'on peut utiliser un maximum de critères (peau, œil, branchies, mucus, rigidité de la chair) et de surcroît si l'on a affaire à un notateur expérimenté, on peut facilement comprendre la justesse de l'IF. Pour être le plus objectif possible, on s'appuie sur le règlement (CE) n° 2406/96 du conseil du 26 novembre 1996 fixant les normes communes de commercialisation pour certains produits de la pêche (JOCE du 23/12/96). Un extrait de ce règlement, présenté ci-dessous, nous sert de référence.

Tableau 11 : Extrait du règlement n° 2406/96 du conseil du 26 novembre 1996.

PEAU	Critères			
	catégories de fraîcheur			
	3	2	1	0
<i>*pour le carrelet et le tacaud</i>	Pigmentation vive et iridescente, couleurs vives	Pigmentation vive mais perte de l'éclat	Pigmentation ternie en voie de décoloration	Pigmentation ternie
<i>*pour le merlan:</i>	Brillance ; nette différence entre les surfaces dorsale et ventrale	Perte de la brillance et de l'éclat ; moins de différence entre les surfaces dorsale et ventrale	Couleurs délavées ; peau plissée lorsque l'on courbe le poisson	Pigmentation très ternie ; la peau se détache de la chair
MUCUS CUTANE	Aqueux, transparent	Légèrement trouble	Laiteux	Gris jaunâtre, opaque
ŒIL	Convexe(bombé) ; pupille noire brillante ; cornée transparente	Convexe et légèrement affaissé ; pupille ternie ; cornée légèrement moins opalescente	Plat ; cornée opalescente(voilé e chez le merlan) ; pupille opaque	Concave au centre ; pupille grise ; cornée laiteuse
BRANCHIES	Couleur vive ; pas de mucus	Couleur moins vive ; mucus transparent	Perte de la couleur ; mucus opaque	Couleur jaunâtre ; mucus laiteux

ODEUR des branchies	3	2	1	0
<i>*pour le tacaud:</i>	D'algues marines	Odeur neutre	Fermentée ; légèrement aigre	Aigre
<i>*pour le carrelet:</i>	D'huile fraîche ; poivrée ; odeur de terre	D'huile ; d'algues marines ou légèrement douceâtre	D'huile ; fermentée ; defraîchie ; un peu rance	Aigre
<i>*pour le merlan</i>	D'algues marines fraîches ; âcre ; iodée	Absence d'odeur ou odeur d'algues marines ; odeur neutre	Odeur grasse un peu sulfureuse, de lard rance ou de fruit pourri	Odeur aigre de putréfaction

CHAIR	3	2	1	0
<i>*pour le carrelet et le tacaud:</i>	Ferme et élastique ; surface lisse	Moins élastique	Légèrement molle(flasque) ; moins élastique ; surface cireuse et ternie	Molle ; les écailles se détachent facilement de la peau ; surface plutôt plissée
<i>*pour le merlan</i>	Très ferme ; rigide	Assez rigide ; ferme	Un peu molle	Molle(flasque)

La mesure de l'IF est d'intérêt limité car elle ne peut se faire avec précision que sur des poissons entiers. De plus elle nécessite de faire appel à des personnes expérimentées (sans cesse formées pour entretenir leur compétence) suivant un protocole strict dans des locaux spécialement aménagés.

8.2. Les méthodes microbiologiques :

La problématique de la relation entre les microflores bactériennes des poissons marins et l'évaluation de l'altération est la suivante : la diversité des microflores des poissons ne permet pas de disposer de critères microbiologiques fiables, par ailleurs les déterminations microbiologiques ne peuvent-être négligées compte-tenu des limites des méthodes sensorielles et des méthodes chimiques, des travaux ont donc été développés pour optimiser les dénombrements de bactéries impliquées dans l'altération.

Les critères microbiologiques réglementaires de l'arrêté du 21 décembre 1979 comprennent le dénombrement des flores aérobies mésophiles y compris pour les poissons : les déterminations sont effectuées à 30°C sur des géloses dénombrement sans addition de NaCl. La flore totale ne peut permettre une évaluation de l'altération, mais des travaux développés pour optimiser ces dénombrements ont permis de mettre à jour des exigences spécifiques des bactéries des poissons. Ainsi la prise en compte de la concentration en NaCl est nécessaire pour obtenir des dénombrements fiables. Le caractère halophile des microorganismes des poissons marins est souligné dans la bibliographie, mais il apparaît que la concentration en NaCl optimale est voisine de 1,5% et non de 3,5% comme cela est proposé dans les milieux dits « à l'eau de mer ». On est donc plutôt en présence de bactéries halophiles modérées à caractère psychrotrophe (Valle, 1998).

D'autres travaux (Malle, 1998) ont été engagés pour cibler des bactéries plus spécifiques de l'altération. Une des caractéristiques de la flore d'altération est la présence d'un nombre

élevé de bactéries productrices d'H₂S. Il faut noter d'autre part que les protéines du muscle du poisson contiennent une proportion relativement élevée d'acides aminés soufrés dégradés en H₂S par ces bactéries. Ceci a conduit Gram (1987) à proposer la recherche de bactéries productrices H₂S. Les souches bactériennes productrices d'H₂S sont majoritairement constituées de *Shewanella putrefaciens*, cette bactérie représentant 69 % de la flore H₂S au 5ème jour de conservation et 100 % de celle-ci au 15ème jour. Son mode de culture a été étudié et il apparaît qu'elle a besoin en moyenne de 1,68 % de NaCl et que son dénombrement optimal a été obtenu sur PCA-H₂S (milieu PCA modifié) supplémenté en NaCl, incubé à 25°C. Le dénombrement de la flore aérobique totale a été simultanément réalisé sur ce milieu : la proportion de la flore H₂S par rapport à la flore aérobique totale augmentait légèrement au cours de l'altération, mais cette proportion est variable. Les modélisations réalisées à partir des dénombrements de la flore H₂S sont de type sigmoïde. Les modèles ont montré que lorsque des poissons conservés entiers ou éviscérés sous glace à 0°C n'étaient plus consommables, la flore H₂S dépassait 10.000 ufc/g.

8.3. Les méthodes chimiques :

Depuis 1937, Beatty a montré que l'évolution des composés aminés volatils se corrélait avec l'évolution bactérienne dans un extrait de jus de poisson. La méthode chimique qui fait référence en routine est la mesure de l'ABVT et de la Triméthylamine par entraînement à la vapeur (Malle, 1987 et 1989). L'intérêt majeur de cette technique est qu'elle est rapide et peut être facilement mise en place. Par contre ses limites sont importantes puisqu'elle permet surtout de déterminer un seuil de rejet des poissons (stade d'altération avancé impropre à la consommation) (tableau 12). En plus, elle ne peut pas être appliquée à toutes les espèces de poissons, de manière générale on exclut les thonidés, les poissons gras en général. Il faut aussi

limiter cette analyse aux produits qui n'ont pas subi de transformations comme la cuisson, la salaison, la fumaison ou qui sont préemballés.

Tableau 12 : Valeurs seuils de référence de l'ABVT en mg pour 100 g de muscle.

Téléostéens	Sélaciens	Conclusions
<20	<30	ABVT satisfaisant
20 à 30	30 à 65	ABVT acceptable
> 30	> 65	ABVT non satisfaisant

Au niveau chimique, c'est la mesure d'ABVT qui fait référence par la décision de la commission du 8 mars 1995 (95/149/CE) fixant les valeurs limites en azote basique volatil total pour certaines catégories de produits de la pêche.

En raison des limites inhérentes aux deux méthodes décrites auparavant, l'exploration et l'étude de nouvelles méthodes sont d'actualité. Nous pouvons citer sans entrer dans les détails les différentes approches utilisées pour essayer de caractériser la fraîcheur d'un poisson :

- ◆ Mesure de l'oxydation des acides gras.
- ◆ Caractérisation de la dégradation des protéines (actine, myosine et collagène principalement).
- ◆ Quantification des dérivés nucléotidiques de l'ATP.
- ◆ Détermination d'indice d'évolution des amines biogènes.

8.4. Les méthodes physiques :

C'est un chapitre que l'on tend à oublier car les méthodes physiques sont souvent délaissées à cause du peu de progrès techniques dans ce domaine et du peu d'intérêt à travailler sur le poisson. Nous allons en décrire ci dessous les principales applications.

Texture : Les mesures sont réalisées sur plusieurs paramètres (résistance, compression, relaxation...) où s'applique systématiquement le ratio force-déformation (Bourne, 1982 cité par Heia, 1997 et Borderias, 1983). Toute la difficulté est de pouvoir analyser un échantillon homogène. Chamberlain (1994) a mis au point le FSD (Fish Shearing Device : appareil à cisailer le poisson) qui semble donner une bonne indication de la fraîcheur en s'appuyant sur la corrélation avec la force de cisaillement.

Propriétés électriques : L'altération du poisson entraîne la dégradation des cellules membranaires ; induisant la libération des fluides intracellulaires dans l'espace intercellulaire, et une diminution de la résistance et de la capacitance (Jason, 1975). Il existe trois appareils (le torryster, l'intellectron fishtester et le RT-freshness grader) qui permettent de déterminer le nombre de jours sous glace sous certaines conditions. Les applications sont limitées puisqu'elles permettent seulement d'analyser les poissons entiers non abîmés et non congelés (également les filets mais dans des conditions de salinités précises) (Hoffmann, 1981 et Sakaguchi, 1992).

Mesure de la couleur : Trois paramètres sont utilisés : - la brillance (L),

- le rapport rouge/vert (a),

- le rapport jaune/bleu (b).

L'une des premières références appliquées au poisson pour ces nouvelles méthodes date de 1985 par les travaux de Young. Depuis, plusieurs auteurs se sont intéressés à ces méthodes mais sans réel succès car il y a beaucoup de contraintes malgré l'avancée des technologies (Silva, 1995 ; Magnusson, 1996 et Laroche, 1996).

Spectroscopies : D'après Heia (1997), il semble que cet axe de recherche soit prometteur dans la caractérisation des aliments en général. Manohar (1971) et Davis (1982) ont utilisé une mesure de fluorescence pour évaluer la fraîcheur sur le tissu musculaire. Nagashima (1990) a, quant à lui, mis en évidence une modification du liquide oculaire du thon en ultra violet. D'autres études en spectroscopie infra-rouge ont montré des résultats intéressants sur le saumon (Downey, 1996).

MATERIELS ET
METHODES

1. DERIVES NUCLEOTIDIQUES :

Pour séparer les dérivés nucléotidiques, nous nous sommes tournés vers l'utilisation de la CLHP car leurs caractéristiques d'absorption permettent une détection en ultra-violet.

1.1. Solutions :

Les solutions standards d'ATP, ADP, AMP, IMP, GMP, hypoxanthine, inosine, guanine, guanosine sont utilisées à 1 mg/mL dans l'HClO₄ 0,6 M.

La purine sert d'étalon interne à une concentration de 300 mg/mL.

1.2. Matériels :

La CLHP est réalisée sur une colonne HYPERSYL BDS C₁₈ 3 µm, 100 Å (15 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 dérivés nucléotidiques sont visualisés à 254 nm par l'intermédiaire d'un détecteur SPD-6A (Shimadzu) couplé à un logiciel d'intégration Class VP (Shimadzu). Les injections sont réalisées à l'aide d'un injecteur automatique SIL-6B (Shimadzu).

1.3. Méthodes :

10 g de chair de poisson sont broyés en présence de 50 mL d'acide perchlorique (HClO₄) 0,6 M dans un ultraturrax à 0°C. La solution est centrifugée à 12500 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est amené à pH 6,5-6,8 par addition de KOH 2 M (neutralise l'acide perchlorique par précipitation). La solution est placée à 4°C pendant 15 min (précipitation de l'HClO₄) et filtrée à 0,2 µm avant injection (20 µl) en CLHP.

2. DOSAGE DU COLLAGÈNE :

Il existe plusieurs méthodes de récupération du collagène à partir du tissu musculaire comme celle décrite par Fuji (1982) utilisant une extraction par agitation magnétique à l'aide de la solution Hasselbach-Schneider. Plus récemment Stratford (1990) a proposé une méthode de dosage de l'hydroxyproline par CLHP par couplage avec le 7-chloro-4-nitrobenzofurazan et séparation en chromatographie de phase inverse. Nous n'avons pas retenu dans un premier temps ces méthodes qui demandent des mises au point importantes et qui sont longues et fastidieuses à mettre en place dans le cas d'une utilisation en contrôles de routine.

Nous développerons les deux méthodes suivantes :

2.1. PAR DIGESTION ENZYMATIQUE PAR LA PAPAÏNE :

2.1.1. *Réactifs :*

Solution de papaïne à 5 % en eau physiologique.

Alcool éthylique à 90°.

2.1.2. *Matériels :*

Erlenmeyer ou flacon de 100 mL

Tamis métallique inoxydable dont le calibre des mailles est inférieur à 1 mm²

Etuve à dessiccation à 100°C

2.1.3. *Protocole :*

- S'assurer que le pH du produit à examiner est inférieur ou égal à 6, sinon l'ajuster.

- Peser une prise d'essai de 10 grammes, la fragmenter et l'introduire dans un erlenmeyer, puis ajouter 20 mL de la solution de papaïne à 5 %.
- Agitation magnétique de l'erlenmeyer pendant 75 minutes.
- Recueillir la partie non digérée sur le tamis préalablement taré (P1).
- Laver avec 200 mL d'eau à 45°C, puis délipider par trempage dans l'alcool éthylique et dessécher à l'étuve à 100°C.
- La partie non digérée, délipidée, déshydratée et desséchée sur le tamis taré est pesée (P2).

Poids sec de l'indigéré délipidé : $P = P2 - P1$

2.2. PAR DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE :

2.2.1. Réactifs :

HCl à 50 % volume à volume (6 N)

NaOH 32 %

Isopropanol

Solution oxydante : 1 volume de n° I pour 4 volume de n° II

n° I : 10,5 g de Chloramine T qsp 100 mL.

n° II : 28,5 g d'Acétate de sodium 3 H₂O
22,2 g de Citrate de sodium 5.5 H₂O
ou 18,3 g si Citrate de sodium 2 H₂O
2,75 g d'Acide citrique
192,5 mL d'Isopropanol
et compléter à 500 mL avec de l'eau déminéralisée.

Acide perchlorique à 17,5 %.

PDMAB (ParaDiMéthylAminoBenzaldéhyde) à 5 % dans l'isopropanol.

2.2.2. Matériels :

Bain de sable et bain-marie à 90°C

pH-mètre et spectrophotomètre

2.2.3. **Protocole :**

- Peser 2 à 3 g de produit.
- Ajouter 50 mL d'HCl à 50%.
- Hydrolyser une nuit sur le bain de sable.
- Refroidir.
- Neutraliser avec 28 mL de NaOH et ajuster au pH neutre (entre 6 et 7).
- Ajuster à 100 mL (fiole jaugée).
- Filtrer.
- Faire des dilutions 1/10, 1/20.
- Prélever : 1 mL de solution
 - et ajouter : - 2 mL d'isopropanol
 - 1 mL de solution oxydante préparée
 - agiter puis faire reposer 10 minutes
 - 3 mL d'acide perchlorique 17,5%
 - 2 mL PDMAB.
- Homogénéiser le contenu des tubes.
- Laisser 20 minutes au bain marie à 60°C.
- Refroidir 5 minutes sous courant d'eau froide.
- Ajuster à 10 mL avec de l'isopropanol.
- Agiter.
- Lecture au spectrophotomètre à 560 nm.

Gamme étalon : Préparer une solution d'hydroxyproline à 400 µg/mL (0,2 g dans 500 mL), puis faire des dilutions à 10 µg/mL, à 20 µg/mL et à 30 µg/mL.

Calcul du pourcentage d'hydroxyproline :

Formule générale :

% OH-Pro en mg pour 100 g de poisson = ((masse OH-Pro en g x volume de la fiole x dilution) / masse de la prise d'essai) x 100.

Formules utilisées :

% OH-Proline totale = $((X \cdot 10^{-6} \times 100 \times 5) / 10) \times 100$

% OH-Proline libre = $((X \cdot 10^{-6} \times 50) / 5) \times 100$

3. AZOTE BAZIQUE VOLATIL TOTAL (ABVT) ET TMA :

Les deux méthodes sont référencées : - dosage de l'ABVT mise au point par Billon en 1979

- dosage de la TMA proposé par Malle en 1987.

3.1. Matériel :

Les dosages de l'ABVT et de la TMA sont réalisés à l'aide d'un appareil d'entraînement à la vapeur automatique de type Kjeldahl (Foss tecator, 2200 Kjeltec).

3.2. Méthodes :

- dosage de l'ABVT :

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

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

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

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

- dosage de la triméthylamine :

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

4. AMINES BIOGENES :

La méthode que nous utilisons est dérivée de celle de Smith et Davis (1985) adaptée pour le poisson (Malle, 1992 ; Malle, 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 par une phase organique. Elles sont ensuite analysées par CLHP (chromatographie liquide à haute performance).

4.1. Solutions :

La solution de chlorure de dansyl (C.D.) (Sigma) est utilisée à 7,5 mg/ mL d'acétone et conservée à -20°C à l'abri de la lumière.

Les solutions standards (Sigma) de putrescine dichlorhydrate, de cadavérine dichlorhydrate, d'histamine dichlorhydrate, de spermidine trichlorhydrate, de spermine tétrachlorhydrate, et de 1,3-diaminopropane dichlorhydrate, sont utilisées à 0,8 mg/mL d'eau distillée et conservées à 5°C.

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

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

4.2. Matériel :

La CLHP 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 logiciel d'intégration Class VP (Shimadzu). Les injections sont réalisées à l'aide d'un injecteur automatique SIL-6B (Shimadzu) équipé d'un système de réfrigération.

4.3. Méthode :

Extraction :

5 g de chair de poisson sont broyés par un ultraturrax à 20000 tr/min en présence de 10 mL d'acide perchlorique 0,2 M et 100 µl de la solution de 1,3-diaminopropane. Le broyat est ensuite centrifugé à 12500 g pendant 5 min à 2°C.

Dérivation :

Dans un tube à bouchage hermétique on introduit :

- 100 µl du surnageant d'extraction ou 100 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),
- 300 µl de Na₂CO₃ saturé (pour neutraliser l'acide : pH > 9),
- 400 µL de la solution de chlorure de dansyl.

Le mélange est agité et porté à 60°C pendant 5 min à l'obscurité.

Après avoir laissé refroidir le tube, on ajoute 100 µl de la solution de L-proline (neutralisation de l'excès de chlorure de dansyl). On agite et on laisse le tube 15 min à température ambiante et à l'obscurité.

Récupération :

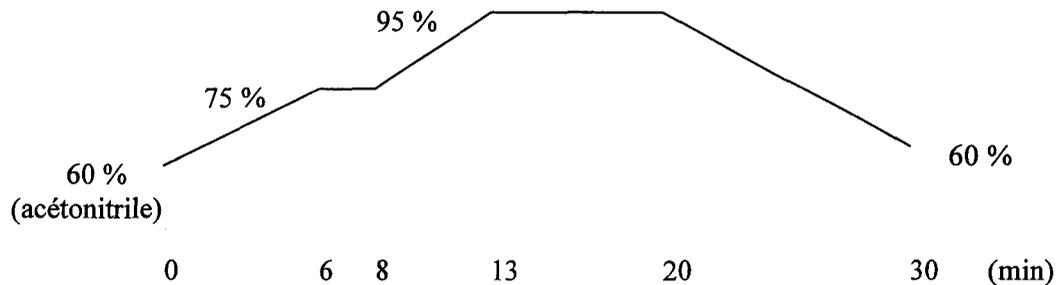
La solution est démixée après ajout de 1,5 mL de toluène et agitation vigoureuse. Les dérivés d'amines biogènes sont récupérés dans la phase organique.

Après décantation, la phase organique est récupérée après congélation de la phase aqueuse et évaporée à froid sous flux d'azote.

Le résidu sec est repris par 200 µl d'acétonitrile et filtré à 0,2 µm avant d'être injecté en CLHP.

4.4. Gradient :

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



4.5. Test organoleptiques :

Le test organoleptique est représenté par l'Indice de Fraîcheur qui est défini dans le chapitre 8.1 des généralités. Pour les différentes études réalisées, les notateurs disposent d'une table qui caractérise les différents critères afin d'être le plus objectif mais aussi d'être le plus homogène. Chaque notateur réalise son analyse organoleptique seul et il remplit une fiche récapitulative avec chacun des critères (ceci nous permet une traçabilité des échantillons). Chaque échantillon est exprimé par son jour d'altération (1^{er} chiffre) et par son numéro d'ordre (2^{ème} chiffre) : ex : 8.3 est le 3^{ème} poisson du 8^{ème} jour.

4.6. Outil informatique :

Le logiciel statistique utilisé est le logiciel SAS, version 6.. Les résultats sont obtenus à partir des procédures GLM (General Linear Models), utilisant la méthode des moindres carrés. Les modèles ajustés sont tout d'abord des modèles de régression linéaire simple sans coefficient constant pour déterminer un coefficient de réponse ; puis des modèles d'analyses

de covariance permettent d'étudier les éventuels effets de l'espèce du poisson et du stade d'altération.

5. COMPOSES VOLATILS :

5.1. Chromatographie gazeuse :

5.1.1. Matériel :

La chromatographie de phase gazeuse est réalisée sur un appareil GC 17-A (Shimadzu) doté d'un régulateur électronique de débit, d'un injecteur split, d'un détecteur par ionisation de flamme.

Les colonnes : - une méthyl-silicone de diamètre 0,18 mm et d'une longueur de 20 m avec un film de 6,0 μm (Quadrex, LMW amine).

- poly(diméthylsiloxane) de diamètre 0,25 mm et d'une longueur de 60 m avec un film de 0,25 μm (Supelco, SPB-1).

5.1.2. Méthode :

Il ne s'agit en aucun cas d'une optimisation mais plutôt d'une première approche pour réussir à visualiser les composés.

♦ *paramètres chromatographiques*

Pression : 151 Kpa (LMW amine) ; 73 Kpa (SPB-1)

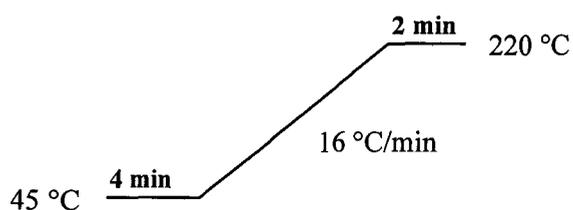
Débit : 0,6 mL (LMW amine) ; 1 mL (SPB-1)

Injection : splitless

Température : - injecteur 220 °C

- détecteur 300 °C

- gradient de température



♦ *méthode de préparation headspace*

La technique d'injection est basée sur le système headspace, avec des prises d'échantillons d'1 mL à l'aide d'une seringue à gaz (figure 9).

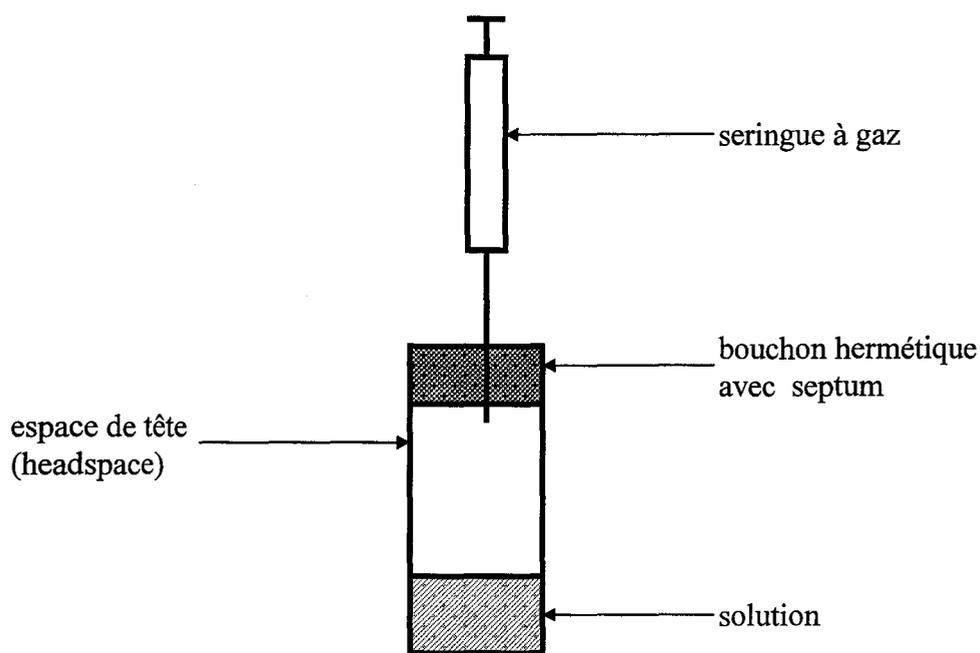


Figure 9 : Représentation schématique du système de prélèvement des composés volatils.

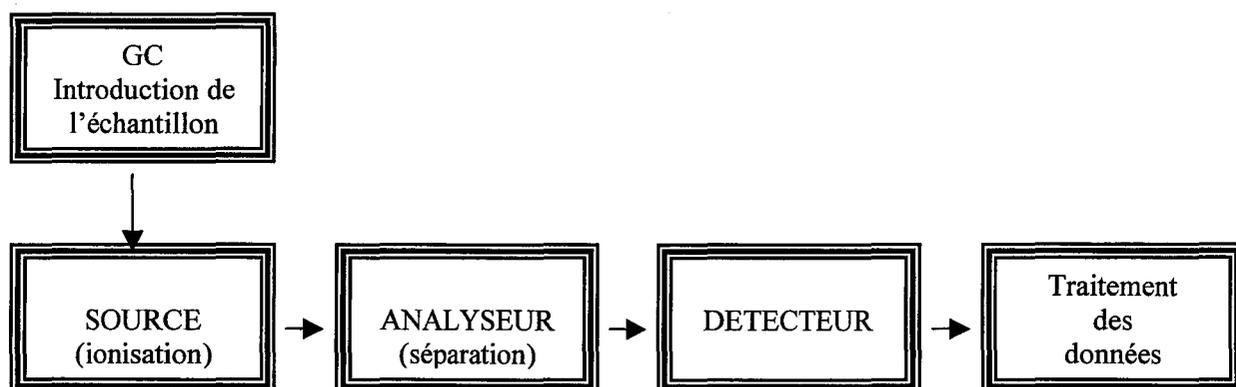
5.2. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse réunit une famille de techniques, dont chacune est basée sur un principe différent (ionisation et analyseur). Les performances et les spécificités d'un

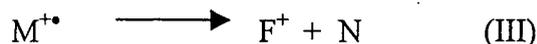
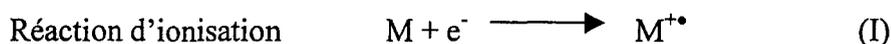
instrument (sensibilité, résolution, précision et domaine de masse) vont dépendre de sa configuration. Les techniques de désorption d'atomes rapides (FAB), électrospray (ES) et matrice assistée par désorption laser (MALD) permettent l'analyse de substrats polaires de haute masse moléculaire et sont un complément aux techniques utilisées pour les substrats volatils comme l'impact électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI).

Le spectromètre de masse est composé de plusieurs parties (figure 10). Dans le couplage, on ajoute une autre partie : le chromatographe.

Figure 10 : Les différentes parties d'un spectromètre de masse couplé à la chromatographie gazeuse.

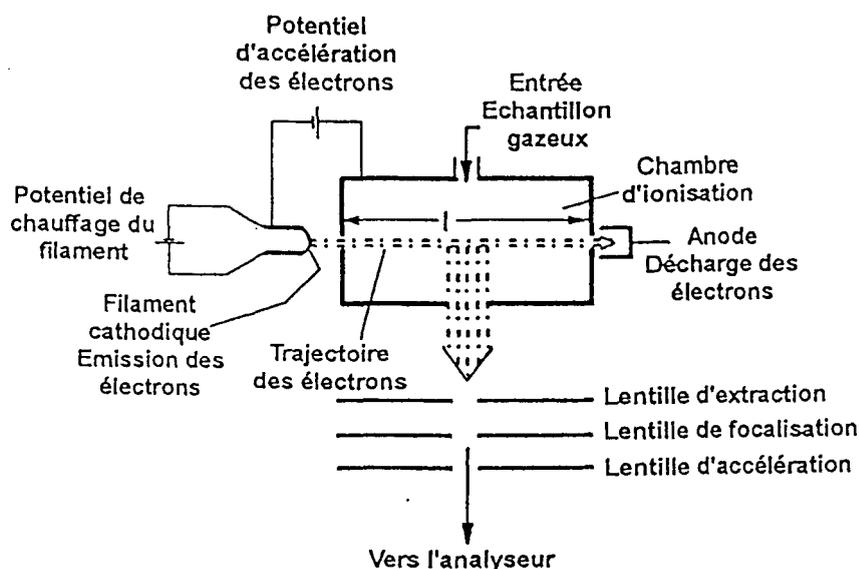


L'ionisation par impact électronique (EI) est une technique de routine. Un filament chauffé émet des électrons. Ceux-ci sont accélérés vers une anode, et « entrent en collision » avec les molécules gazeuses de la source (figure 11). L'interaction génère des ions moléculaires de type radical cation $M^{+\bullet}$ (I). Dans les conditions standards d'analyse, pour des électrons ayant une énergie de 70 eV, un excès d'énergie est transféré vers les ions formés et provoque leur fragmentation spontanée obéissant aux règles des équations (II) et (III). L'analyseur sépare les ions formés en fonction du rapport m/z de la masse au nombre de charge.



M, F, R et N désignent respectivement, la molécule d'échantillon, un fragment, un radical ou une molécule neutre.

Figure 11 : Schéma d'une source par impact électronique.



L'analyse est réalisée par un quadropôle. Un analyseur quadripolaire est un assemblage de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique. Les électrodes opposées sont au même potentiel qui est la somme de deux composantes : une composante continue (U) et une sinusoïdale (V) à haute fréquence (ω). Les ions se trouvant dans l'analyseur vont osciller entre les barres et seuls ceux ayant un m/z donnés vont traverser le quadripôle et être intégrés en un spectrogramme de masse à l'aide du logiciel LUCY 1. Version 495. Le profil de spectromètre de masse est analysé dans une banque de données (intégrée dans le logiciel LUCY 1.) à l'aide de coefficient de similitude afin de faciliter l'identification des composés d'origine diverse.

RESULTATS ET

DISCUSSIONS

1^{ère} Partie : les dérivés nucléotidiques.

Le but de ce travail est de réussir à doser les différents dérivés nucléotidiques dans des échantillons de poissons et d'en déterminer leurs évolutions au cours de l'altération afin que cette méthode puisse par la suite être utilisée directement pour estimer le degré de fraîcheur des poissons analysés.

Tout d'abord, la mise au point de la méthode de séparation nécessite de fixer les paramètres chromatographiques (débit, gradient, pH du tampon) pour obtenir des chromatogrammes ayant une bonne sélectivité (c'est-à-dire des pics suffisamment espacés entre eux) et une bonne efficacité (c'est-à-dire des pics très fins). En effet, nous travaillons sur des dérivés nucléotidiques qui ont des caractéristiques différentes liées à leur structure (base, nucléosides, nucléotides). On développe donc d'abord les essais sur des solutions standards.

A l'issue de cette première étape, nous pourrions mettre en application ce dosage en continu sur des échantillons quotidiens de poissons conservés plusieurs jours sous glace fondante.

Le travail de cette partie s'appuie :

- sur le chapitre 3.4.2 des généralités
- sur le chapitre 1 des matériels et méthodes

1. ETUDE SUR DES SOLUTIONS STANDARDS :

Il faut commencer par identifier le temps de rétention de chacun des composés à l'aide de standards avant de faire des recherches sur les paramètres permettant d'obtenir la meilleure séparation.

1.1. Identification des différents témoins :

Pour identifier les témoins, on peut utiliser la méthode par ajout. On passe d'abord un seul échantillon de standard puis on lui ajoute un deuxième, un troisième ou même d'avantage facilitant l'interprétation des chromatogrammes.

Pour cette identification des témoins et le calibrage de la colonne, on a utilisé du tampon phosphate à 0,04 M à pH 7, on a fixé (arbitrairement) son débit à 0,8 mL/min et on a choisit un gradient isocratique en tampon phosphate avec 0 % en acétonitrile (paramètres fixés par défaut pour débiter les premiers essais).

Tableau 13 : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques.

	IMP + GMP	ATP	ADP	AMP	Hx + Guanine
IMP	3,473				
IMP + ATP	3,475	4,437			
IMP + ATP + ADP	3,482	4,423	4,948		
IMP + ATP + ADP + GMP	3,443	4,405	4,955		
GMP	3,408				
IMP + ATP + ADP + GMP + AMP	3,453	4,4	4,982	6,182	
IMP + ATP + ADP + GMP + AMP + Hx	3,47	4,418	5,017	6,232	8,032
IMP + ATP + ADP + GMP + AMP + Hx + Guanine	3,475	4,413	5,027	6,25	8,045
Guanine					7,882

On a ainsi les temps d'éluion correspondant à chacun des témoins (tableau 13), ce qui nous permettra de les identifier dans les échantillons de poisson en ayant aussi leur ordre de sortie.

Maintenant que l'identification des différents composés est réalisée, on va pouvoir optimiser la méthode de séparation en modifiant les différents paramètres (débit, gradient, température, pH).

1.2. Variation du débit de tampon :

On s'est placé dans les mêmes conditions qu'auparavant : KH_2PO_4 à 0,04 M à pH 7 et à 0% en acétonitrile mais on a fait varier le débit du tampon : de 0,5 à 0,8 mL/min.

Tableau 14 : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction du débit.

	IMP +GMP	ATP	ADP	AMP	Hx + Guanine
Débit 0,8 mL/min					
IMP + ATP + ADP + GMP + AMP + Hx	3,39	4,258	4,825	5,983	7,697
IMP + ATP + ADP + GMP + AMP + Hx + Guanine	3,387	4,24	4,817	5,977	7,68
Débit 0,7 mL/min	3,842	4,798	5,462	6,772	8,705
Débit 0,6 mL/min	4,373	5,365	6,122	7,58	9,712
Débit 0,5 mL/min	5,195	6,363	7,257	8,978	10,703

D'après nos résultats (tableau 14), on fixe le débit optimal à 0,7 mL/min car il nous permet d'obtenir une bonne séparation dans un délai d'analyse raisonnable.

1.3. Variation du pourcentage en acétonitrile :

Afin de déterminer la meilleure séparation en un minimum de temps, on a fait des essais avec toujours le même débit (0,7 mL/min) mais en fixant différents pourcentages constants en acétonitrile au cours du temps.

Tableau 15 : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction de gradients isocratiques.

	IMP +GMP	ATP	ADP	AMP	Hx + Guanine	HxR + Guanosine
Acétonitrile 1%	3,997	4,943	5,61	6,912	8,837	
Acétonitrile 2%	3,822	4,742	5,405	6,695	8,597	
Acétonitrile 3%	3,023		3,527	4,025	5,188	
Acétonitrile 4%						3,488
Acétonitrile 5%						4,505
Acétonitrile 6%						4,455
Acétonitrile 7%						3,857

Les gradients isocratiques de 1% et 2% permettent d'obtenir les séparations ayant la meilleure efficacité et sélectivité d'après le tableau 15.

Dans un deuxième temps, on a cherché à séparer l'inosine et la guanosine qui ont des temps de rétention plus longs que les dérivés précédents. De plus, malgré leur sortie plus tardive ils sont coélus. Pour cela nous avons réalisé plusieurs essais de séparation, où le meilleur compromis se situe à 1,5% (tableau 16).

Tableau 16 : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques à 1,5% d'acétonitrile.

Acétonitrile 1,5%	HxR	Guanosine
HxR	19,148	
Guanosine		16,023
HxR + Guanosine	13,795	15,108
HxR	13,28	
Guanosine		14,395
HxR + Guanosine	12,9	14,09
HxR	13,015	
Guanosine		13,73
HxR + Guanosine	12,72	13,817

Il est intéressant de noter en comparant les temps de rétention du tableau 16 qu'il faut bien conditionner la colonne avec du tampon (au repos la colonne est dans un mélange acétonitrile/eau 60/40 (v/v)) car on remarque qu'au fur et à mesure les temps de rétention diminuent progressivement pour se stabiliser à environ 13 min.

1.4. Essais de gradient en acétonitrile :

Après les premiers essais en mode isocratique qui ont permis de déterminer les meilleures concentrations en phase mobile, nous proposons, tableau 17 et 18, différents gradients afin de réduire au maximum la durée de l'analyse, tout en conservant une séparation optimale.

Tableau 17 : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction du gradient.

0,7 mL/min	IMP +GMP	ATP	ADP	AMP	Hx + Guanine	HxR	Guanosine
<p>0% ——— 3% 0 2 4 (min)</p>	3,453	4,3	4,9	6,31	8,372		
<p>0% ——— 3% 0 7</p>	3,808	4,7	5,36	6,65	8,56		
<p>0% ——— 4% 0 7</p>	3,812	4,71	5,38	6,67	8,57		
<p>0% ——— 2% 0 14</p>						16,445	17,647

Tableau 18 : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction du gradient.

0,7 mL/min	IMP	ATP	ADP	AMP	Hx	Purine	HxR	Guanosine
Acétonitrile 0%	3,59	4,23	4,8	5,95	7,88	16,93	29,13	32,09
<p>0% ——— 5% 0 1,5 8</p>	3,59	4,23	4,8	5,93	7,91	15,1	16,72	16,89
<p>0% ——— 1,5% 0 4</p>	3,73	5,04	5,66	6,75	8,31	14,158	17,17	17,77

En comparant les tableaux 17 et 18, le gradient qui offre la meilleure séparation et le plus rapidement est celui qui passe de **0 à 1,5% en acétonitrile en 0 à 4 minutes pour une durée totale d'analyse de 20 min.**

1.5. Variation de la température au niveau de la colonne :

On a fait varier la température de la colonne à l'aide d'un bloc thermoréglable en utilisant les conditions définies précédemment.

Tableau 19 : Temps de rétention des différents dérivés nucléotidiques en fonction de la température.

Température	IMP	ATP	ADP	AMP	Hx	Purine	HxR	Guanosine
25 °C	4,172	5,573	6,17	7,205	8,645	15,638	19,73	20,662
	4,135	5,512	6,1	7,132	8,563	14,707	17,735	18,503
30°C	3,912	5,01	5,522	6,455	7,725	13,892	16,338	16,858
35°C	3,648	4,48	4,895	5,682	6,838	12,698	14,835	15,287
40°C	3,555	4,272	4,667	5,423	6,425	12,398	14,128	14,478

On a utilisé des températures (tableau 19) supérieures à la température ambiante afin de pouvoir les réguler car notre appareil ne réfrigère pas. Les essais à 30°C, 35°C, 40°C ont permis de diminuer le temps d'analyse de quelques minutes mais au détriment de la sélectivité des composés. On va donc régler la température à **25°C** pour la suite des essais.

1.6. Variation du pH du tampon :

En conservant les autres paramètres, on a fait varier les valeurs du pH de 4,6 à 8 en passant par 5, 6 et 7. On peut visualiser les résultats sur les figures 12, 13, 14 qui représentent les stades les plus intéressants.

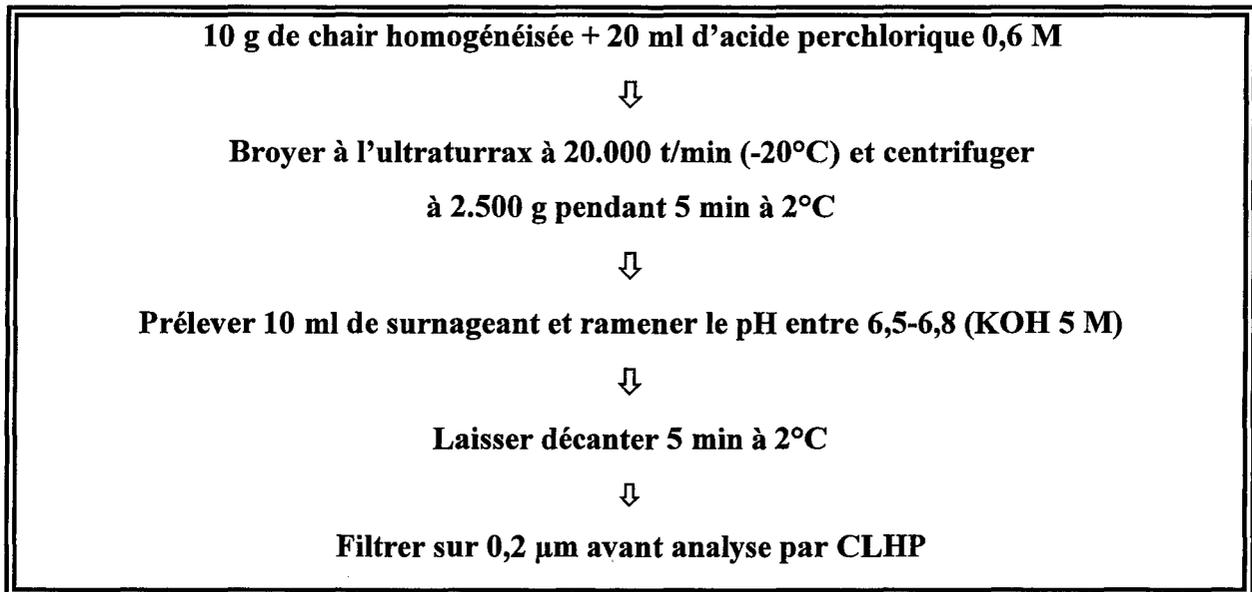
On remarque qu'à ces différents pH, l'ordre de sortie peut être modifié et que les temps d'élution changent. Pour la purine, l'inosine et la guanosine, seul leur temps d'élution varie car leur ordre de sortie est respecté pour tous les pH. A pH 7, on peut observer une bonne séparation des différents composés à l'exception du GMP avec l'IMP et de l'hypoxanthine avec la guanine. Par contre à pH 6, le temps d'analyse est légèrement augmenté mais l'intérêt est que l'on réussit à séparer l'IMP et le GMP sans perturber la séparation de l'inosine et de la guanosine. Ces composés permettent de mettre en évidence les deux voies de dégradation (Fischer, 1995).

Il est bon de noter que la colonne sélectionnée a une bonne sélectivité pour les dérivés nucléotidiques (bases, nucléosides, nucléotides) et qu'à pH beaucoup plus acide les séparations ne sont pas améliorées.

1.7. Protocole et conditions retenus :

On peut proposer d'ores et déjà les conditions chromatographiques ainsi que le protocole d'extraction suivants.

Protocole :



Conditions chromatographiques :

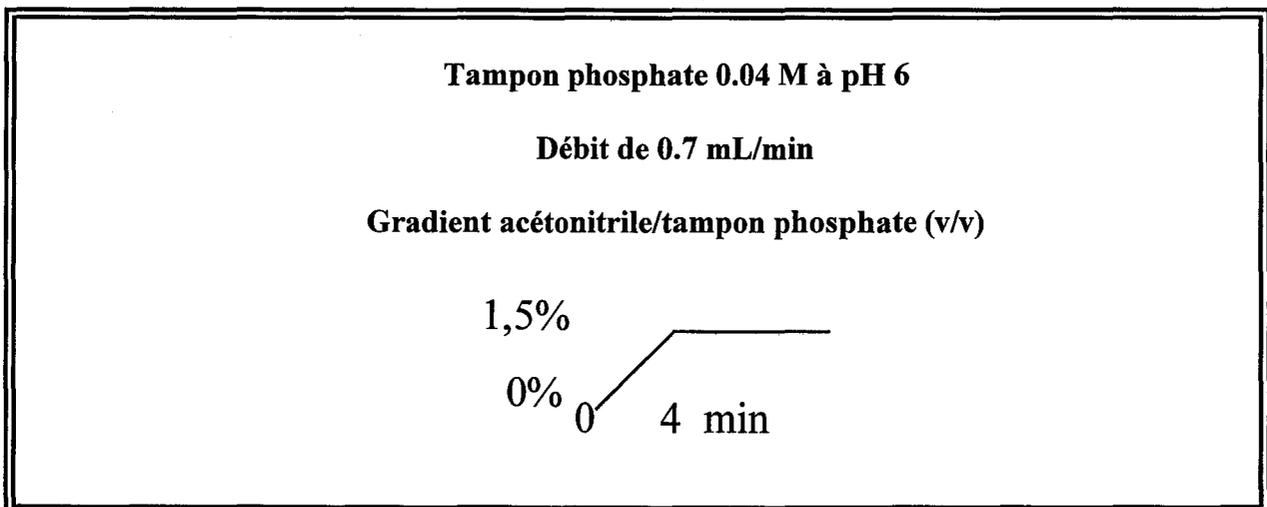


Figure 14 : Chromatogramme à pH 7.

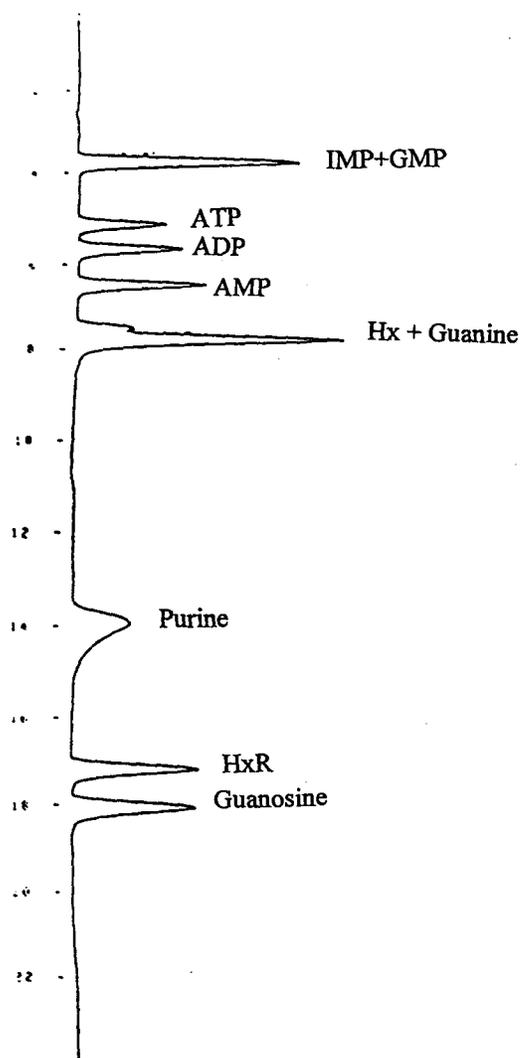


Figure 13 : Chromatogramme à pH 6.

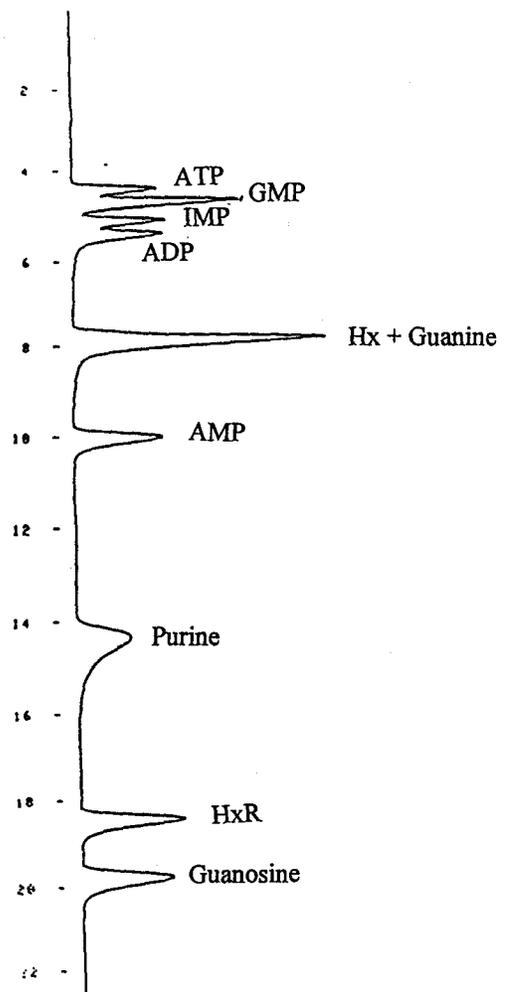
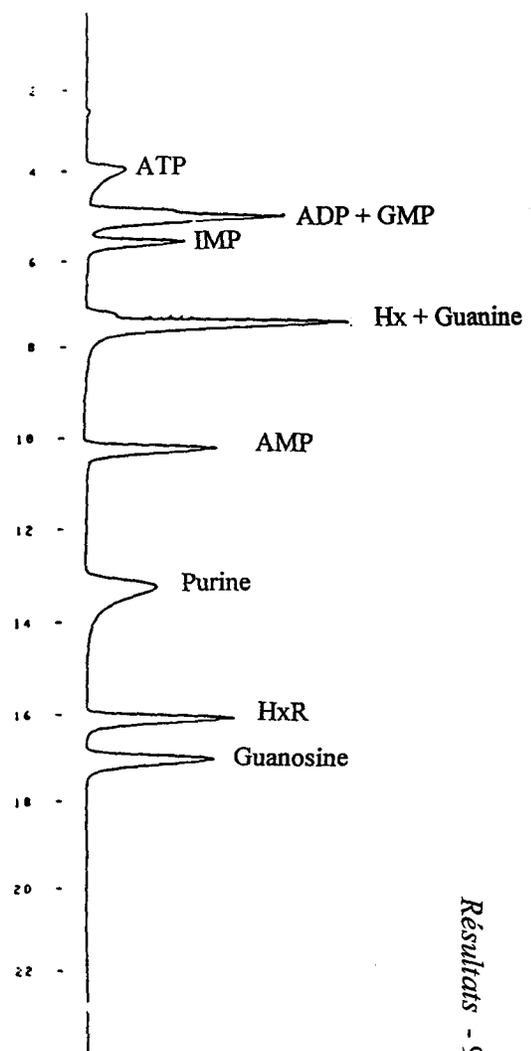


Figure 12 : Chromatogramme à pH 4,6.



2. DETERMINATION DES DROITES DE REGRESSION :

Pour la quantification des différents composés, nous avons utilisé un standard interne : la purine. Des coefficients de réponse de chacun des dérivés nucléotidiques ont été déterminés par rapport au standard interne afin d'en déduire les droites de régressions respectives. La purine a été retenue car elle a un temps de rétention proche de celui des autres dérivés, ce qui ne perturbe pas l'interprétation des chromatogrammes. D'autre part, elle est extraite dans les mêmes conditions que les dérivés nucléotidiques étudiés.

2.1. Méthode utilisée :

A 18 mL d' HClO_4 0,6 M, on a ajouté 100 μL d'étalon interne (purine à 3 mg/mL), 2 mL de KOH 5M et des quantités croissantes de solution standard de chaque dérivé nucléotidique. Les rapports des surfaces vont donner les coefficients de réponses nécessaires aux calculs des droites de régression.

2.2. Droites de régression :

Les valeurs de a et b (tableau 20) correspondent aux coefficients de la droite $y = ax + b$ où y est la quantité en ppm de dérivés nucléotidiques et x le rapport de surface de l'échantillon (solution standard) sur la surface du standard interne. La détermination de ces paramètres est réalisée par la méthode des moindres carrés.

Ces valeurs vont nous servir pour les quantifications au cours des suivis d'altération. Nous pouvons faire apparaître maintenant les quantités directement en ppm.



Tableau 20 : Coefficients des droites de régression des dérivés nucléotidiques.

	a	b
IMP	6,969E+01	5,59
ATP	7,666E+01	1,94
ADP	6,036E+01	8,08
AMP	4,681E+01	2,89
Inosine	3,540E+01	1,07
Hypoxanthine	1,789E+01	-4,90
Guanine	2,245E+01	1,40
GMP	2,007E+01	-5,21
guanosine	3,375E+01	1,84

3. ANALYSE D'ECHANTILLONS :

On a mis en application notre nouvelle méthode pour pouvoir dans un premier temps vérifier le protocole de séparation sur un échantillon de poisson et dans un deuxième temps analyser l'évolution individuelle des dérivés nucléotidiques au cours de la conservation de poisson sous glace fondante.

3.1. Dosage des dérivés nucléotidiques :

On a pu doser les dérivés nucléotidiques au cours d'un suivi d'altération de hareng (représenté en fonction de l'indice de fraîcheur). Le tableau 21, page suivante, présente les différentes quantités en ppm, ce qui nous permet d'avoir une vision d'ensemble.

Tableau 21 : Evolution des dérivés nucléotidiques de la chair de hareng.

IF	ATP	GMP	IMP	ADP	Hx	AMP	HxR
1,2	nd	29,06	2601,25	nd	461,95	76,16	2745,07
1,4	nd	21,85	2222,55	nd	356,39	54,85	1579,66
1,6	nd	7,77	1767,02	nd	364,69	15,17	1917,46
1,6	nd	10,86	1919,78	nd	528,02	27,09	2287,42
1,6	nd	8,54	2321,81	nd	519,69	27,17	2327,62
1,7	nd	3,19	960,75	nd	575,37	28,44	2345,16
1,7	nd	15,58	557,63	nd	383,28	62,26	2048,69
1,7	nd	15,81	1122,55	nd	399,01	27,67	1985,84
1,8	nd	21,33	1747,90	nd	471,88	78,38	1633,20
1,8	7,12	21,21	810,58	nd	406,71	31,82	1231,84
2	4,88	10,01	1490,09	nd	457,76	42,95	1601,97
2,7	4,48	11,49	836,03	nd	410,87	44,08	1571,63
2,7	2,35	9,12	890,91	nd	408,61	46,34	1580,30
2,7	1,95	8,02	262,91	nd	337,78	45,30	1097,03
3,3	0,00	15,16	411,22	nd	447,57	48,03	1283,87
3,5	1,95	13,76	616,91	nd	546,60	50,16	1418,86
3,5	3,17	nd	301,88	255,12	991,42	nd	1716,86
3,7	nd	nd	121,63	251,19	1269,28	nd	1081,84
3,7	nd	nd	96,49	147,11	695,64	nd	1098,36
3,7	nd	nd	68,55	200,49	827,73	nd	990,13
4	2,92	6,09	151,86	113,54	645,27	25,23	920,70
4	3,19	ns	129,07	230,25	1389,79	nd	1000,48

(quantité en ppm) (nd : non déterminé ; ns non significatif)

Comme le montre le tableau 21 ci-dessus, l'évolution des dérivés nucléotidiques ne semble pas parfaitement linéaire à première vue. Malgré tout, on peut proposer quelques interprétations de ces valeurs brutes.

3.2. Analyses et interprétations :

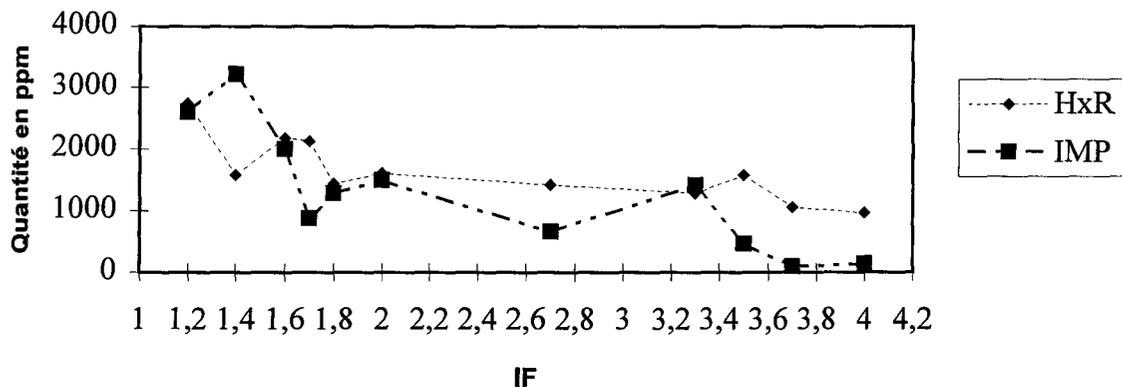
On peut faire plusieurs constatations :

- il est net que les premiers dérivés (ATP, ADP, AMP) ne montrent pas un intérêt important. En effet, la quantification est difficilement réalisable au début du suivi pour l'ATP et l'ADP. De plus, comme le cite Sainclivier (1983), ces nucléotides disparaissent très

rapidement dès la phase de *rigor mortis* (on peut relever une apparition soudaine d'ADP en fin d'altération sans qu'on puisse l'expliquer si ce n'est par une production ou une libération de la flore bactérienne, importante à ce stade d'altération) ;

- par contre pour les autres dérivés (à l'exception du GMP), les tendances sont plus marquées. On peut souligner, en accord avec la bibliographie (Williams, 1991), une diminution très nette de l'IMP et dans une moindre mesure de l'inosine, comme le montre la figure 15 ci-dessous. En ce qui concerne l'hypoxanthine, son évolution n'est pas très significative mais on peut noter une légère augmentation.

Figure 15 : Evolution de l'IMP et de l'inosine au cours d'un suivi d'altération de hareng.



On peut aussi utiliser le rapport K' (Jones, 1964) ou le rapport H (Luong, 1992) qui permettent de calculer des quantités relatives d'hypoxanthine, d'inosine et d'IMP en fonction des autres composés. L'utilisation de rapport permet en effet de limiter les variations associées à chaque échantillon.

On définit les rapports de la manière suivante :

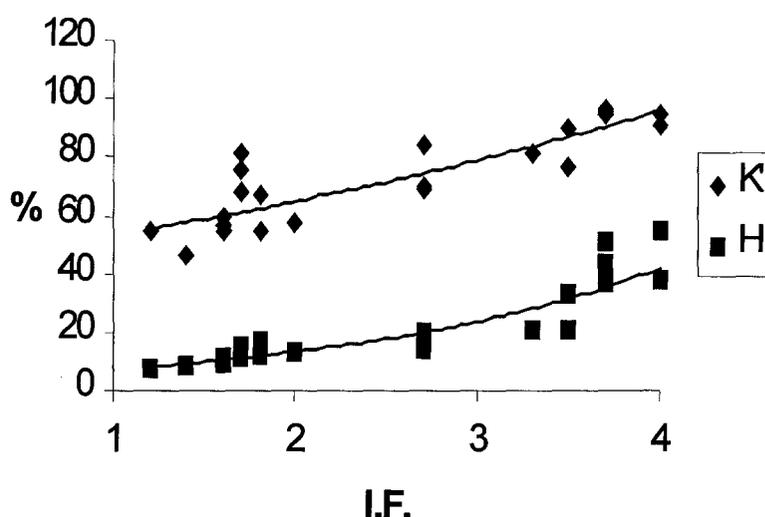
$$K' = \frac{HxR + Hx}{IMP + HxR + Hx} \quad (\text{Jones, 1964})$$

et

$$H = \frac{Hx}{IMP + HxR + Hx} \quad (\text{Luong, 1992}).$$

On peut présenter les résultats des calculs de K' et de H directement à l'aide de la figure 16 (ci-dessous).

Figure 16 : Evolution des rapports H et K' au cours d'un suivi d'altération de hareng.



Les courbes de tendance des rapports K' et H permettent de montrer une évolution très proche. Elles apparaissent de surcroît pratiquement superposables : elles présentent la même « allure », mais à des niveaux différents. On peut observer aussi que les valeurs du rapport H sont moins dispersées que celles du rapport K' surtout en début d'altération. Le rapport H semble donc être un révélateur plus précoce que K' . On ne peut pourtant généraliser ce type d'étude faite sur un poisson à l'ensemble des espèces, mais elle servira de base pour des travaux à venir.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

Les travaux sur ce sujet ont permis d'adapter une méthode de séparation de dérivés nucléotidiques pour la séparation des bases, des nucléosides et des nucléotides, avec notamment le dosage du GMP. En effet le GMP pourrait être une voie métabolique utilisée par l'IMP. Cette méthodologie permet donc de suivre le catabolisme de l'IMP qui peut à la fois donner de l'inosine mais aussi du GMP par l'intermédiaire du XMP (chapitre 6.4.2.1, *Généralités*). Dans ce cas, si la voie de l'inosine n'est pas la seule, on pourrait peut être expliquer en partie les fluctuations observées sur l'inosine et l'hypoxanthine par l'emprunt des métabolites vers cette voie de dégradation en GMP. On serait donc en mesure d'affiner nos résultats et surtout nos interprétations en exploitant ces deux voies de dégradation à l'aide de notre méthodologie.

A ce stade des travaux, il faut :

- améliorer encore la séparation des dérivés nucléotidiques sur les échantillons. En effet, les quantités de chaque produit ne sont pas du même ordre de grandeur et par conséquent l'analyse des chromatogrammes est difficile pour les composés ayant des temps de rétention proches.

- réaliser de nouveaux suivis d'altération. Ceux-ci permettraient de déterminer des nouveaux rapports exprimant l'une ou l'autre voie de dégradation (ou les deux). Ces rapports pourraient être corrélés avec le niveau d'altération.

2^{ème} Partie : les dérivés protéiques

1. LE COLLAGÈNE :

Avant toute application du dosage de collagène, il convient de développer tout d'abord les différentes techniques (utilisant soit la papaïne, soit l'hydroxyproline). Des essais préliminaires (non présentés ici) de dosage selon la méthode utilisant la papaïne n'ont pas donné de résultats reproductibles et sensibles car on se fonde sur des différences de pesées, ce qui s'avère peu précis. De plus, le contrôle de l'hydrolyse par la papaïne et le traitement de nombreux échantillons est difficile à mettre en place. Dans la suite de ces travaux, nous n'avons donc utilisé que le dosage de l'hydroxyproline pour déterminer la quantité de collagène.

Deux types de dosages sont réalisés : - hydroxyproline libre qui correspond à un dosage direct de l'hydroxyproline de la chair sans hydrolyse au préalable par HCl (Ceci représente l'hydroxyproline qui est libérée par la dégradation du collagène) ;

- hydroxyproline totale qui reflète directement le taux de collagène contenu dans le tissu musculaire.

Le travail de ce chapitre s'appuie :

- sur le chapitre 3.3 des généralités
- sur le chapitre 2 des matériels et méthodes

1.1. Gamme étalon :

En commençant les premiers essais de la gamme étalon, nous avons remarqué qu'il fallait élargir le spectre de cette gamme car il y a moins de collagène dans le tissu musculaire du poisson que dans la viande. Ainsi, on a choisi des dilutions allant de 1,2 à 20 µg/mL.

Tableau 22 : Gamme étalon de l'hydroxyproline.

Concentration en OH-PRO (en mg / mL)	0,425	1,274	1,699	2,1124	4,248	8,496	12,744	16,992	21,24
D.O : $\lambda = 560$ nm	0,001	0,016	0,040	0,085	0,175	0,371	0,569	0,741	0,779

1.2. Essais de protocole et mise au point de la méthode :

Il nous a fallu tout d'abord adapter la méthode de dosage au tissu musculaire du poisson.

Pour cela, au cours des premiers essais nous avons suivi le protocole initial (chapitre 2, *Matériels et méthodes*) en fixant arbitrairement la prise d'échantillon à 2 g et en effectuant des dilutions au 1/10 et au 1/20. D'après les résultats (non présentés) et sachant que la quantité de collagène est inférieure dans le muscle du poisson à celle de la viande, nous envisageons des prélèvements de 10 g à hydrolyser dans 50 mL d'HCl à 110°C afin d'obtenir une bonne homogénéité des taux de collagène dans l'échantillon. De plus, nous prenons comme dilution de référence une dilution au 1/5. L'échantillon hydrolysé dans l'HCl nous permet d'obtenir une valeur d'hydroxyproline totale.

Pour estimer la quantité d'hydroxyproline libre dans le tissu musculaire, on simplifie le protocole en éliminant la phase d'hydrolyse. Tout d'abord nous avons prélevé 1 g que nous plaçons directement dans 50 mL de tampon acétate à pH 6, puis nous décidons de fixer la prise d'échantillon à 5 g dans 50 mL de tampon pour des raisons de quantité.

(Remarque : l'échantillon prélevé est broyé à l'ultra-turrax pour que la totalité de l'hydroxyproline soit dosée).

Les deux protocoles (hydroxyproline totale et hydroxyproline libre) retenus après les premières adaptations sont présentés à la page suivante.

Protocoles après mise au point :

DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE TOTALE :

Peser 10 g d'échantillon
Ajouter 50 mL d'HCl 6 M
Broyer à l'ultra-turrax
↓
Hydrolyser dans une étuve à 110°C pendant la nuit
↓
Refroidir dans bain d'eau froide
Neutraliser par de la soude 32 % (pH 6 - 7)
Ajuster à 100 mL
Filtrer sur papier Whatman n°2
↓
Prélever 1 mL d'hydrolysate dilué au 1/5 (faire 3 tubes avec le même échantillon)
Ajouter 3 mL d'isopropanol Puis 1 mL de solution oxydante
↓
Homogénéiser
Laisser reposer 10 minutes
↓
Ajouter 3 mL d'acide perchlorique
Puis 2 mL de PDMAB
↓
Homogénéiser
Laisser 20 minutes au bain-marie à 60°C
↓
Mesurer la D.O à 560 nm (1/5)

DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE LIBRE :

Peser 5 g d'échantillon
Ajouter 50 mL de tampon acétate pH 6
Broyer à l'ultra-turrax
Filtrer sur papier Whatman n°2
↓
Prélever 1 mL d'hydrolysate (faire 3 tubes avec le même échantillon)
Ajouter 3 mL d'isopropanol
Puis 1 mL de solution oxydante
↓
Homogénéiser
Laisser reposer 10 minutes
↓
Ajouter 3 mL d'acide perchlorique
Puis 2 mL de PDMAB
↓
Homogénéiser
Laisser 20 minutes au bain-marie à 60°C
↓
Mesurer la D.O à 560 nm

1.3. Essais préliminaires :

1.3.1. Etude de la reproductibilité :

Afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus, nous avons prélevé 3 fois 10 g de cabillaud congelé au 1er jour d'altération afin de doser l'hydroxyproline totale et libre. Pour chacun des prélèvements, nous avons réalisé 3 essais.

Tableau 23 : Etude de la reproductibilité du dosage de l'OH-Pro totale.

Cabillaud		1	1	1	Moyenne
Echantillon 1	DO 1/5	0,445	0,412	0,445	0,434
	Conc OH-Pro 1/5	10,261	9,543	10,261	10,022
	% OH-Pro	51,304	47,717	51,304	50,109
		2	2	2	Moyenne
Echantillon 2	DO 1/5	0,472	0,424	0,385	0,427
	Conc OH-Pro 1/5	10,848	9,804	8,957	9,870
	% OH-Pro	54,239	49,022	44,783	49,348
		3	3	3	Moyenne
Echantillon 3	DO 1/5	0,399	0,415	0,415	0,410
	Conc OH-Pro 1/5	9,261	9,609	9,609	9,493
	% OH-Pro	46,304	48,043	48,043	47,464
	Moyenne DO 1/5	0,424			
	Moyenne C 1/5	9,795			
	Moyenne %	48,973			

Ces résultats (tableau 23) nous permettent de décider de ne plus faire que 2 prélèvements différents avec 3 mesure de la DO car nous avons des moyennes relativement semblables pour chacun des 3 flacons hydrolysés : 50,1 mg, 49,3 mg et 47,5 mg d'hydroxyproline totale dans 100 g de poisson.

1.3.2. Etude préliminaire de l'évolution de l'hydroxyproline dans le muscle du tacaud :

Nous avons effectué en parallèle un dosage du collagène et un dosage de l'ABVT (chapitre 3, *Matériels et méthodes*) pour suivre l'état de fraîcheur du poisson aux 1^{er}, 3^{ème} et 8^{ème} jours. Le poisson frais a été conservé à 1-5 °C (sous glace fondante).

- Préparation des échantillons : on a prélevé les filets du poisson sur toute la longueur, ceux-ci sont ensuite broyés et homogénéisés.

- Analyse de sa qualité chimique (tableau 24) :

- dosage de l'ABVT,
 - dosage de l'hydroxyproline totale,
 - dosage de l'hydroxyproline.
- } selon les protocoles définis

Tableau 24 : Résultats d'analyse sur du tacaud à trois niveaux d'altération (J+1, J+3, J+8).

	ABVT	Collagène	DO 1/5 OH-PRO totale	% OH-Pro totale	DO OH-PRO	% OH-Pro libre
J+1	10,584	0,70%	0,4195	48,5326	0,123	3,268
J+3	14,448	0,34%	0,3435	40,2717	0,148	3,804
J+8	72,744	0,11%	0,2485	29,9456	0,112	3,0326

Il apparaît difficile de proposer une interprétation générale des résultats. On peut juste souligner la diminution importante du collagène tout au long des huit jours de conservation.

1.4. Suivi d'altération sur du tacaud frais :

Après ces premiers essais, nous avons décidé de refaire un dosage de l'hydroxyproline sur un suivi de tacaud (on garde la même espèce afin de pouvoir comparer les résultats entre eux) mais cette fois-ci en suivant une évolution quotidienne.

Tableau 25 : Dosage de l'hydroxyproline au cours d'un suivi d'altération de tacaud.

Jour d'altération	1	2	3	4	6	7	8
% OH-Pro totale	27,785	32,862	39,139	30,634	27,083	29,04	41,748
% OH-Pro libre	3,079	2,742	1,265	1,467	1,177	1,722	1,788
Rapport	0,11	0,08	0,03	0,05	0,04	0,06	0,04

Les résultats (tableau 25 ci-dessus) sont différents de ceux de l'essai précédent. Ainsi, la tendance de la courbe est totalement inversée pour les 3 premiers jours d'altération où le pourcentage d'hydroxyproline augmente. Ensuite, il diminue pour réaugmenter brutalement vers le 7ème jour. En ce qui concerne l'hydroxyproline libre, elle diminue à peu près régulièrement au cours du temps. Par contre, c'est le rapport « hydroxyproline libre / hydroxyproline totale » qui est le plus intéressant car son évolution est plus nette surtout au cours des premiers jours d'altération. Ceci est moins marqué en fin d'altération, ce qui peut être lié à une charge bactérienne plus importante perturbant ce dosage car l'hydroxyproline doit entrer probablement dans divers cycles métaboliques.

1.5. Conclusion :

Malgré quelques variations, cette voie de prospection semble prometteuse. Il serait donc intéressant de reproduire cette étude au cours d'un prochain suivi d'altération en augmentant le nombre d'échantillons pour chaque jour d'altération. Si les résultats sont encourageants, il faudrait envisager l'utilisation de techniques de dosage plus récentes, plus rapides et encore plus précises utilisant la CLHP ou la chromatographie de phase gazeuse.

2. LES AMINES BIOGENES :

Ce deuxième chapitre des dérivés protéiques concerne le dosage des amines biogènes. L'orientation principale de ce travail est de pouvoir mettre en application une méthode de séparation par CLHP des amines biogènes (putrescine, cadavérine, histamine, tyramine, tryptamine, spermine, spermidine et agmatine). Il comprend deux parties importantes, la méthode de quantification sur le tissu musculaire du poisson en incluant la notion de matrice, mais aussi l'étude sur diverses espèces de poisson afin de comparer les évolutions des différentes amines biogènes entre elles. La quantification sur un substrat complexe comme le poisson ne peut être réalisée qu'en s'assurant de la rigueur de la démarche. Pour cela, un maximum de précautions ont été prises comme celles présentées ci-après.

Le travail de ce chapitre s'appuie :

- sur le chapitre 3.4.1 des généralités
- sur le chapitre 3 des matériels et méthodes

2.1. Dosage de solutions standards d'amines et étude de la réactivité :

Pour limiter le nombre de dosages, nous avons souhaité travailler non plus avec des solutions individuelles d'amines biogènes mais avec une solution unique contenant l'ensemble des composés recherchés. Il convenait d'effectuer au préalable différents essais mettant en évidence d'éventuelles interactions entre les amines biogènes une fois le mélange constitué.

L'étude a été réalisée en deux étapes. Tout d'abord, nous avons préparé des solutions individuelles d'amines à une concentration de 200 ppm. Un volume identique a été prélevé sur chaque flacon et mis en commun. Travaillant sur huit solutions, la concentration finale du pool s'élevait donc pour chaque amine au 1/8 du mélange, soit 25 ppm.

De manière à travailler dans les mêmes conditions, nous avons ensuite effectué pour chaque solution mère une dilution au 1/8, nous conduisant à huit solutions d'amines à 25 ppm. Les échantillons ont été traités suivant le protocole habituel (chapitre 4.3, *Matériels et méthodes*). Les résultats de la chromatographie figurent dans le tableau 26. Les coefficients de réponse des amines biogènes ont été déterminés par rapport à l'étalon interne, le 1,3-diaminopropane.

Tableau 26 : Etude des temps de rétention et des rapports de pics des amines placées seules ou en mélange.

Amines	Solutions individuelles				Mélange			
	AB ⁽¹⁾	EI ⁽¹⁾	AB/EI	Tr ⁽²⁾	AB	EI	AB/EI	Tr
Spermine	547824	259591	2,11	21,6	602905	276077	2,18	21,6
Spermidine	596191	268630	2,21	18,53	640355	276077	2,31	18,53
Tyramine	490020	268142	1,82	18,08	479776	276077	1,73	18,08
Tryptamine	241277	269247	0,89	10,95	258882	276077	0,93	10,95
Méthylamine	1236179	261596	4,72	7,03	1268255	276077	4,59	7,03
Putrécine	776761	248843	3,12	13,5	876405	276077	3,17	13,48
Cadavérine	588843	273114	2,15	14,47	654967	276077	2,37	14,47
Histamine	531665	261506	2,03	15,05	518505	276077	1,87	15,03

(1) surface du pic du composé ; AB amine biogène ; EI 1,3-Diaminopropane

(2) Tr = Temps de rétention en minutes

L'étude comparée des différentes solutions d'amines biogènes (solutions individuelles et mélange) s'est limitée à une analyse des temps de rétention et des rapports AB/EI. En effet, le temps de rétention caractérise le composé et révèle une éventuelle modification de la structure. D'autre part, le rapport AB/EI permet de vérifier que le rapport de surface correspond aux quantités initiales des solutions testées.

On peut remarquer que les temps de rétention restent constants pour les différentes amines, qu'elles soient sous forme de solutions individuelles ou en mélange. Quant aux rapports AB/EI, aux erreurs expérimentales près, les valeurs moyennes des rapports AB/EI sont très proches (2,38 pour le AB/EI moyen en solutions individuelles et 2,39 dans le cas du mélange).

On peut donc conclure que, seules ou en mélange, les amines biogènes possèdent les mêmes propriétés de séparation et de quantification. Il n'y a donc pas d'interactions des amines entre elles, ce qui aurait pu biaiser la quantification. En outre, l'utilisation d'un standard regroupant toutes les amines permettra de réduire tant la durée du suivi que les erreurs d'échantillonnage (toutes les amines étant dosées en une seule fois à partir d'une solution mère unique).

2.2. Détermination des droites de régression des amines en solution :

Nous avons cherché à déterminer pour des solutions de concentrations croissantes, les évolutions des rapports AB/EI correspondants. Ce suivi a été effectué sur des solutions standards d'amines biogènes de manière à mettre en évidence la linéarité de la relation entre ces deux variables afin de déterminer les paramètres de régression.

Dans un premier temps, il a fallu prendre en compte :

- le degré de pureté des poudres mises à notre disposition,
- la plage de concentration (en ppm) dans laquelle se situent les échantillons de poisson.

En accord avec les données toxicologiques et les travaux antérieurs, il est généralement admis que les concentrations relevées pour une amine considérée n'excèdent que rarement des valeurs de 50 ppm. Afin d'éviter tout phénomène de saturation, préjudiciable à l'élaboration des droites étalons, mais également pour accroître la densité de points sur les concentrations les plus couramment utilisables, nous avons préféré nous limiter à cet intervalle.

Pour chaque composé, nous avons procédé à des dilutions successives au $\frac{1}{2}$ à partir d'une solution mère préparée à 50 ppm, soit 25 ; 12,5 ; 6,25 ; 3,17 et 1,58 ppm. L'opération a été répétée de manière à obtenir trois répliqués par dilution, soit 18 points par droite étalon (tableau 27).

Tableau 27 : Conditions de préparation des solutions d'amines biogènes.

Amines	Pureté (%) ⁽¹⁾	mg / 10 mL ⁽²⁾	[C] en ppm
Cadavérine	58,36	0,42	50,73
Histamine	60,34	0,44	53,62
Méthylamine	46,41	0,55	50,91
Putrécine	54,71	0,47	51,50
Spermidine	57,03	0,44	50,83
Spermine	58,10	0,43	51,01
Tryptamine	81,44	0,32	52,44
Tyramine	79,03	0,31	49,60

(1) tenant compte de la forme di, tri ou tétrachlorohydrate des amines en poudre

(2) volume utilisé pour la préparation des échantillons et correspondant à une masse de 5g de poisson.

Par régression linéaire, nous avons cherché à déterminer pour chaque amine la relation pouvant exister entre la concentration de la solution analysée et la variable "AB/EI". L'objectif étant de prédire la concentration (y) représenté par « [c] » en fonction du rapport des surfaces mesurées (x), nous avons utilisé un modèle de y en x sans terme constant (puisque à une concentration nulle doit correspondre un rapport de surface également nul). Les différents paramètres estimés dans la droite de régression figurent pour chaque amine biogène dans le tableau 28 ci-après.

Tableau 28 : Estimation des différents paramètres. $[c] = a \cdot (AB / EI)$

Amines	a ⁽¹⁾	R ² ⁽²⁾	S ⁽³⁾
Cadavérine	8,69	0,9995	0,06
Histamine	8,41	0,9836	0,015
Méthylamine	2,98	0,9995	0,016
Putrécine	6,59	0,9841	0,007
Spermidine	9,2	0,9825	0,06
Spermine	8,23	0,9964	0,01
Tryptamine	24,2	0,999	0,0012
Tyramine	13,91	0,9897	0,07

(1) coefficient directeur ; (2) coefficient de détermination ; (3) écart-type.

Nous avons souligné dans la partie consacrée aux généralités la grande variabilité de la composition des poissons. Celle-ci s'amplifie après la mort sous l'action de nombreux changements (décrits dans le chapitre 5, *Généralités*) physiques, biochimiques et microbiologiques complexes, variables et inter-dépendantes.

L'ensemble des phénomènes d'autolyse, de protéolyse et de dégradation au cours de l'altération sont complexes, peu maîtrisables et fluctuants. Ils sont même intrinsèques à l'individu. Ces paramètres inconstants, parmi lesquels l'apparition de composés interférents avec les amines biogènes ou l'évolution des liaisons amines/substrats (et que nous désignerons sous le terme "effet matrice"), ne peuvent donc pas être pris en compte lors de l'utilisation d'une droite étalon élaborée à partir de composés libres en solution. Il est donc intéressant d'effectuer des **déterminations de droites de régression directement sur la chair**, ce qui permet de prendre en compte les interactions possibles avec la matrice.

2.3. Détermination des droites de régression dans un échantillon de poisson :

2.3.1. Considération des particularités du substrat et minimisation de "l'effet matrice" :

Le terme de "matrice", abordé par certains auteurs comme Long (1993), a souvent une connotation physico-chimique, à savoir la prise en compte des problèmes liés à l'extraction des composés et donc à la représentativité du dosage au regard des quantités réellement présentes dans l'échantillon.

L'effet matrice, au sens où nous l'entendons, regroupe plus particulièrement des phénomènes d'interactions chimiques lors du dosage, résultant de l'apparition de composés autres que les amines au cours de l'altération. Nous supposons que l'effet de matrice peut être variable suivant les espèces, la période de pêche (saison), les individus, et surtout le niveau d'altération.

Nous envisageons d'effectuer nos droites étalons non plus à partir d'amines en solution (qui par définition sont libres et donc indépendantes de tout phénomène d'interaction, ce qui ne permet pas d'aborder les différents facteurs de variabilité), mais au moyen

d'échantillons de poisson complétés par des doses croissantes d'un mélange d'amines biogènes.

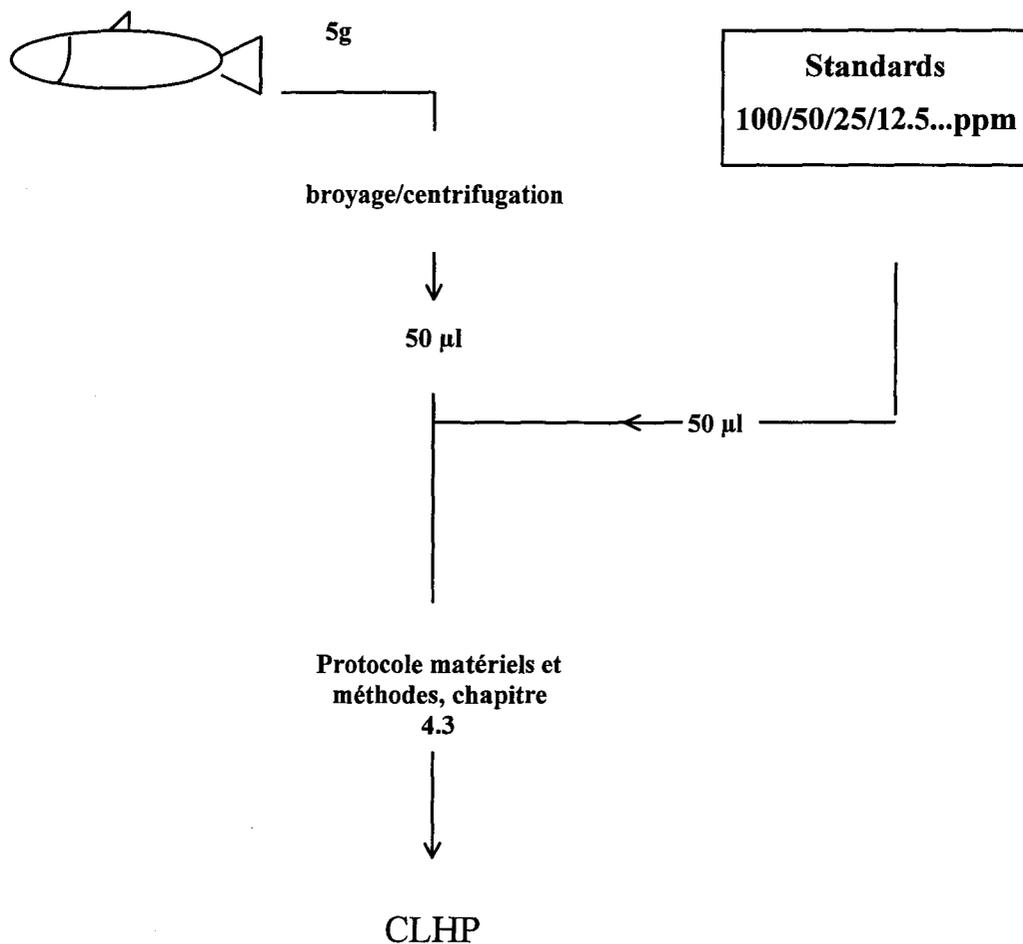
Ainsi, en ajoutant au substrat ces valeurs croissantes d'amines, il devient possible de prendre en compte les agents interférents et de les inclure dans l'obtention des droites de régression.

2.3.2. Méthodologie des ajouts dosés :

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que l'ajout en concentrations croissantes de solutions standards d'amines permet de minimiser l'effet matrice (sous réserve d'une proportionnalité de cet effet). Le protocole retenu pour ces analyses est resté identique à celui présenté auparavant, excepté qu'aux 100 μL de surnageant ordinairement prélevés, on a substitué un mélange composé de 50 μL de surnageant additionné cette fois de 50 μL d'une solution constituée d'un mélange de standards d'amines biogènes.

La gamme de concentrations utilisée est restée identique hormis qu'il a fallu tenir compte du facteur de dilution au $\frac{1}{2}$ en utilisant une solution étalon titrant à 100 ppm d'amines pour considérer un apport effectif de 50 ppm (figure 17).

Figure 17 : Schématisation du mode opératoire du dosage des amines biogènes par ajouts dosés.

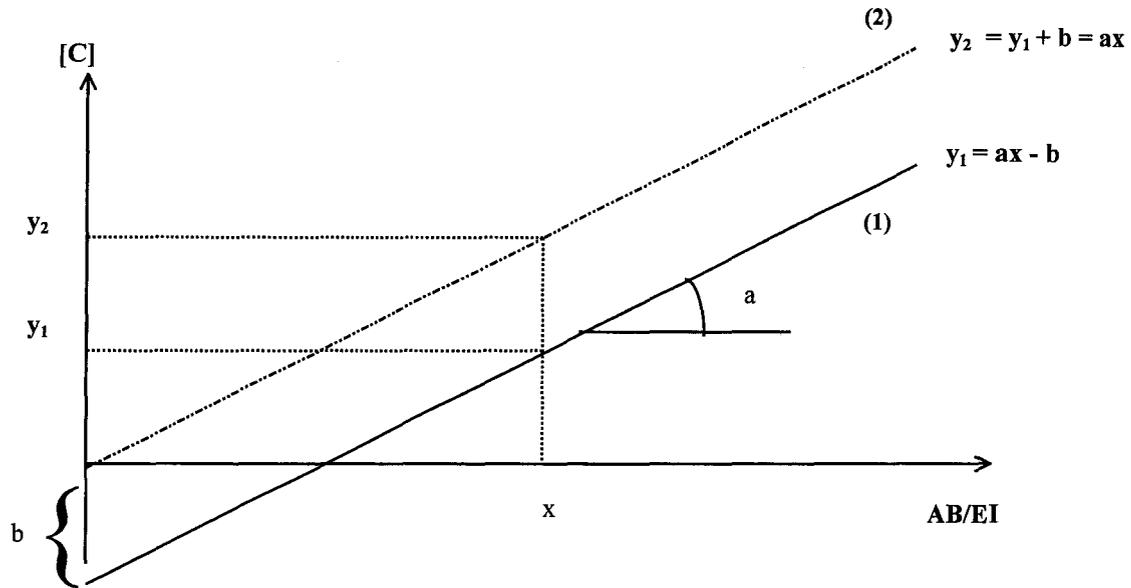


L'analyse des chromatogrammes nous permet de relier la concentration ajoutée aux différents rapports AB/EI relevés.

Ce rapport de surfaces ne correspond pas seulement à la quantité de l'ajout mais à celle initialement présente à laquelle s'est additionnée la quantité apportée. En effectuant une régression de y en x , où y est la concentration et x le rapport AB/EI, on obtient une droite d'équation $y = ax + b$ (avec $b < 0$) dans laquelle $|b|$ représente la concentration initiale de l'échantillon. En considérant cette valeur dans la relation liant y à x , nous pourrions obtenir une nouvelle droite étalon d'équation $y = ax$ qui tiendra compte du substrat et des interactions qui lui sont liées (figure 18).

Figure 18 : Utilisation des droites d'ajouts dosés comme étalons.

(1) droite obtenue par ajouts dosés ; (2) droite corrigée par l'annulation de b.



2.3.3. Reproductibilité analytique :

Un premier suivi d'altération sur du carrelet nous a donné l'occasion de tester la fiabilité de mesure de l'appareillage (reproductibilité). A partir d'un même échantillon de carrelet, trois dosages consécutifs ont été réalisés pour différentes concentrations d'ajouts (tableau 29).

Tableau 29 : Etude de la reproductibilité des dosages.

Amines biogènes	$\left(\frac{AB}{EI} \right)$ [ajout]	Ecart-type (S)	CV ⁽¹⁾ (%)	CV* ⁽²⁾ (%)
Spermine	0,119	0,029	24,88	25,40
Spermidine	0,119	0,019	16,14	16,47
Tyramine	0,091	0,008	8,90	9,09
Méthylamine	0,224	0,031	13,94	14,23
Putrescine	0,144	0,008	6,10	6,23
Cadavérine	0,129	0,016	13,02	13,30
Histamine	0,104	0,012	11,82	12,06

(1) $CV = \frac{100 \cdot S_x}{\bar{x}}$ (2) pour les petits échantillons on choisira $CV^* = \left(1 + \frac{1}{4n} \right) \cdot CV$ (Sherrer, 1984)

Au regard des résultats, il apparaît que la variabilité de mesure d'un même échantillon demeure limitée. Les coefficients de variation restant dans des proportions raisonnables (15 à 25%), on peut conclure à une bonne reproductibilité des dosages. Cette étude nous permet en effet d'attribuer les variations non plus à la méthodologie mais essentiellement aux différences liées aux échantillons traités.

2.4. Comparaison des droites étalons obtenues sur solutions standards et par ajouts dosés :

Nous avons effectué pour l'ensemble des amines des déterminations de droites de régression sur deux espèces (merlan et carrelet). L'objectif de ce premier suivi n'est pas d'aboutir à de réelles conclusions mais au contraire de susciter de nouvelles orientations ; nous nous sommes principalement attachés à comparer les différentes pentes des droites de régression, en y incluant la notion d'espèce (tableau 30).

Tableau 30 : Variation des pentes des droites de régression en fonction de la nature du substrat.

Amines biogènes	a (solutions standards)	r ²	a (ajouts dosés sur carrelet)	r ²	a (ajouts dosés sur merlan)	r ²
	Spermine	8,23	0,9964	12,79	0,9716	16,99
Spermidine	9,20	0,9825	11,89	0,9758	13,83	0,9661
Tyramine	13,91	0,9897	14,71	0,9721	15,12	0,9189
Tryptamine	24,2	0,999	31,26	0,9815	29,24	0,9364
Méthylamine	2,98	0,9995	5,71	0,9937	5,61	0,9698
Putréscine	6,59	0,9841	8,29	0,9925	8,39	0,9756
Cadavérine	8,69	0,9995	10,24	0,9935	9,95	0,9673
Histamine	8,41	0,9836	12,63	0,9818	12,46	0,9446

a : pente des droites de régression ; r : coefficient de détermination

Les hypothèses émises au cours des paragraphes précédents, lesquelles envisageaient une influence probable du substrat sur la représentativité du dosage, semblent en partie confirmées. Les droites étalons obtenues par analyse de solutions standards, ne permettent pas d'aborder les différences propres à une espèce. En d'autres termes, les variations de constitution biochimique, la teneur plus ou moins importante en précurseurs d'amines (protéines, acides aminés libres) et le niveau d'altération sont donc des paramètres influents qu'il convient de prendre en compte dans nos travaux ultérieurs. Le second suivi doit nous permettre d'aborder :

- l'influence du substrat (espèce) sur l'effet matrice,
- l'évolution de cet effet au cours du temps et son incidence sur le dosage.

2.5. Evolution des droites de régression en fonction de l'altération et de l'espèce :

Cette étude a été réalisée par la méthode des ajouts sur deux espèces de poisson : merlan et carrelet, à trois stades d'altération (J+1, J+4, J+7). L'influence des deux facteurs qualitatifs, espèce et altération, a été testée à partir d'un modèle d'analyse de covariance, sans coefficient constant, pour chaque amine (tableau 31) :

$$Q_{ijk} = (a + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij}) x_{ijk} + e_{ijk}$$

où α_i est le terme correspondant à l'effet de l'espèce i (merlan ou carrelet),

β_j est le terme correspondant à l'effet du stade j (J+1, J+4, J+7),

γ_{ij} est le terme correspondant à l'interaction entre l'espèce et l'altération,

k est l'indice de répétition,

X_{ijk} est la k^{ème} valeur du rapport (A_{ba}/A_{is}) pour l'espèce i et le stade j.

$(A + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij})$ est donc la pente de la droite de régression entre Q et x. L'indice met en évidence, pour toutes les amines, un effet significatif ($(Pr > F) < 0,001$) de l'interaction entre l'espèce et le stade d'altération. Les ajustements sont satisfaisants (tous les $r^2 > 0,95$).

A l'aide de modèles d'analyse de covariance, par amine et par stade d'altération, où le facteur qualitatif est l'espèce :

$$Q_{ik} = (a + \alpha_i) x_{ik} + e_{ik}$$

$(a + \alpha_i)$ est alors la pente de la droite de régression de Q sur x.

Tableau 31 : Evolution du coefficient directeur au cours de l'altération du merlan et du carrelet.

	J	Pr($\alpha_1=\alpha_2=0$)	(a+ α_1)		r ²
			Merlan	Carrelet	
cadavérine	1	0,0001 *	12,46	10,71	0,99
	4	0,4511	10,22	10,41	0,98
	7	0,0004 *	8,7	9,72	0,97
histamine	1	0,0001 *	16,2	12,77	0,99
	4	0,0032	13,28	14,81	0,96
	7	0,021 *	10,28	11,24	0,96
méthylamine	1	0,0001 *	7,17	6,19	0,99
	4	0,2449	5,28	5,39	0,99
	7	0,0001 *	5,04	5,68	0,97
putrescine	1	0,0001*	10,05	9,00	0,99
	4	0,4275 *	8,47	8,30	0,98
	7	0,0723 *	7,43	7,75	0,98
spermidine	1	0,0001 *	14,95	12,49	0,98
	4	0,0001 *	16,35	13,47	0,95
	7	0,0069 *	11,5	10,58	0,97
spermine	1	0,0001 *	17,51	13,91	0,97
	4	0,0001 *	20,82	13,68	0,92
	7	0,0001 *	14,23	11,52	0,96
tryptamine	1	0,0001 *	43,9	33,69	0,98
	4	0,0710	27,72	29,21	0,98
	7	0,0001 *	24,98	31,47	0,96
tyramine	1	0,0001 *	20,9	14,89	0,97
	4	0,3791	17,99	17,38	0,95
	7	0,0071 *	11,71	13,04	0,96

J : jour d'altération ; r : coefficient de détermination et * significatif à 1%

Les résultats montrent que :

- pour le stade d'altération (J+1), les pentes des droites de régression pour le carrelet sont significativement inférieures à celles obtenues pour le merlan ($(Pr > F) < 0,0001$) et ceci pour toutes les amines.

- pour le stade (J+4), les pentes associées aux espèces ne sont pas significativement différentes, sauf pour la spermidine et la spermine où les pentes rapportées au carrelet sont significativement inférieures à celles du merlan.

- pour le stade (J+7), de nouveau les pentes sont significativement différentes (sauf pour la putrescine). Pour la spermidine et la spermine, les coefficients associés au carrelet sont inférieurs à ceux du merlan ; à l'inverse ils sont supérieurs pour les autres amines.

On remarque ainsi que :

- à l'exception de la spermine et de la spermidine, la valeur de la pente diminue au fur et à mesure que le tissu musculaire du merlan s'altère. Ceci est vrai aussi pour la cadavérine, la putrescine et la spermine chez le carrelet.

- les valeurs de la pente associée à la tryptamine sont très élevées et nettement différentes entre le carrelet et le merlan. Il est important de dire que ce composé n'a jamais été retrouvé dans le merlan ou le carrelet ; seules quelques traces ont déjà été détectées chez le saumon et la sardine.

Les solutions pour remédier aux fluctuations des droites de régressions liées à l'espèce étudiée et aux jours d'altération sont :

- d'effectuer des droites de régression pour chaque espèce analysée,
- de faire les droites de régression non plus sur un échantillon à un stade précis d'altération mais sur plusieurs échantillons et à différents niveaux d'altération pour déterminer une seule droite de régression globale (tableau 32). Ceci aura aussi l'avantage de pouvoir être

utilisé sur des échantillons dont on ne connaît pas le niveau d'altération (ce qui est toujours le cas).

2.6. Droites de régression globales :

Comme on l'a proposé précédemment, la solution aux différences observées au cours de l'altération a été de réaliser des droites de régression non plus à chaque jour (J+1, J+3, J+7) mais en globalité sur les trois jours en incluant l'ensemble des points (225 points par amine et par poisson) pour le calcul (tableau 32).

Tableau 32 : Coefficients directeurs globaux (déterminés à trois niveaux d'altération).

Amines biogènes	Merlan		Carrelet	
	a	r ²	a	r ²
Cadaverine	9,95	0,9673	10,24	0,9935
Histamine	12,46	0,9440	12,693	0,9818
Methylamine	5,61	0,9698	5,71	0,9937
Putrescine	8,39	0,9756	8,29	0,9925
Spermidine	13,83	0,9661	11,89	0,9758
Spermine	16,99	0,9635	12,79	0,9716
Tryptamine	29,24	0,9364	31,26	0,9815
Tyramine	15,12	0,9189	14,71	0,9721

a : pente des droites de régression ; r : coefficient de détermination

Les valeurs ci-dessus sont utilisées dans la suite pour la quantification des différentes amines lors de l'étude de l'évolution en fonction de l'altération.

2.7. Conclusion préliminaire :

On a pu montrer l'intérêt d'avoir une méthode de quantification adaptée au substrat sur lequel on travaille. En effet, les différences observées entre une méthode de quantification des amines par des solutions standards et une méthode par ajouts dosés directement sur le tissu musculaire du poisson apparaissent très importantes. Elles sont de nature à modifier l'indice

d'amines (IA') qui nous sert actuellement avec l'indice de fraîcheur (IF) à corrélérer le niveau d'altération.

Il apparaît aussi que cette démarche était nécessaire sachant que l'on utilise une méthode où l'on détermine des quantités très faibles (quelques ppm). Il faut donc se rapprocher au maximum des concentrations réelles du poisson en tenant compte de l'effet matrice.

2.8. Utilisation des amines biogènes dans la détermination d'un indice de qualité sur du merlan et du carrelet :

2.8.1. Plan d'échantillonnage :

Les différents suivis d'altération ont été conduits sur des lots (populations) de poissons provenant d'une pêche au chalut. Les deux espèces concernées sont le merlan (*Merlangus merlangus*) et le carrelet (*Pleuronectes platessa*). Les lots, contenant une cinquantaine d'individus de 300 à 400 grammes (non éviscérés), ont été stockés immédiatement après la pêche dans des conditions similaires à celles ordinairement pratiquées, à savoir dans des caisses fermées, sous glace fondante et dans une enceinte à 0-2°C.

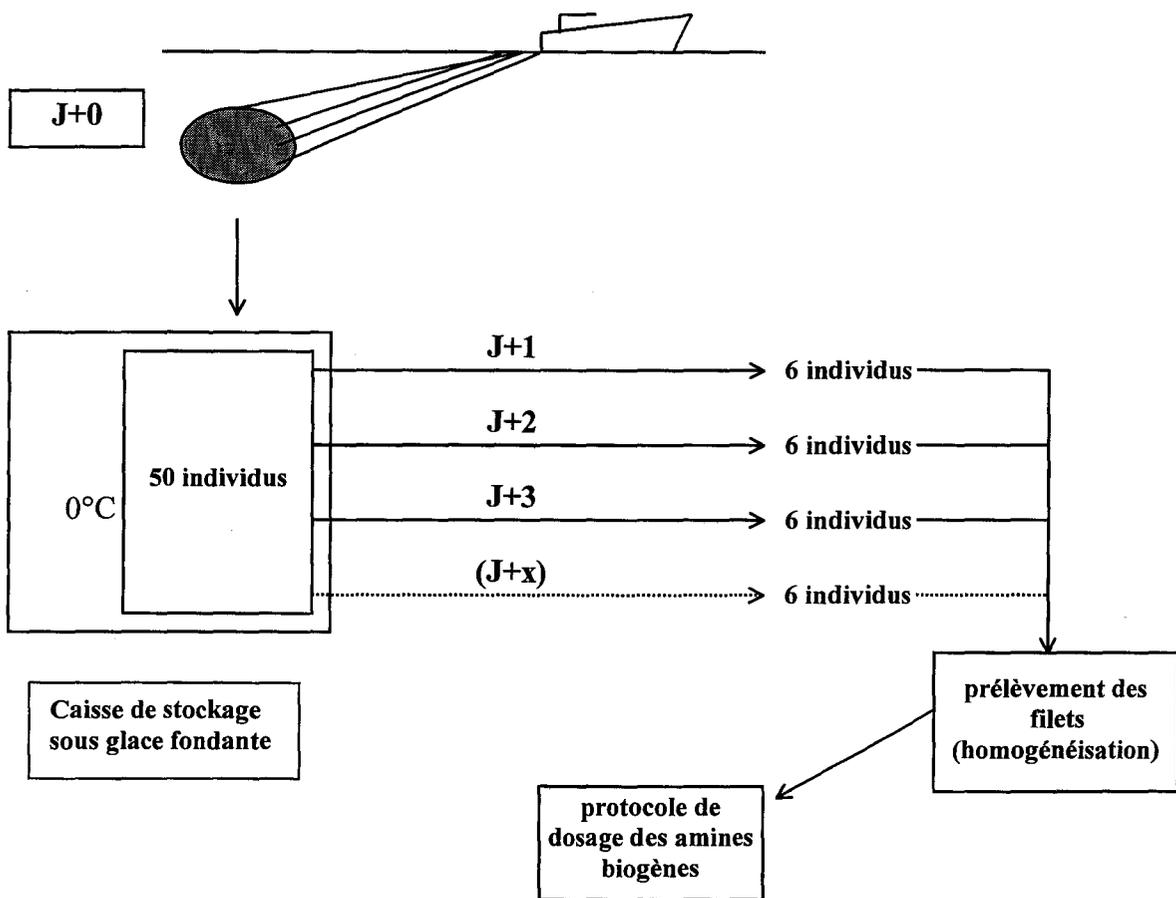
La fonte de la glace pouvant à terme engendrer des phénomènes de lessivage et de gradient de contamination bactérienne, nous avons, pour chaque jour d'échantillonnage, procédé au prélèvement de six unités réparties différemment dans la caisse (figure 19).

Les espèces les mieux représentées dans le détroit du Pas-de-Calais ont été étudiées préférentiellement. L'approvisionnement local nous garantit une qualité de fraîcheur des échantillons.

Le nombre de poissons prélevés (6 par jour) a été déterminé pour être le plus représentatif des différents stades d'altération (IF), mais il a été limité pour des raisons techniques à trente analyses par jour (y compris la préparation).

Le plan de recherche devant tenir compte de certains impératifs techniques mais aussi économiques, il se devait également d'aboutir à l'obtention de résultats non triviaux et généralisables. Nous avons ainsi effectué quelques essais qui nous ont montré que cet échantillonnage permettait d'obtenir à des résultats satisfaisants quant à l'homogénéité des réponses et à la possibilité de généralisation.

Figure 19 : Représentation des opérations de traitement des échantillons.



2.8.2. Détermination de l'indice d'amines :

Les différentes études traitant du dosage des amines biogènes ont montré que la diversité de constitution biochimique, comme les différents niveaux de contamination

bactérienne, ne permettaient pas de juger d'après la concentration d'une seule amine de l'état de fraîcheur d'un échantillon.

Ce constat a donc motivé l'élaboration d'indices d'amines qui, en considérant les concentrations des différentes amines, permettent de traduire plus fidèlement le niveau d'altération des échantillons.

Nous utiliserons pour traiter les résultats de nos différents suivis, un indice d'amines dérivé de celui proposé par Vallé (1996), mais dans lequel nous avons apporté quelques modifications.

+ En premier lieu, en raison du caractère volatil de l'ammoniaque, ce composé ne sera pas considéré :

- en effet, les droites de régression par ajouts dosés ne peuvent pas être déterminées précisément,

- mais aussi les pertes occasionnées à l'échantillon ne pouvaient en outre pas être corrigées par l'étalonnage interne (puisque ces pertes sont aléatoires car étrangères aux étapes de manipulations et dues au caractère très volatil).

+ De plus, nous avons noté une diminution des concentrations en tyramine et tryptamine au cours du temps, si bien que ces composés seront désormais placés au dénominateur de notre rapport (les composés du numérateur étant ceux qui tendent à augmenter durant l'altération).

L'indice d'amines que nous proposons devient donc (quantités en ppm) :

$$IA' = \frac{\text{Put} + \text{Cad} + \text{Hist}}{\text{Put} + \text{Cad} + \text{Hist} + \text{Tyr} + \text{Met} + \text{Tryp} + \text{Spd} + \text{Sp}} \times 100$$

D'après les valeurs que nous avons obtenues au cours de nos suivis, nous calculerons les différents indices d'amines pour les espèces carrelet et merlan. Ceux-ci pourront être représentés en fonction de l'indice de fraîcheur déterminé par des tests organoleptiques.

L'indice de fraîcheur (IF), déduit d'après le barème français de cotation, nous permettra donc de relier niveau d'altération et indice d'amines. On pourra donc envisager à terme une approche relativement fiable du niveau de qualité du poisson sans qu'il soit pour autant nécessaire de passer par des tests organoleptiques (l'IF pouvant être déduit d'après la valeur de l'IA').

2.8.3. Indice de fraîcheur, effet notateur

Pour la suite de cette étude, il nous faut une référence en matière de qualité plus objective que les jours de conservation ; pour cela nous utilisons l'indice de fraîcheur issu d'une analyse organoleptique. Pour chaque poisson, quatre notateurs estiment les différents critères (peau, œil, branchies...) et attribuent une note globale moyenne. Chaque poisson est noté quatre fois. On peut suivre ainsi l'évolution des IF au cours de la conservation des poissons entiers sous glace fondante. Pour le merlan, l'étude porte sur 53 individus et pour le carrelet sur 17 seulement, où seuls des gros poissons sont retenus dans le lot. Il est intéressant de noter que l'on couvre en détail les différents stades d'indice de fraîcheur, ce qui va nous servir pour la suite du travail et surtout pour tirer des conclusions. L'effet du notateur sur la valeur de l'IF est testé par un modèle de covariance. La première partie du travail consiste à vérifier l'homogénéité des notateurs car ce sont les révélateurs de la fraîcheur et ce sont nos références du niveau d'altération dans cette étude.

L'analyse de covariance est réalisée de la façon suivante :

$$IF_{ij} = \text{intercept} + \alpha_i + (b+c_i) * IA'_{ij} + e_{ij}$$

(où α_i est le terme correspondant à l'effet notateur i (merlan ou carrelet) ; b est le terme correspondant à IA' ; c_i est le terme correspondant à l'interaction entre IA' et notateurs).

L'analyse de covariance avec interaction notateurs et IA' montre pour le merlan et le carrelet que les interactions entre l'IA' et les notateurs ne sont pas significatives (probabilités associées pour le merlan = 0,63 et pour le carrelet = 0,69). On restreint donc le modèle de covariance à un modèle sans interaction.

Les modèles montrent pour les deux poissons un effet significatif ($Pr < 0,001$) des notateurs par l'analyse de covariance sans interaction selon le modèle suivant :

$$IF_{ij} = \text{intercept} + \alpha_i + b * IA'_{ij} + e_{ij}$$

L'analyse montre (tableau 33) que le notateur 1 fournit des valeurs très inférieures aux 3 autres notateurs qui, eux, ne sont pas significativement différents à 5% (probabilités associées pour le merlan = 0,07 et pour le carrelet = 0,79). On ne retient donc que les notateurs 2, 3 et 4 (figures 20 et 21). Les droites de régression des figures 1 et 2 sont obtenues par des modèles de régression simple ($IF_j = \text{intercept} + b * IA'_j + e_j$). La cohérence des notateurs 2, 3 et 4 va nous permettre de poursuivre l'étude en les utilisant comme référence de notre test organoleptique.

Figure 20 : Représentation des droites de régression relatives au carrelet pour les notateurs 2 *, 3 ● et 4 ◇.

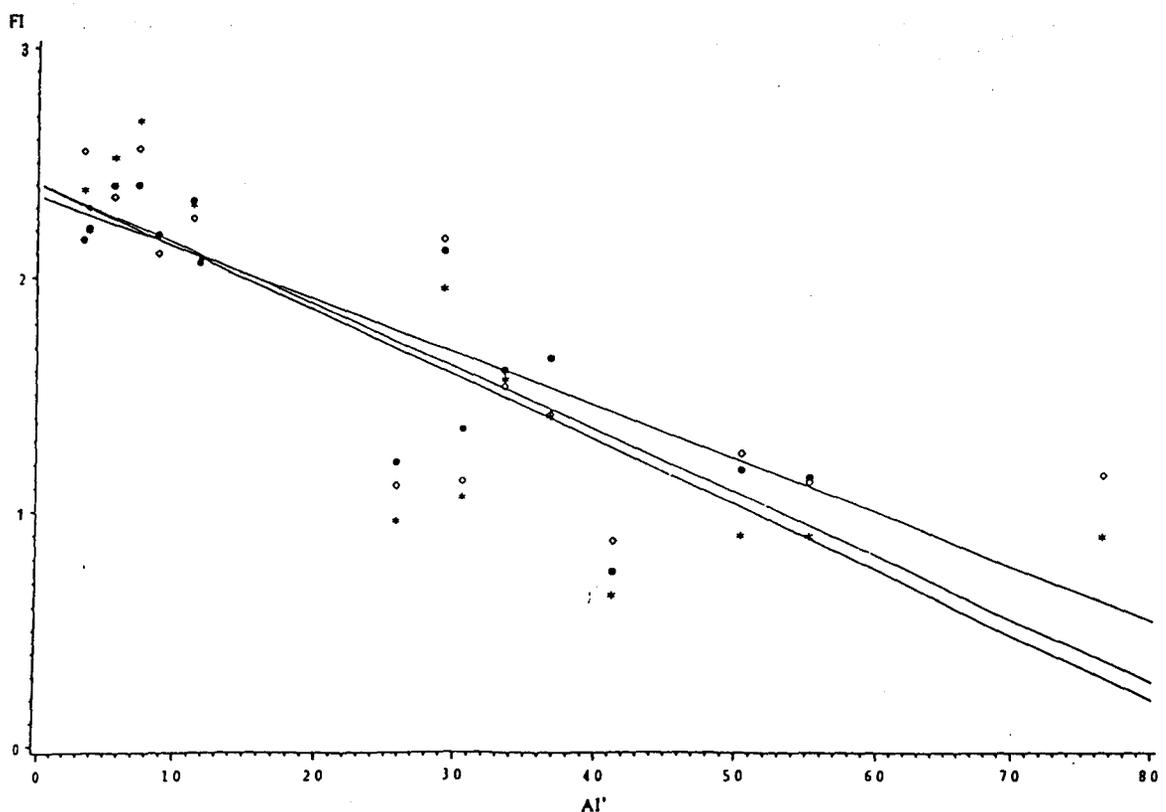
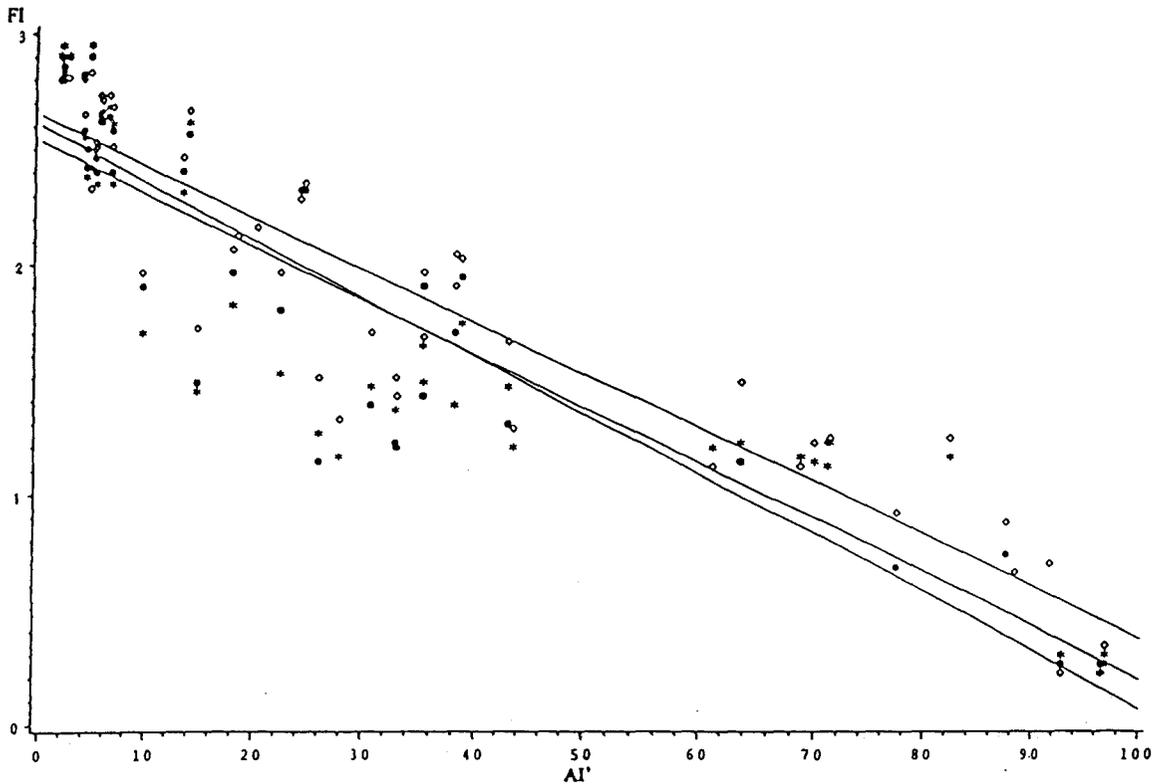


Figure 21 : Représentation des droites de régression relatives au merlan pour les notateurs 2 *, 3 ● et 4 ◇.



2.8.4. Evolution de l'indice (IA') en fonction de l'indice de fraîcheur (IF) :

Nous avons réalisé un suivi d'altération sur deux semaines pour deux espèces : le merlan et le carrelet. Le tableau 33 page suivante représente pour chaque échantillon :

- La note de l'indice de fraîcheur déterminée par un panel de quatre personnes.
- L'IA' calculé à l'aide du rapport via les droites de régression par ajout dosé.
- Chaque échantillon est représenté par son jour d'altération (1^{er} chiffre) et par son numéro d'ordre (2^{ème} chiffre). Ex : 8.3 – 3^{ème} poisson du 8^{ème} jour de conservation sous glace.

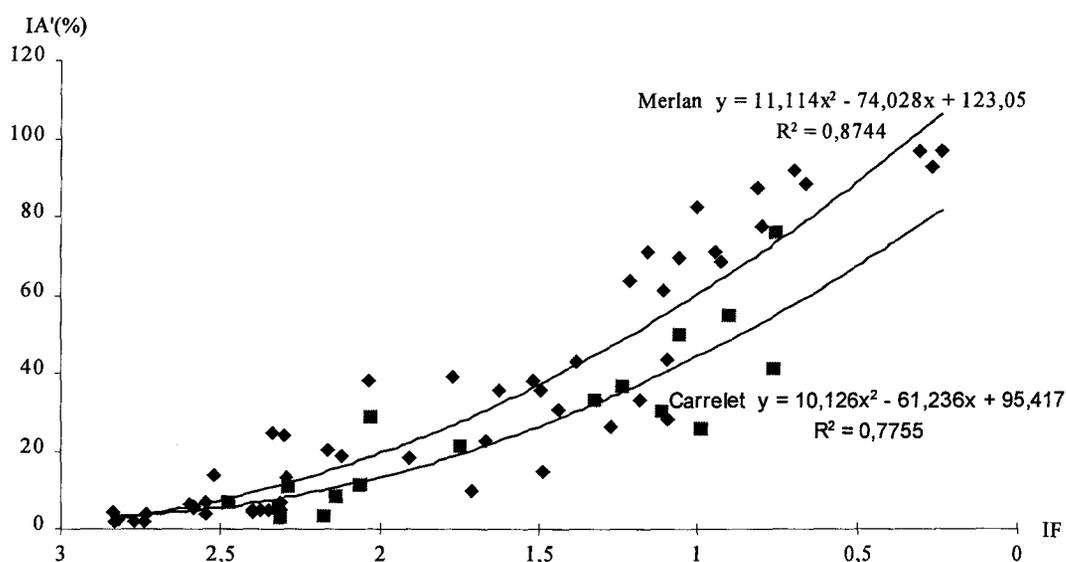
Tableau 33 : Valeurs de l'indice d'amines et de l'indice de fraîcheur de deux échantillons de poisson.

Ech.	Merlan						Carrelet					
	IA'		Indice de fraîcheur				IA'		Indice de fraîcheur			
			note 1	note 2	note 3	note 4			note 1	note 2	note 3	note 4
1.1	1,75	0,24	2,5	-	2,91	2,8	7,07	0,84	2,16	2,16	2,38	2,55
1.2	1,90	0,28	2,66	2,9	2,95	2,81	5,33	0,72	2,25	2,4	2,68	2,56
1.3	4,62	0,66	2,66	2,9	2,95	2,83	-	-	-	-	-	-
1.4	2,50	0,40	2,66	2,9	2,91	2,81	-	-	-	-	-	-
1.5	2,07	0,32	2,58	2,86	2,83	2,8	-	-	-	-	-	-
1.6	3,91	0,59	2,5	2,82	2,81	2,8	-	-	-	-	-	-
2.1	14,02	1,15	2,25	2,56	2,61	2,66	3,15	0,50	2	2,4	2,52	2,35
2.2	6,36	0,80	2,33	2,64	2,68	2,73	10,94	1,04	2	2,21	2,2	2,3
2.3	5,50	0,74	2,33	2,62	2,65	2,73	-	-	-	-	-	-
2.4	5,69	0,76	2,33	2,62	2,66	2,71	-	-	-	-	-	-
2.5	6,85	0,84	2,3	2,58	2,61	2,68	-	-	-	-	-	-
2.6	3,96	0,60	2,4	2,58	2,55	2,65	-	-	-	-	-	-
3.1	5,17	0,71	2	2,4	2,35	2,51	3,53	0,54	2,25	2,33	2,31	2,25
3.2	6,73	0,83	2	2,4	2,35	2,51	8,49	0,93	1,91	2,11	1,95	2,16
3.3	13,49	1,13	2	2,4	2,31	2,46	-	-	-	-	-	-
3.4	4,26	0,63	2,3	2,42	2,38	2,5	-	-	-	-	-	-
3.5	5,12	0,71	2,3	2,4	2,41	2,5	-	-	-	-	-	-
3.6	5,07	0,70	2	2,46	2,4	2,53	-	-	-	-	-	-
4.1	4,71	0,67	-	2,42	-	2,33	11,46	1,06	-	2,18	-	2,1
4.2	24,23	1,38	-	2,32	-	2,28	28,83	1,46	-	2,06	-	2,06
4.3	24,58	1,39	-	2,32	-	2,35	-	-	-	-	-	-
5.1	38,22	1,58	-	-	-	2,04	-	-	-	-	-	1,75
5.2	18,53	1,27	-	-	-	2,12	-	-	-	-	-	-
5.3	20,28	1,31	-	-	-	2,16	-	-	-	-	-	-
6.1	18,11	1,26	1,8	1,96	1,82	2,06	33,21	1,52	0,5	1,65	1,4	1,41
6.2	9,81	0,99	1,3	1,9	1,7	1,96	36,46	1,56	0,6	1,6	1,56	1,53
6.3	38,77	1,59	1,4	1,94	1,74	2,02	-	-	-	-	-	-
6.4	38,18	1,58	1,1	1,7	1,38	1,9	-	-	-	-	-	-
6.5	35,44	1,55	1	1,9	1,64	1,96	-	-	-	-	-	-
6.6	22,49	1,35	1,4	1,8	1,52	1,96	-	-	-	-	-	-
7.1	30,77	1,49	1,2	1,38	1,46	1,7	30,29	1,48	0,9	1,35	1,06	1,13
7.2	35,39	1,55	1,4	1,42	1,48	1,68	50,07	1,70	0,9	1,18	0,9	1,25
7.3	43,01	1,63	1,1	1,3	1,46	1,66	-	-	-	-	-	-
7.4	14,83	1,17	1,3	1,48	1,44	1,72	-	-	-	-	-	-
8.1	33,11	1,52	0,9	1,2	1,2	1,42	25,59	1,40	0,41	1,15	0,9	1,13
8.2	32,98	1,52	1,2	1,22	1,36	1,5	54,86	1,74	0,66	1,21	0,96	1,11
8.3	26,02	1,42	1,2	1,14	1,26	1,5	-	-	-	-	-	-
8.4	63,51	1,80	1	1,14	1,22	1,48	-	-	-	-	-	-
9.1	69,84	1,84	0,8	-	1,14	1,22	41,06	1,61	0,2	-	0,9	1,16
9.2	71,07	1,85	0,5	-	1,12	1,22	-	-	-	-	-	-
9.3	27,96	1,45	0,8	-	1,16	1,32	-	-	-	-	-	-
9.4	82,31	1,92	0,6	-	1,16	1,24	-	-	-	-	-	-
10.1	43,51	1,64	0,8	-	1,2	1,28	76,15	1,88	-	0,75	0,65	0,88
10.2	71,18	1,85	1	-	1,22	1,24	-	-	-	-	-	-
10.3	61,18	1,79	1	-	1,2	1,12	-	-	-	-	-	-
10.4	68,75	1,84	0,5	-	1,16	1,12	-	-	-	-	-	-
11.1	87,55	1,94	-	0,74	-	0,88	-	-	-	-	-	-
11.2	77,42	1,89	-	0,68	-	0,92	-	-	-	-	-	-
12.1	91,75	1,96	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-
12.2	88,60	1,95	-	-	-	0,66	-	-	-	-	-	-
13.1	96,92	1,99	-	0,26	0,3	0,34	-	-	-	-	-	-
13.2	92,94	1,97	-	0,26	0,3	0,22	-	-	-	-	-	-
13.3	96,61	1,99	-	0,26	0,22	0,22	-	-	-	-	-	-

Dans un premier temps, nous avons représenté $IA' = f(IF)$ en ajustant par une régression polynomiale du second degré (figure 22). Il apparaît que la droite d'ajustement du carrelet a une allure proche de celle obtenue sur le merlan. L'évolution plus faible de l'indice d'amines du carrelet au cours du temps est due vraisemblablement à un bon maintien des caractéristiques organoleptiques sur cette période de suivi. L'utilisation de l'IF dans l'expression de l'indice d'amines permet de tenir compte des propriétés de conservation du poisson au regard des quantités d'amines produites. Il s'ensuit qu'en dépit des moindres variations de l'IA' relevées sur le carrelet, le comportement de la droite d'ajustement se révèle proche de celui du merlan.

La détermination de l'IA' parallèlement à l'analyse sensorielle des principaux caractères du sujet est préférable à une expression en fonction du temps. Toutefois, la modélisation de cette évolution par une équation du second degré présente l'inconvénient d'être peu marquée en début d'altération ($IF > 2-2,5$), nous décidons de linéariser les évolutions.

Figure 22 : Représentation de l'indice d'amines (IA') en fonction de l'indice de fraîcheur (IF), pour deux espèces de poisson.

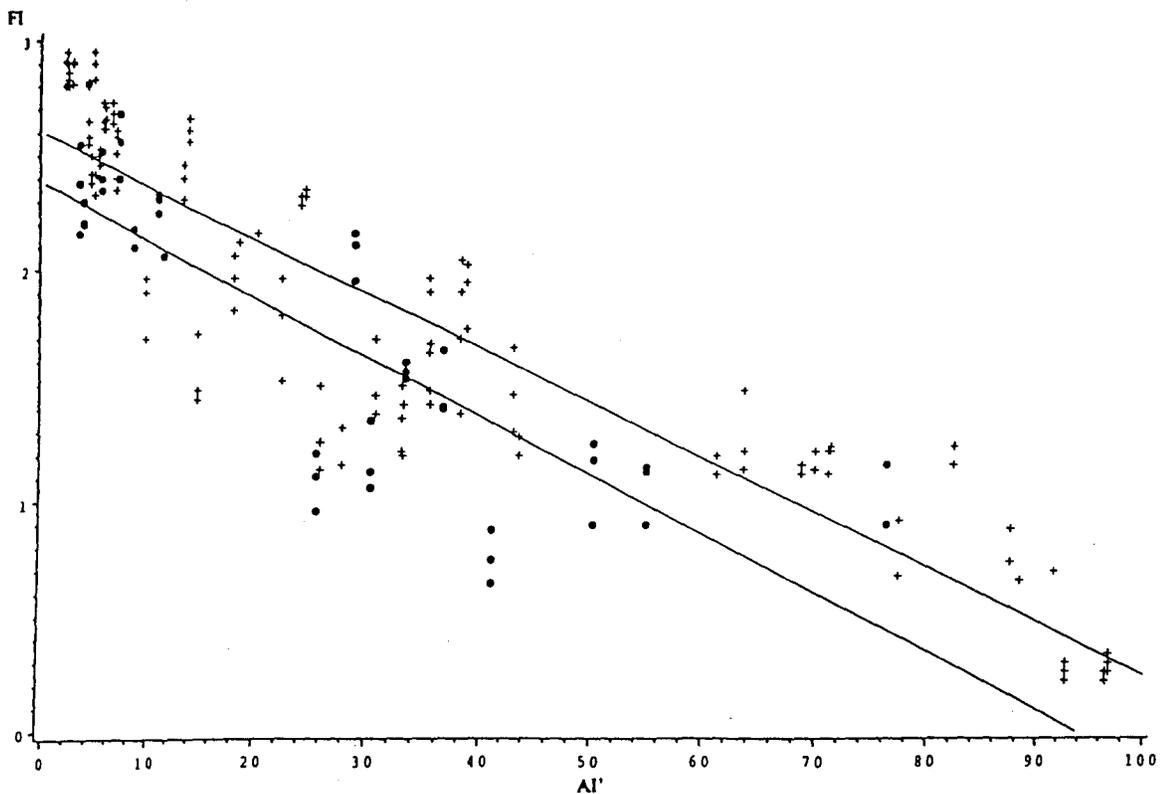


Pour cela, on réalise un modèle de covariance sur toutes les valeurs attribuées au carrelet et au merlan. Une analyse de covariance expliquant IF par rapport à IA' et le facteur poisson (carrelet et merlan) montre un effet significatif du facteur poisson sans interaction avec IA'. On peut donc relier IF et IA' par une régression simple pour chaque poisson pour les trois notateurs (2, 3 et 4), présentée dans la figure 23. On peut prédire IF en fonction de IA' selon le modèle de régression suivant :

- Merlan : $IF = 2,6 - 0,024 IA'$

- Carrelet : $IF = 2,38 - 0,025 IA'$

Figure 23 : Evolution de l'IF en fonction de l'IA' au cours de l'altération du merlan + et du carrelet ●.



Les deux coefficients directeurs sont très proches et laissent penser que la dégradation s'est effectuée de manière similaire sur les deux poissons. De ce fait, les droites apparaissent

aussi assez proches et facilitent l'interprétation de valeurs seuils de rejet. On peut juste noter un décalage entre elles, qui peut être expliqué par le fait que les deux poissons n'avaient pas la même qualité initiale. Cette hypothèse semble peu probable car ils sont issus de la même pêche. Par contre, on peut plutôt envisager que le décalage se situe au niveau de notation (IF) car ces poissons sont organoleptiquement très différents. L'un ou l'autre des poissons a peut-être été sur ou sous-estimé malgré une notation homogène. L'utilisation de telles droites nous permet de définir une valeur de rejet pour chacun des poissons. Elle correspond à la valeur limite de qualité consommable de l'IF.

On caractérise alors cette valeur :

	pour le carrelet : $IA' = 15$
et	pour le merlan : $IA' = 25$

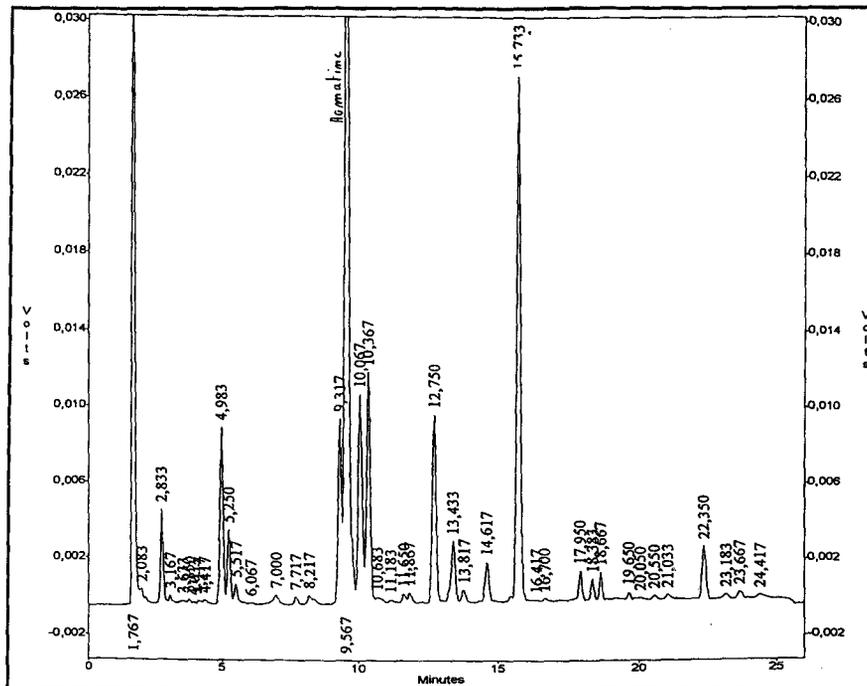
2.9. Application : dosage des amines biogènes dans la farine de poisson :

Le dosage des amines biogènes dans la farine de poisson est l'une des applications de notre méthode qui est utilisée par les professionnels comme critères de qualité. Pour caractériser leurs produits, ils se basent sur les quantités de putrescine, de cadavérine, d'histamine et d'agmatine.

2.9.1. Dosage de l'agmatine :

Précédemment, nous ne nous sommes pas intéressés au dosage de l'agmatine qui se trouve en quantité très faible, voire même indétectable dans le poisson. Aucune référence ne s'y rapporte. On peut par contre la doser dans la farine de poisson car elle s'y trouve plus concentrée comme les autres amines. A l'aide d'une solution standard, on a mis en évidence le temps de rétention directement dans un échantillon par ajout (présenté sur la figure 24).

Figure 24 : Chromatogramme d'identification de l'agmatine.



2.9.2. Droites de régressions des amines biogènes dans la farine :

On utilise la méthodologie des ajouts dosés (Chapitre 2.3.2, *Résultats*) décrite précédemment. On peut remarquer dans le tableau 34 des différences avec le poisson. En effet, le dosage sur cette matrice (farine) qui est beaucoup plus concentrée que le poisson induit forcément les mêmes différences qu'entre le dosage en solution et par ajout observées auparavant sur la chair de poisson avec une intensité plus accentuée. On peut souligner, à nouveau, l'importance de réaliser les droites de régression directement sur la matrice à doser par la méthode des ajouts. Aucune autre adaptation du protocole et de la méthodologie n'est nécessaire pour effectuer ces dosages en routine.

Tableau 34 : Coefficients directeurs utilisés pour la farine de poisson.

Amines biogènes	Farine de poisson	
	a	r ²
Cadaverine	45.38	0.9644
Histamine	61.7	0.97
Putrescine	36.59	0.9934
Spermidine	13.83	0.9661
Agmatine	53.72	0.963

a : pente des droites de régression ; r : coefficient de détermination

2.10. Conclusion :

Au cours de ce chapitre nous avons montré qu'il est indispensable de posséder une méthode de quantification irréprochable, surtout à des niveaux de détection très faibles. On a pu mettre en évidence l'influence de la matrice lors du dosage des amines biogènes pour le carrelet et le merlan. L'altération du tissu musculaire induit un changement de la matrice qui modifie les coefficients directeurs des droites de régression : pour prendre en compte ces évolutions, on détermine les droites de régression sur plusieurs jours d'altération, ce qui permet une quantification plus juste. On peut noter les points importants dans le changement de la méthode de calcul :

- l'utilisation de l'étalon interne permet de déterminer des facteurs de réponse prenant en compte directement le rendement propre aux manipulations ;
- les droites de régression sont déterminées par la méthode des ajouts dosés, ce qui permet d'inclure dans le calcul l'effet matrice du substrat qui n'est pas identique d'un échantillon à l'autre, d'une espèce à l'autre, d'un niveau d'altération à l'autre ;
- la proposition logique d'un nouvel indice d'amines qui ne tient plus compte de l'ammoniac où les rendements de récupération sont très faibles, non reproductible et surtout non proportionnels à ceux amines biogènes ;
- l'utilisation de nouveaux critères de fraîcheur avec une méthode de notation plus rigoureuse et plus détaillée.

Ces travaux ont consisté à revoir entièrement la méthode de quantification et ont permis d'aboutir à un modèle de calcul et surtout une démarche qui peut être appliquée à d'autres molécules comme par exemple les dérivés nucléotidiques.

En ce qui concerne les applications, on a mis en place, en définissant le plan d'échantillonnage, un système de notation qui permet une estimation plus objective des analyses organoleptiques à l'aide de trois notateurs très homogènes qui ont pu nous servir de référence pour les suivis d'altération du carrelet et du merlan. Pour ces deux espèces, l'évolution de l'IA' a montré, malgré une différence de niveaux, des similitudes dans les modèles. En effet, l'IA' augmente à la même vitesse au cours de l'altération pour les deux espèces. A l'issue de ces études, on peut proposer les valeurs de rejets suivantes : IA'=15 pour le carrelet et IA'=25 pour le merlan.

2.11. Perspectives :

Elles sont simples à définir et réalisables dans un délai court. En effet, la méthode de séparation est optimisée et la méthode de quantification permet une exploitation fiable des données. Pour finaliser les recherches dans ce domaine, il reste à appliquer à d'autres espèces (en définissant leur nombre) l'ensemble de cette méthodologie pour envisager à court terme son exploitation. L'application à de nombreuses espèces permettra aussi de déterminer peut être de nouveaux modèles de dégradation qui pourront être généralisés.

3^{ème} partie : les composés volatils

Comme nous l'avons souligné dans le chapitre 8.3 (*Généralités*), l'intérêt porté aux composés volatils a été au départ orienté exclusivement sur les amines volatiles, notamment sur l'ABVT (Azote Basique Volatil Total). Le dosage de l'ABVT accompagné de celui de la TMA (Triméthylamine) permet de déterminer dans certaines conditions des seuils de rejet de fraîcheur du poisson. L'ambition de cette étude sur les composés volatils a été d'affiner cette approche globale à l'aide de moyens techniques permettant de caractériser la nature des composés et de diminuer les seuils de détection pour pouvoir définir plus précocement la fraîcheur. La finalité de ce travail est d'élargir cette méthode à l'ensemble des composés aromatiques (odorants) pouvant être produits au cours de l'altération. Pour cela, après avoir analysé la composition de l'ABVT, nous avons comparé à partir des données bibliographiques différentes techniques de récupération des composés volatils dans le but de choisir la mieux adaptée à notre matrice poisson. Nous avons ensuite envisagé les différentes applications sur le substrat.

Le travail de cette partie s'appuie :

- sur le chapitre 3.4.3 et 3.5 des généralités
- sur le chapitre 5 des matériels et méthodes

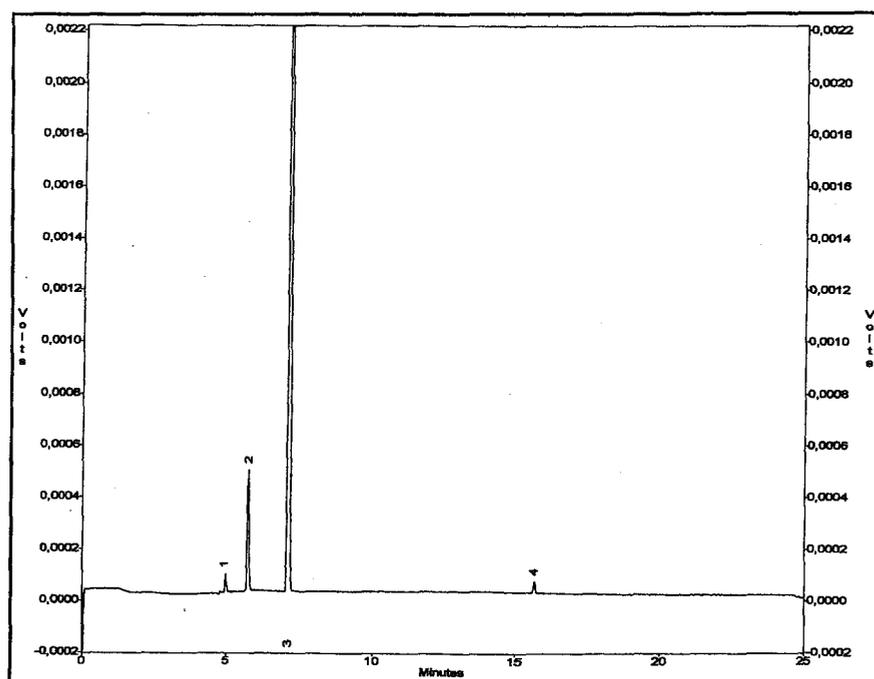
1. CARACTERISATION DU DOSAGE D'ABVT PAR GC ET GC-MS :

Afin de mieux comprendre à quoi correspond le dosage de l'ABVT, nous avons essayé de caractériser les différents produits qui le composent et déterminer leurs influences lors de ces dosages.

1.1. Analyse par chromatographie de phase gazeuse :

L'analyse a été effectuée sur le distillat récupéré dans l'acide borique après entraînement à la vapeur d'un échantillon déprotéinisé selon la méthode présentée dans le chapitre 3 (*Matériels et méthodes*). La préparation de l'échantillon pour la séparation chromatographique (figure 25) a été réalisée selon le protocole headspace du chapitre 5 (*Matériels et méthodes*). Pour favoriser la volatilisation des composés aminés, on s'est placé en milieu basique à l'aide de K_2CO_3 (1,4 % (p/v) ; 2 mL). Afin de limiter les pertes, l'ajout de K_2CO_3 s'est fait après congélation du distillat.

Figure 25 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un extrait de distillat d'ABVT.



On peut noter une faible diversité des produits qui composent l'ABVT. En effet, après plusieurs essais en modifiant la quantité de distillat, la nature et la quantité de solution basique (K_2CO_3 , KOH et NaOH), mais aussi la température de préparation de la solution en headspace (60, 80, 100, 110 °C) et le volume injecté (jusqu'à 1 mL de gaz et 5 μ L de solution), cette observation est toujours identique et on ne sépare toujours que quatre composés majoritaires par cette méthode.

1.2. Identifications par spectrométrie de masse :

Pour identifier les composés précédents, nous avons effectué une analyse par spectrométrie de masse en mode impact électronique couplé au chromatographe de phase gazeuse selon les paramètres définis dans le chapitre 5.2 (*Matériels et méthodes*).

Tableau 35 : Identification des composés de l'ABVT (figure 25) en spectrométrie de masse.

Pic n°	Noms	CS	Annexes
1	Triméthylamine	889	1
2	Diméthylsulfide	820	2
3	Chloroforme	850	3
4	Tétrachloroéthylène	908	4

CS : coefficient de similitude

Triméthylamine : la présence de la triméthylamine est tout à fait normale et correspond aux descriptions de la littérature (Liston, 1980 et Malle, 1989). Elle provient de l'action des bactéries essentiellement sur l'oxyde de triméthylamine mais aussi sur la choline (Ikeda, 1980). On a réalisé une vérification à l'aide d'un standard (Sigma Aldrich) à la fois en chromatographie gazeuse avec une correspondance du temps de rétention mais aussi en GC-MS avec une similitude de dégradation des fragments. De plus, la comparaison entre le spectre de masse de notre produit et celui référencé permet aussi de confirmer cette identification (annexe 1).

Diméthylsulfide : on peut faire la même remarque que précédemment, son origine est bactérienne par action sur des acides aminés soufrés comme la cystéine et la méthionine (Herbert, 1975). Whitefield (1984) a mis en évidence ce produit comme participant à l'arôme lié à la dégradation du poisson. Le spectre de masse de ce composé (annexe 2) suit une fragmentation caractéristique correspondant à celle référencée permettant de ne pas avoir de

doute. En effet, on observe bien le pic de base à $m/z = 62$ (masse du produit : M), puis on a $M-CH_3 = 47$ et $M-35 = 27$.

Chloroforme et tétrachloroéthylène : nous n'allons pas nous attarder sur ces deux produits car ce sont des contaminants mis en évidence par un contrôle sans échantillon (blanc). Ils doivent résulter de l'interaction entre la soude permettant de déplacer l'équilibre pour volatiliser les produits et l'acide trichloroacétique utilisé pour déprotéiniser l'échantillon.

1.3. Conclusion :

On ne constate pas la présence de nombreux produits et surtout pas d'amine, à l'exception de la triméthylamine. Ceci est peut être dû à la méthode de dosage car on ne récupère pas non plus l'ammoniaque largement décrit dans la littérature. Pourtant le protocole prévoit une étape de congélation évitant au maximum les pertes lors de l'ajout de base. Nous allons explorer d'autres techniques plus originales permettant de récupérer une diversité plus importante de composés volatils.

2. COMPARAISONS DE DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION :

Avant toute identification de composé ou étude de leur évolution en fonction de l'altération, nous avons tout d'abord testé différentes techniques d'extraction des produits volatils permettant de récupérer un maximum de composés à partir de notre matrice. Toutes ces méthodes font référence à différents travaux développés dans les généralités. Par souci de clarté, il n'est pas possible de présenter tous les chromatogrammes (seuls des chromatogrammes types seront joints). L'analyse se fera dans certains cas à l'aide d'un tableau où chaque pic sera représenté par son temps de rétention.

Le poisson est un substrat ayant une composition complexe et surtout variable à cause des modifications mal connues intervenant au cours de l'altération. Pour ces raisons, nous avons envisagé une comparaison de techniques très différentes pouvant favoriser la récupération spécifique de produits.

Notre travail s'est organisé de la manière suivante :

- étude directe sur de la chair après chauffage ou passage aux ultrasons,
- distillation sous vide,
- utilisation de sacs Stomacher,
- extraction à partir de solvants (dichlorométhane, pentane, toluène),
- SPME.

Afin d'éviter de nombreuses étapes de purification qui peuvent occasionner des pertes importantes de ces produits volatils, nous nous sommes orientés vers l'utilisation de la méthode headspace de préparation des échantillons juste avant l'injection en chromatographie gazeuse.

Remarque : ne peut être développé dans cette thèse tout le travail d'investigation technique qui a nécessité de nombreux essais. C'est pourquoi ne seront présentés parmi les résultats que ceux qui éclairent les problèmes rencontrés ou justifient la démarche engagée.

2.1. Application directe du système HS sur de la chair :

Nous avons utilisé la technique headspace décrite précédemment dans le chapitre 5 (*Matériels et méthodes*)(flacon de 22 mL, injection de 1 mL de phase gazeuse) directement sur des échantillons de chair de poisson après différents chauffages. Il convient de commencer au plus simple, en travaillant avec du poisson frais. Le temps de chauffage employé a été de 10 min, car au-delà on peut observer une dénaturation du tissu musculaire par cuisson qui peut générer des produits qui ne sont pas présents à l'état frais (chapitre 3.5.3.5, *Généralités*).

L'ajout de soude et la sonication sont des paramètres susceptibles de favoriser la volatilisation des composés.

Tableau 36 : Séparation par chromatographie gazeuse sur de la chair de poisson.

NaOH 15N (mL)	Ultra- sons (min)	T°C Tps	Résultats (temps de rétention correspondant aux différents pics observés)												
0	0	80/10	-	-	-	5,10	-	-	-	8,4	-	10,8	-	-	-
0	0	110/10	1,30	1,71	-	5,10	-	5,68	7,09	8,4	-	10,8	-	-	-
2	0	80/5	-	1,60	3,56	-	-	5,65	-	8,36	-	-	-	-	-
2	0	110/5	1,27	1,69	3,73	-	5,33	5,69	7,10	8,44	9,2	10,1	-	-	-
5	0	0	-	1,65	3,59	-	-	5,70	7,06	-	-	10,0	-	-	-
5	0	80/5	-	1,6	3,56	-	-	5,65	-	8,36	-	-	-	-	-
5	0	110/10	-	1,61	3,54	4,98	5,35	5,70	7,03	8,36	-	-	10,4	12,1	14,1
2	10	80/5	-	1,61	3,54	-	-	5,61	-	8,35	-	-	-	-	-
2	10	110/10	1,24	1,59	3,54	-	5,34	5,70	7,03	-	-	10,0	-	-	-
5	10	80/5	1,20	1,60	3,53	-	-	5,61	-	8,36	-	-	-	-	-
5	10	110/10	1,20	1,62	3,56	4,86	5,32	5,40	7,03	8,30	-	-	-	-	-

- : non identifié

Dans cette première étude (tableau 36), on ne s'est intéressé qu'à l'aspect qualitatif de la composition des produits collectés. On peut noter que la diversité des composés est liée aux conditions de préparation et qu'ils peuvent être classés de la manière suivante :

- ceux retrouvés dans tous les cas de figure aux temps de rétention de 1,6 ; 3,5 ; 5,6 et 8,3 min, c'est-à-dire dont le chauffage et les ultrasons ne modifient pas la présence ;

- le deuxième groupe de composés montre l'importance de la température. En effet, en dépassant la température d'ébullition de l'eau, on récupère

caractéristiquement 5 nouveaux produits aux temps de rétention suivants : 1,2 ; 4,8 ; 5,3 et 7,03 min.

La dernière remarque relative à cette étude est que le passage au préalable des produits aux ultrasons ne semble pas favoriser l'apparition de nouveaux composés. Pourtant, Easley (1981) avait inclus dans son protocole cette étape de sonication. Nous ne l'avons donc pas retenue pour la suite des essais sachant que nous avons pu vérifier son inutilité sur d'autres échantillons non présentés ici. Par contre nous avons conservé l'utilisation de la soude qui facilite par exemple l'extraction des composés basiques.

2.1.1. Conclusion sur l'application directe du système HS :

Cette première approche appliquée directement sur de la chair sans aucune étape de purification met en évidence la présence de composés volatils *a priori* différents de ceux retrouvés dans le dosage de l'ABVT. Ceci conforte à nouveau l'intérêt d'étudier ces produits par de nouvelles méthodes.

2.2. Distillation sous vide :

2.2.1. Etude préliminaire sur du cabillaud :

Pour cette étude, nous nous sommes inspirés des travaux de Triqui (1995) et avons adapté son protocole à notre matériel. On a établi la démarche suivante :

- ♦ A 300 g de chair, on a ajouté 300 mL d' HClO_4 0,2 N. On s'est débarrassé des protéines précipitées par filtration.
- ♦ La totalité du filtrat a été distillée sous vide à l'aide d'un appareil de type Buchi.
- ♦ Des fractions de 5 mL ont été collectées régulièrement dans la solution mère à distiller et dans le ballon de récupération du distillat. Elles sont soumises au protocole headspace décrit dans le chapitre 5 (*Matériels et méthodes*) (avec ou sans ajout de soude).

Tableau 37 : Séparation par chromatographie gazeuse des fractions de solution mère avant distillation sous vide.

Fraction Solution Mère	NaOH (mL)	T°C	Résultats (temps de rétention correspondant aux différents pics observés)							
1	0	110	3,54	-	-	5,87	8,02	-	-	14,4
1	1	110	3,55	5,1	5,67	-	8,02	-	-	-
2	0	110	-	-	-	5,80	8,02	-	-	-
2	1	110	-	5,1	5,67	-	8,01	-	-	-
3	0	110	3,5	-	-	5,80	8,02	10,8	-	-
3	1	110	3,5	5,1	5,60	-	8,01	10,8	-	-
4	0	110	3,5	-	-	5,80	8,02	10,8	-	-
4	1	110	-	5,0	5,60	-	8,01	-	-	-
5	0	110	3,5	-	-	-	8,02	10,8	-	-
5	1	110	3,5	4,8	5,60	-	8,02	10,8	12,6	-

- : non identifié

Concernant le tableau 37 (ci-dessus), on peut souligner la présence constante du pic à 8,02 min tout au long de l'extraction et quasiment celui à 3,5 min. Le pic à 5,87 min tend à disparaître contrairement à celui à 10,8 min. Pour les pics aux temps de rétention 5,1 et 5,6 min, il semble nécessaire d'être en milieu basique pour les doser (importance de la soude) alors que le produit au temps de rétention de 5,8 min disparaît.

Pour le tableau 38 (ci-après), on retrouve dans tous les cas des produits aux temps de rétention de 3,6 ; 5,9 ; 7,1 ; 8,08 et 11,1 min avec ou sans ajout de soude. Deux produits disparaissent rapidement (5,2 et 5,7 min) et on en note d'autres de manière « sporadique » à 9,5 et 12,1 min. Le composé au temps de rétention 14,1 apparaît en cours de distillation.

En comparant les deux tableaux 37 et 38, correspondant à ce qui est distillé et ce qui est collecté, on peut établir les remarques suivantes :

- on retrouve les mêmes produits à 3,6 ; 5,9 et 11,1 min. On récupère donc bien les composés initialement présents dans l'échantillon ;
- par contre, à 7,1 min, on a un nouveau produit qui se trouve certainement plus concentré dans le distillat, ce qui nous permet de le visualiser.

Tableau 38 : Séparation par chromatographie gazeuse des fractions de distillat après distillation sous vide

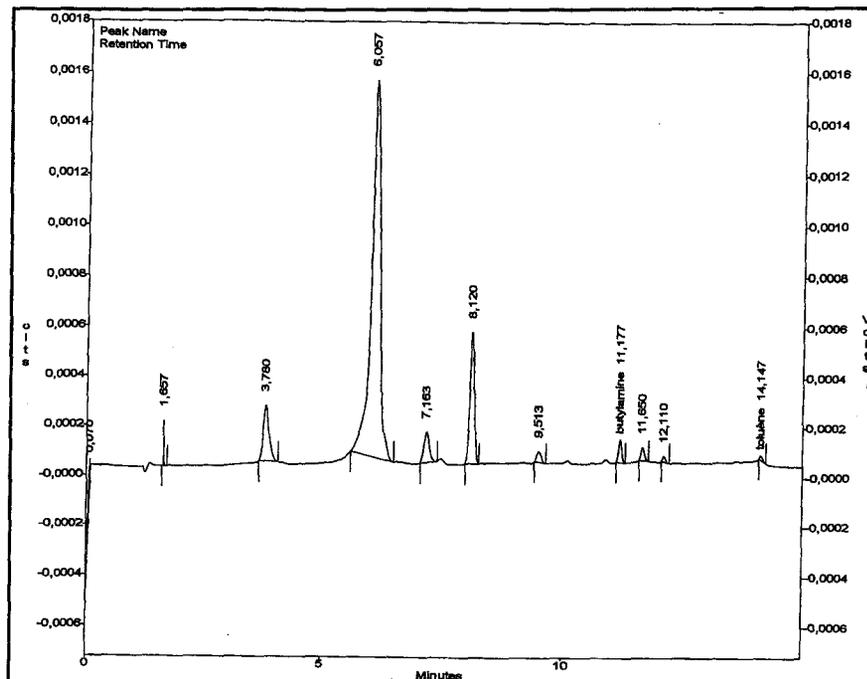
Fraction	NaOH	T°C	Résultats											
Distillat	(mL)		(temps de rétention correspondant aux différents pics observés)											
d1	0	110	-	3,6	5,1	5,7	5,9	7,1	8,06	-	11,1	-	-	-
d1	1	110	-	3,6	5,2	5,7	5,9	7,1	8,06	-	11,1	-	12,1	-
d2	0	110	-	3,6	-	-	5,9	7,1	8,06	-	11,1	-	-	14,1
d2	1	110	1,6	3,7	-	-	6,0	7,1	8,10	9,5	11,1	11,6	12,1	14,1
d3	0	110	-	3,6	-	-	5,9	7,1	8,08	-	11,1	-	-	14,1
d3	1	110	-	3,6	-	-	5,9	7,1	8,08	-	11,1	-	-	14,1
d4	0	110	-	3,6	-	-	5,9	7,1	8,07	-	11,1	-	-	-
d4	1	110	-	3,6	-	-	5,9	7,1	8,08	-	11,1	-	-	-

- : non identifié

Cette méthode permet bien de récupérer en continu des composés volatils par distillation d'un échantillon de poisson. D'un point de vue technique, le problème le plus important est la faible condensation des produits volatils à basse température, malgré l'utilisation d'un réfrigérant cryostaté proche de 0 °C. Il était donc indispensable de chauffer le filtrat à ébullition du bain-marie pour volatiliser brutalement une grande quantité de composés volatils. Pour remédier à ceci, l'une des solutions était d'utiliser un solvant à faible point d'ébullition pour entraîner les produits volatils et faciliter leur condensation. Nous avons donc introduit du méthanol dans la solution mère et distillé l'ensemble. Le nouveau problème est que la migration du méthanol se trouve située dans une zone intéressante du chromatogramme et qu'il est présent en quantité trop importante par rapport aux produits recherchés.

On peut proposer (figure 26) un chromatogramme type retrouvé dans cette étude.

Figure 26 : Séparation par chromatographie gazeuse de la fraction d2 avec de la soude.



2.2.2. Etude sur du maquereau :

On reprend la même méthodologie que précédemment : on a ajouté aux échantillons de maquereau de l' HClO_4 0,2 N (p/v) et on a récupéré le filtrat que l'on a distillé. On a ajouté les étapes suivantes :

- ♦ 1 à 5 mL de soude 15 N dans le filtrat à distiller,
- ♦ 20 % de NaCl (Tsukioka, 1993),
- ♦ Récupération du distillat dans de l' HClO_4 0,2 N,
- ♦ Ajout systématique de 1 mL de soude 15 N dans le flacon headspace.

L'intérêt de mettre de la soude et du NaCl directement dans le filtrat à distiller cette fois est de favoriser au maximum la volatilisation des produits, comme le montre Tsukioka (1993). L'utilisation d'acide perchlorique dans le distillat permet de piéger au fur et à mesure les composés volatils qui se condensent (l'équilibre est ensuite redéplacé pour l'analyse en chromatographie gazeuse) (tableau 39).

Tableau 39 : Importance de la concentration en NaOH et en NaCl pour la séparation par chromatographie gazeuse.

Fract. Dist.	NaOH (mL)	NaCl %	T°C	Résultats (temps de rétention - surface du pic)													
				3,6	5,7	7,1	8,06	9,4	11,6	12,1	519	29941	986	87	-	-	134
d1	1	0	110	3,6	5,7	7,1	8,06	9,4	11,6	12,1	519	29941	986	87	-	-	134
d2	3	0	110	3,6	5,7	7,1	8,07	9,4	11,6	12,1	814	47730	1287	621	420	75	286
d3	5	0	110	3,6	5,8	-	8,07	-	11,6	12,1	1026	14297	-	-	674	55	225
d4	5	20	110	3,6	5,7	7,1	8,06	9,4	11,6	12,1	886	56746	1003	830	339	-	325

- : non identifié

Comme on peut le constater dans le tableau 39, il n'est pas évident de tirer des conclusions. Les modifications apportées au filtrat et au distillat n'entraînent pas l'apparition de nouveaux produits. On peut seulement souligner que l'ajout de NaCl semble moins favoriser la volatilité des composés que la soude (à l'exception peut-être du pic à 8,06 min).

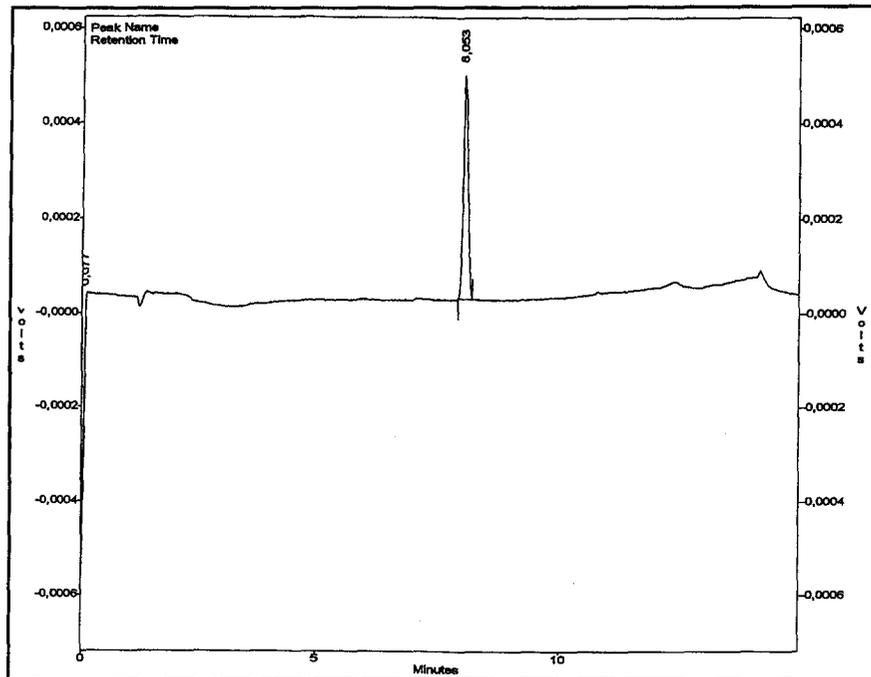
2.2.3. Etude sur du hareng :

On a pu constater au cours des études précédentes du maquereau de nombreuses pertes dues au système de pression sous vide qui entraînaient involontairement des produits volatils avant qu'ils se condensent. Pour cette raison, on a réalisé des prélèvements directement en haut de la colonne du réfrigérant en absence de vide afin de mettre en évidence la perte de produits qui ne se condenseraient pas.

Le résultat est facilement interprétable puisqu'on ne visualise qu'un seul pic au temps de rétention de 8,05 min (figure ci-après). On ne réussit donc pas à tout condenser. On imagine que pour des produits se trouvant en faible quantité dans l'échantillon, les pertes importantes les font passer en-dessous du seuil de détection. La solution serait de pouvoir utiliser un système cryogénique pour abaisser nettement la température du réfrigérant, ce qui condenserait très rapidement les produits en limitant nettement les pertes.

Des résultats similaires aux deux autres espèces ont été observés avec l'apparition de composés aux temps de rétention de 3,6, 5,7, 7,1, 11,6 et 12,1 min.

Figure 27 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de hareng.



2.2.4. Conclusion sur la distillation sous vide :

On a pu mettre en application cette méthode de récupération des composés volatils par distillation avec des résultats cohérents sur trois espèces (cabillaud, hareng, maquereau). La mise en place de cette technique a été facilitée par le peu de contraintes relatives au protocole et au matériel.

L'extraction par évaporation entraîne des pertes importantes. Ce problème est majeur et difficile à résoudre. En effet, certains produits en faible quantité dans l'échantillon peuvent disparaître. Cette technique ne peut être utilisée que sur des produits majoritaires et ne convient pas à notre approche qualitative.

2.3. Utilisation de sacs stomacher :

Le but de cette étude est double : tout d'abord augmenter le seuil de détection des composés en travaillant sur des quantités plus importantes de substrat et essayer à nouveau de montrer si l'utilisation du NaCl est intéressante comme le préconise Tsukioka (1993) dans ses travaux.

En référence aux travaux d'Olafsdottir (1997), nous avons travaillé sur des plus grandes quantités de produit et sur des plus gros volumes de phase gazeuse. Pour cela on a prélevé jusqu'à 100 g de chair placée dans des sacs plastiques (sac stomacher 305 mm x 180 mm) scellés hermétiquement et sur lesquels on a effectué les manipulations suivantes :

Tableau 40 : Séparation par chromatographie gazeuse d'échantillons de cabillaud.

Quantité (g)	Chauffage (1 H)	NaOH 15 N (mL/10 g)	NaCl (%)	Résultats (temps de rétention des différents pics observés)							
				1,7	5,2	5,6	5,9	8,0	11,5	-	-
50	60	0	0	1,7	-	-	5,9	8,0	11,5	-	-
	60	1	0	1,7	5,2	5,6	-	8,0	-	-	-
	60	1	20	-	5,1	5,6	-	8,0	-	-	-
	60	0	20	-	-	5,6	-	7,9	-	-	-
	60	1	20	1,7	5,1	5,6	-	8,1	-	-	-
100	70	1	5	1,7	5,1	5,6	-	-	-	-	-
	70	1	10	-	5,2	5,6	5,9	8,1	-	-	-
	70	1	20	1,7	5,1	5,6	-	8,1	-	-	-
	70	0	5	1,7	-	5,6	-	8,1	-	12,4	13,1
	70	0	10	1,7	-	5,6	-	8,1	-	-	-
	70	0	20	1,7	-	5,6	-	8,1	-	12,5	13,1

- : non identifié

Les résultats présentés dans le tableau 40 (ci dessus) ne sont pas conformes à ce que l'on pourrait attendre car on n'observe pas de nouveaux produits par rapport aux études

précédentes. De plus, comme on l'avait déjà démontré dans le paragraphe 2.2.2, l'ajout de NaCl ne semble pas favoriser l'apparition de nouveaux produits ou l'augmentation en quantité de ceux déjà présents. Globalement, on retrouve des produits constants tout au long des manipulations, aux temps de rétention de 1,7 ; 5,1 ; 5,6 et 8,1 min. En outre, ces produits sont identiques à ceux récupérés en distillation sous vide.

2.4. Extraction à partir de solvants :

Des essais préliminaires ont été réalisés sur le dichlorométhane, le pentane et le toluène. Tout d'abord, nous avons utilisé le toluène pour essayer d'extraire les composés organiques volatils. L'intérêt de ce produit est qu'il a une masse moléculaire élevée et a donc un temps de rétention important qui ne perturbe pas le début du chromatogramme contenant les « petits » produits volatils. On a appliqué le toluène directement sur de la chair, sur de la chair broyée et sur un extrait déprotéinisé par l'acide trichloroacétique 7,5% (p/v) (avec et sans ajout de soude). Le chromatogramme ci-dessous (figure 28) représente un échantillon de poisson auquel on a appliqué la méthode headspace après extraction par le toluène en présence de soude. La figure 29 quant à elle correspond à la même analyse sans échantillon (témoin blanc).

Figure 28 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de poisson.

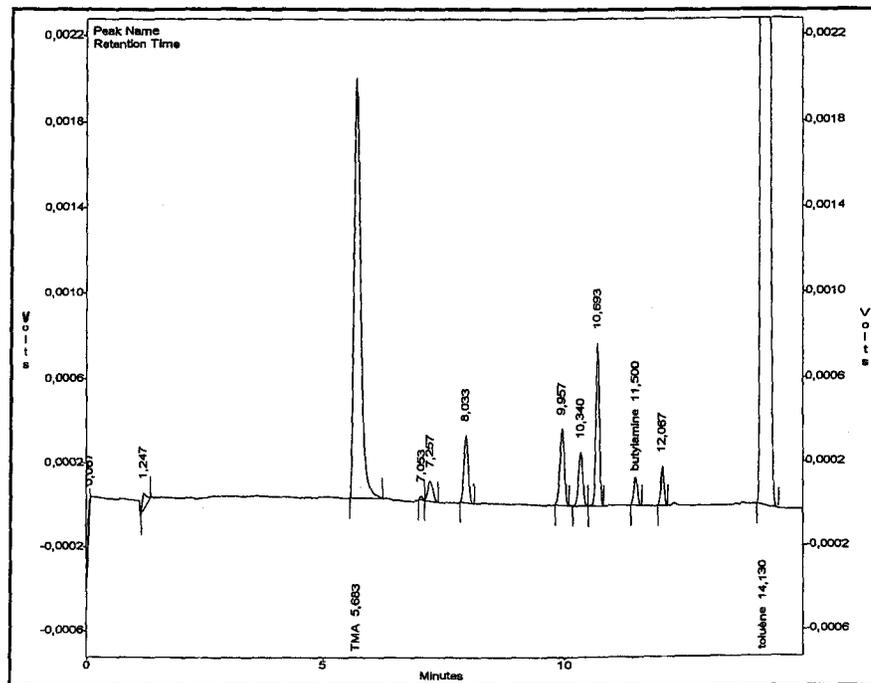
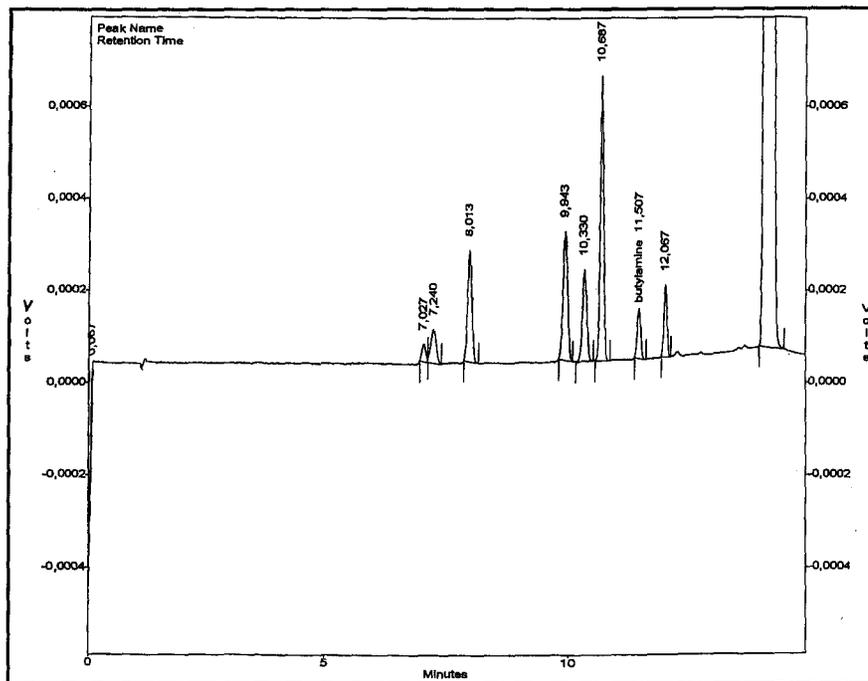


Figure 29 : Séparation par chromatographie gazeuse du témoin toluène.



On rencontre deux types de problème :

- il apparaît très nettement, en comparant les deux chromatogrammes, que la solution de toluène est fortement contaminée malgré un degré de pureté élevé ;

- de plus le pic de toluène est très important ; il se retrouve en proportion très supérieure à ceux recherchés. Le rapport produit sur solvant est trop faible pour permettre une détection.

Comme l'ont proposé Chung en 1993 et Raoul en 1997, nous avons tenté d'utiliser selon la même démarche **le pentane et le dichlorométhane**. Aux mêmes causes les mêmes effets, on observe des contaminations trop élevées pour pouvoir l'utiliser dans la détermination de nouveaux produits. Il ne faut pourtant pas éliminer cette méthode d'extraction par des solvants comme le dichlorométhane car elle est largement utilisée dans la récupération des arômes en général. Nous y consacrerons le chapitre 4 (*Résultats*).

2.5. Application directe du système SPME sur de la chair :

La SPME (Solide Phase Micro Extraction) est un nouveau procédé qui permet de concentrer à basse température des produits volatils sur une fibre. Il s'agit d'un polymère de polydiméthylsiloxane/divinylbenzène. Pour cela il faut mettre la fibre en contact avec la chair dans les flacons de 22 mL qui nous servent pour réaliser l'headspace. Ensuite, il suffit de désorber les composés en injectant la fibre dans le chromatographe en mode splitless (avec un temps de pause de l'ordre de 2 min).

2.5.1. Etude préliminaire sur du lieu noir :

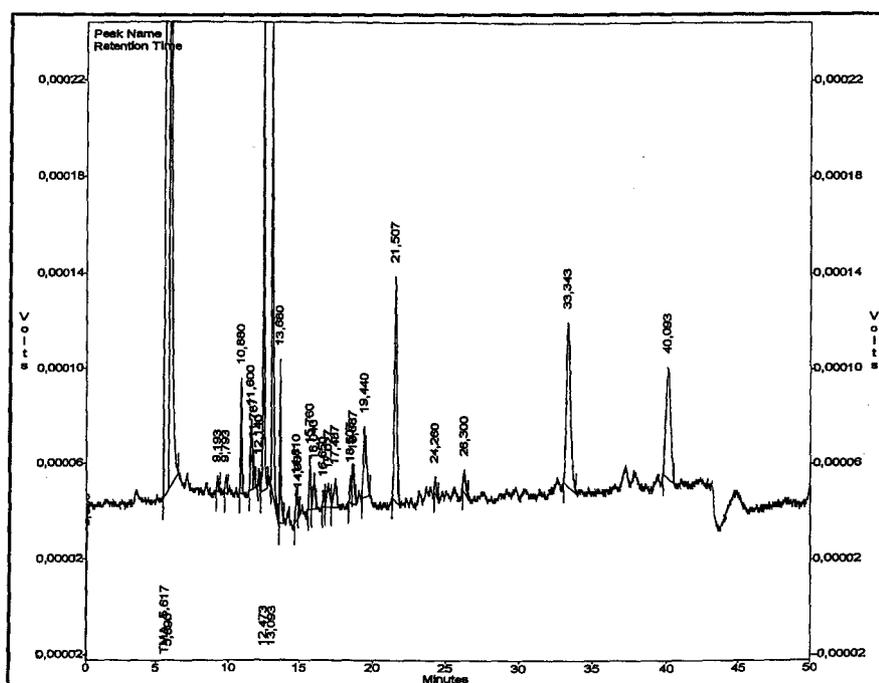
Cette préétude a consisté tout d'abord à se familiariser avec la technique et à déterminer la capacité de concentration de nos produits sur le type de fibre que nous avons sélectionné. Nous avons apporté quelques modifications au protocole (chapitre 5.1, *Matériels et méthodes*):

- ♦ Réglage de l'injecteur à 240 °C pour désorber la fibre,
- ♦ Travail en splitless,
- ♦ Chauffage des échantillons avec la fibre à 60 et 90 °C,

- ♦ Temps de contact de 15, 30 et 60 min.

Les résultats les plus intéressants sur des échantillons de lieu noir ont été obtenus à une température de 60 °C avec un temps de contact de 60 min. On peut retrouver ceci dans la figure 30 ci-dessous.

Figure 30 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de lieu noir par SPME.



2.5.2. Etude sur du cabillaud et du merlan :

Cette étude a été réalisée sur trois niveaux d'altération J+1, J+4, J+7 sur des poissons conservés à 1-5°C sous glace fondante avec différents temps (15, 30, 60 min) et différentes températures (60, 70, 80, 90 °C) de contact de la fibre. Il a fallu en effet déterminer une température permettant de favoriser la volatilisation tout en conservant l'intégrité de fixation de la fibre et de l'échantillon.

2.5.2.1. Le cabillaud :

D'un point de vue qualitatif :

Tableau 41 : Séparation par chromatographie gazeuse d'échantillons de cabillaud par SPME.

Jour	T (°C)	Tps (min)	Résultats														
			(temps de rétention correspondant aux différents pics observés)														
J+1	60	15	-	-	-	-	11,6	-	-	14,2	-	-	-	17,1	-	21,5	-
J+1	60	30	5,7	-	8,3	-	11,8	12,1	-	14,2	-	-	-	17,0	-	21,5	-
J+1	60	60	5,6	-	8,4	11,6	11,8	12,1	12,5	-	-	14,8	15,6	17,0	19,5	21,5	23,1
J+1	70	60	5,7	-	-	11,6	-	-	12,5	14,2	-	14,8	-	17,0	19,5	21,5	-
J+1	80	60	5,6	-	8,4	11,6	-	-	12,4	14,2	-	14,8	15,6	-	-	21,5	-
J+1	90	60	5,7	-	-	11,6	-	-	12,5	14,2	-	14,8	-	17,0	19,5	21,5	-
J+4	60	15	5,6	7,0	8,4	11,6	-	-	12,4	14,1	14,4	14,7	15,6	-	-	21,5	-
J+4	60	30	5,6	-	8,4	11,6	-	-	12,4	14,2	-	14,7	15,7	-	-	21,5	-
J+4	60	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J+4	70	60	5,7	7,1	-	11,6	11,8	12,1	12,5	-	-	14,8	15,7	17,1	-	-	-
J+4	80	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J+4	90	60	5,7	-	-	11,6	-	-	12,5	-	-	-	-	17,0	19,6	21,5	23,1
J+7	60	15	5,8	-	-	11,6	-	-	12,5	14,2	-	14,8	15,7	17,0	19,6	21,6	-
J+7	60	30	5,7	-	-	11,6	-	12,2	12,5	-	-	14,8	15,7	17,0	19,6	21,6	23,2
J+7	60	60	5,7	-	-	11,6	-	12,1	12,5	14,3	-	14,8	15,7	17,1	19,6	21,5	23,2
J+7	70	60	5,7	-	-	11,6	-	12,1	12,5	-	14,4	14,8	15,7	17	19,5	21,5	23,2
J+7	80	60	5,7	-	-	11,6	11,8	-	12,5	-	-	14,8	15,7	17,1	19,6	21,5	23,2
J+7	90	60	5,7	-	-	11,6	-	12,2	12,5	14,1	-	14,8	15,7	17,1	19,6	21,5	-

-- : non déterminé

+ La présence de certains produits n'est pas modifiée par les paramètres temps, température et évolution de l'altération aux temps de rétention de : 5,7 ; 11,6 ; 14,8 ; 15,7 ; 17,1 ; 19,6 et 21,5 min.

+ En fonction des jours d'altération, des pics présents au début semblent disparaître peu à peu aux temps de rétention 8,4 et 14,2 min.

+ Globalement, cette nouvelle technique permet d'identifier les mêmes composés que les études précédentes dans les dix premières minutes puis des nouveaux produits apparaissent avec des temps de rétention plus élevés et qui ont la capacité à se fixer sur la fibre.

D'un point de vue quantitatif :

Figure 31 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de cabillaud J+1 par SPME.

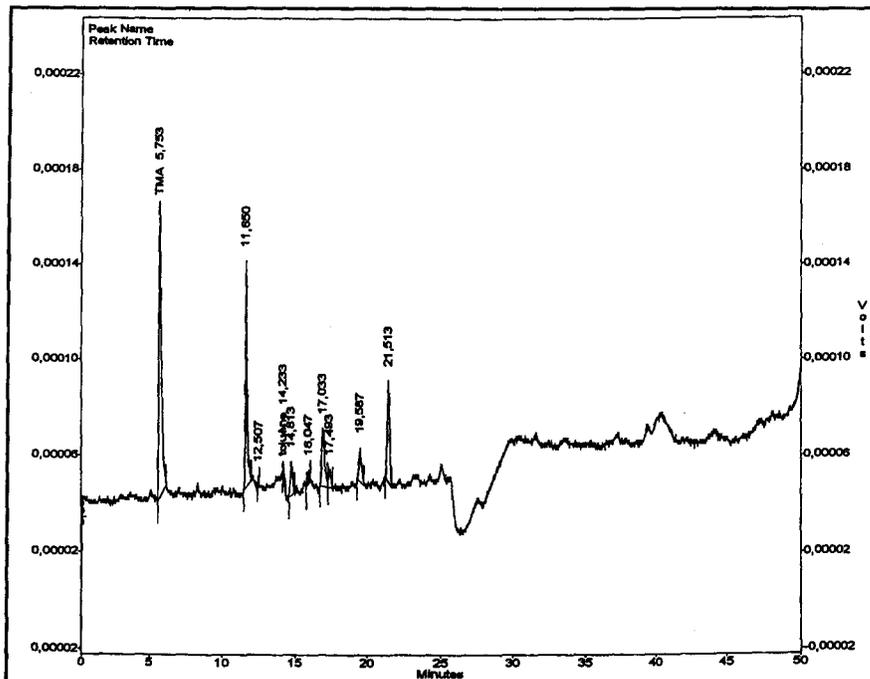
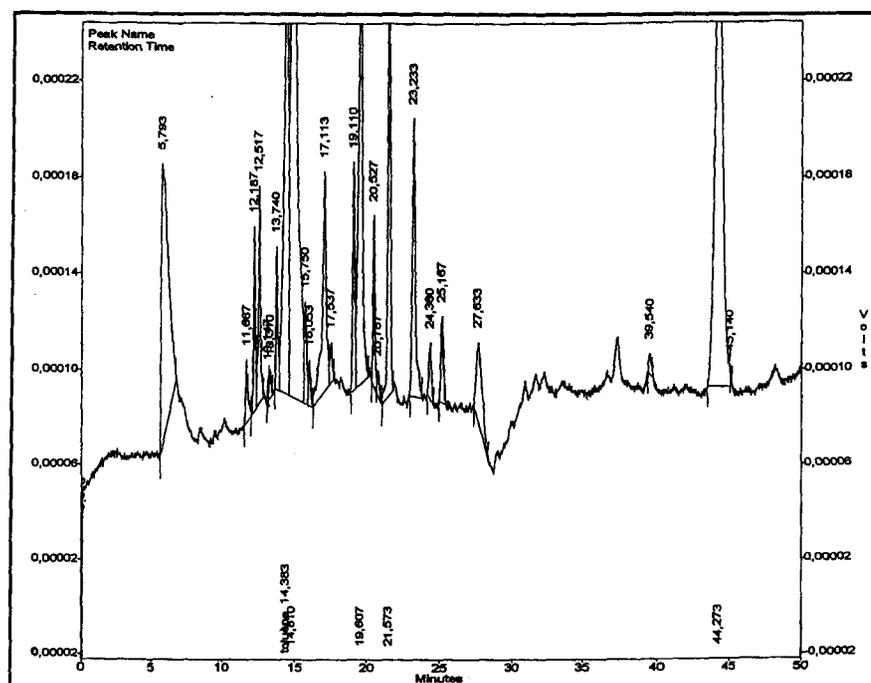


Figure 32 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de cabillaud J+7 par SPME.



En comparant les figures 31 et 32, il apparaît très nettement que pour l'ensemble des pics observés la quantité des produits augmente avec le temps de conservation (J+1 et J+7). L'observation est valable également au stade intermédiaire de J+4, mais de façon plus nuancée. On peut constater à la fois que la production de composés volatils augmente avec l'altération et que la fibre permet une approche quantitative.

2.5.2.2. Le merlan :

De même que précédemment l'analyse des produits volatils est réalisée sur trois niveaux d'altération à J+1, J+4, J+7 sur des poissons conservés à 1-5°C sous glace fondante.

D'un point de vue qualitatif :

Les constatations sont les mêmes pour le merlan (tableau 42) que celles précédemment exprimées sur le cabillaud.

D'un point de vue quantitatif :

Figure 33 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan J+1 par SPME.

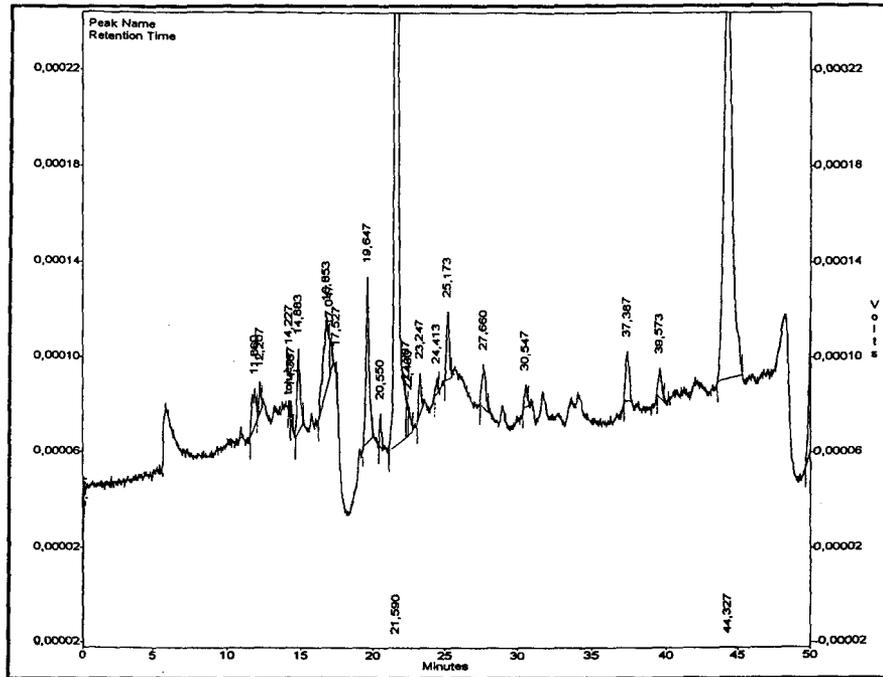
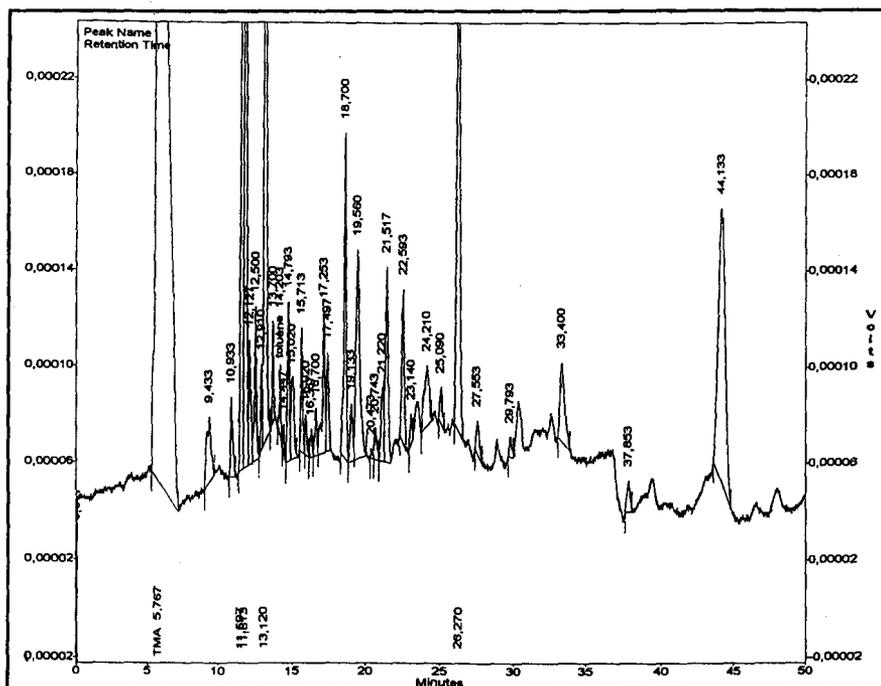


Figure 34 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan J+7 par SPME.



En comparant les figures 33 et 34, on peut noter que pour l'ensemble des pics observés, les quantités augmentent avec le temps. De plus, on peut voir apparaître de nouveaux composés. Il est intéressant (figure 33) de constater l'absence de triméthylamine au début de la conservation et son apparition progressive avec un maximum à J+7 (figure 34). Cette molécule peut nous servir de référence dans le chromatogramme car c'est la seule que nous ayons identifiée jusqu'à maintenant.

2.5.2.3. Comparaison entre merlan et cabillaud :

On peut s'appuyer sur les figures 32 et 34 qui correspondent à des échantillons à J+7 où l'incubation avec la fibre est de 60 min à 60 °C. On peut faire les remarques suivantes :

- les quantités sont du même ordre de grandeur d'une espèce à l'autre ;
- 15 produits ont les mêmes temps de rétention et donc pourraient être communs aux deux espèces ;
- il n'y a pas d'effet de l'espèce sur la nature des produits ;
- il semble intéressant d'aborder l'identification de ces composés.

Tableau 42 : Séparation par chromatographie gazeuse d'échantillons de merlan par SPME.

Jour	T (°C)	Tps (min)	Résultats																					
			(temps de rétention correspondant aux différents pics observés)																					
J+1	50	60		11.7		12.7	13		14.1				18.9	19.5		21.5	23.1	24.4	29.3					
J+1	60	60		11.6	11.8	12.1	12.4	13.1		14	14.8	15.7	17.2	17.5	18.8	19.5	20.2	21.5	23.1			44.2		
J+1	75	60		11.6	11.8	12.1		13.1		14.	14.8	15.7	17.2	17.5	18.8	19.5	20.2	21.5	23.2	25.1	27.6	44.2		
J+1	90	60			11.8	12.2				14.2	14.8			17.5		19.6		21.5	23.2	25.1	27.6	37.3	39.5	44.3
J+4	60	60		11.6	11.8	12.2	12.4	13.1		14.2		15.7	17.2	17.5	18.8	19.5		21.5						
J+4	70	60	5.59	11.6	11.8		12.4	13.1					17.2	17.5	18.8		21.5		24.3	26.2				
J+4	80	60	5.76	11.6		12.2	12.4	13.1	13.7	14.2	14.8	15.7	17.2	17.5	18.8	19.6		21.5	23.5	25.1	27.6	39.5	44.2	
J+4	90	60	5.75	11.6	11.8	12.2	12.5	13.1	13.7	14.2	14.8	15.7	17.2	17.5	18.8	19.6		21.5	23.5	25.1	27.6	39.5	44.3	
J+7	60	60	5.75	10.9	11.6	11.8	12.2	12.5	13.1	13.7	14.2	14.8	15.7	17.2	17.5	18.8	19.6	21.5		25.1	26.2	27.6	44.1	
J+7	75	60	5.77	10.9	11.6		12.2	12.5	13.1	13.7	14.2	14.8	15.7	17.2	17.5	18.8	19.6	21.5		26.2	27.6		44.1	
J+7	90	60	5.77	10.9	11.6		12.2	12.5	13.1	13.7	14.2	14.8	15.7	17.2	17.5	18.8	19.6	21.5		26.2	27.6		44.1	

2.6. Conclusion intermédiaire sur la comparaison des méthodes d'extraction :

Dans cette première partie, nous avons traité principalement les différents moyens d'extraction de composés volatils apportés/retrouvés dans la littérature. Il nous paraissait important de faire cette étude pour déterminer le meilleur procédé à employer pour la suite des travaux.

- ◆ Concernant la méthode chromatographique de séparation, seules de légères modifications ont été effectuées mais pas de réelle optimisation de séparation.

- ◆ Pour la méthodologie d'extraction, celle qui semble la plus prometteuse est la SPME car elle permet la récupération d'un grand nombre de composés en limitant les étapes de préparation. La méthode d'extraction par les solvants sera mieux adaptée à condition de remédier au problème de pureté de solvants. Les autres méthodes occasionnent beaucoup de pertes et cet inconvénient est difficile à surmonter. Elles ne seront donc pas retenues.

L'orientation première de ce sujet était d'étudier les amines volatiles, de manière plus fine et précise que l'analyse globale de l'ABVT. Au vu de tous les essais précédents, il convient d'élargir le sujet aux arômes dégagés au cours de l'altération, c'est-à-dire à l'ensemble des composés volatils. Pour cela, l'étude des arômes sera engagée dans deux directions : la première par l'analyse directe en SPME, la seconde par l'utilisation d'une méthode d'extraction par le dichlorométhane purifié. Ceci permettra de comparer deux systèmes de récupération et de concentration des composés aromatiques. Il conviendra d'utiliser un autre support chromatographique moins sélectif.

- ◆ *Echantillonnage* : pour pouvoir comparer et mettre en place ces deux méthodes, il faut des échantillons homogènes. Dans ce but, nous avons congelé une quantité importante de

merlans au même stade d'altération afin de travailler à partir d'échantillons constants tout au long de nos essais.

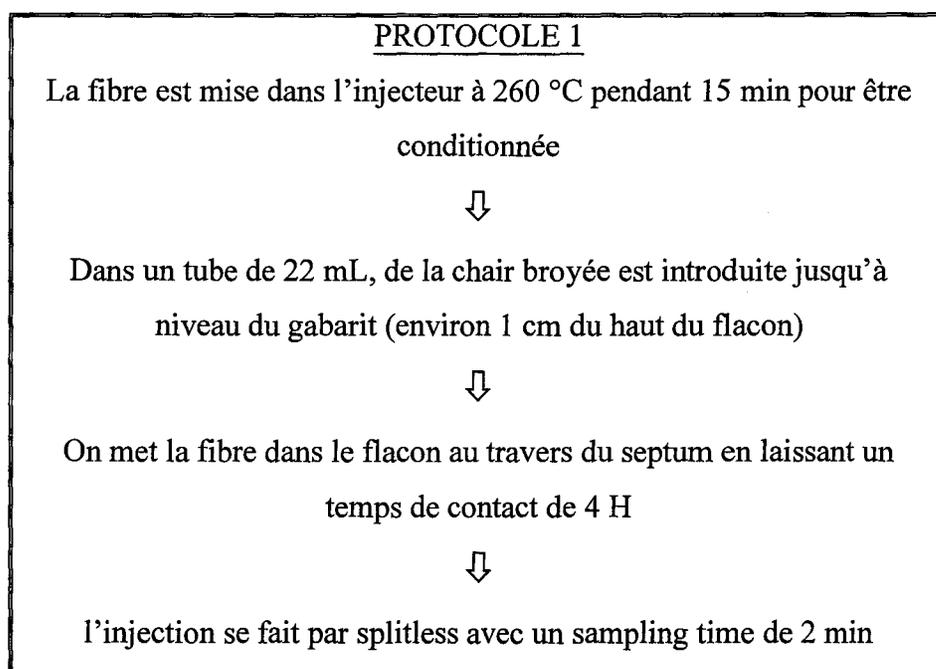
♦ *Température* : Les extractions par le solvant se font à température ambiante, par conséquent on utilisera la SPME dans les mêmes conditions. De plus, tout chauffage, dans un premier temps, peut générer et révéler des composés qui ne sont pas naturels. On compensera la température basse par une durée de contact en SPME plus longue.

Nous allons développer ci-dessous la méthode de récupération en SPME, puis la méthode d'extraction par le dichlorométhane.

3. RECUPERATION EN SPME :

On a mis en évidence dans les chapitres précédents l'intérêt d'utiliser cette méthode pour collecter des composés volatils à partir d'échantillons de poissons. Le but de ce chapitre est de présenter le travail d'identification des composés volatils sur l'échantillon constant de merlan.

3.1. Protocole de récupération :



Ce protocole a été élaboré après des essais (non présentés ici) de temps de contact à température ambiante de 1, 2, 4, 8, et 16 heures et après des essais sur la quantité nécessaire d'échantillon à prélever. On a retenu les meilleurs compromis dans l'encadré page précédente.

3.2. Chromatogramme référence :

D'un point de vue qualitatif, on peut définir un chromatogramme type retrouvé constamment dans les différentes analyses. Pour faciliter l'identification, on a pu modifier dans certains cas le protocole 1 pour pouvoir isoler et augmenter la présence de certains produits ; de la même manière, les conditions chromatographiques ont été adaptées pour pouvoir isoler des zones où l'analyse était difficile. On fractionne le chromatogramme en trois parties :

- 0 - 10 min (I)
- 10 - 25 min (II)
- 25 - 50 min (III)

Figure 35 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan par SPME

Partie I.

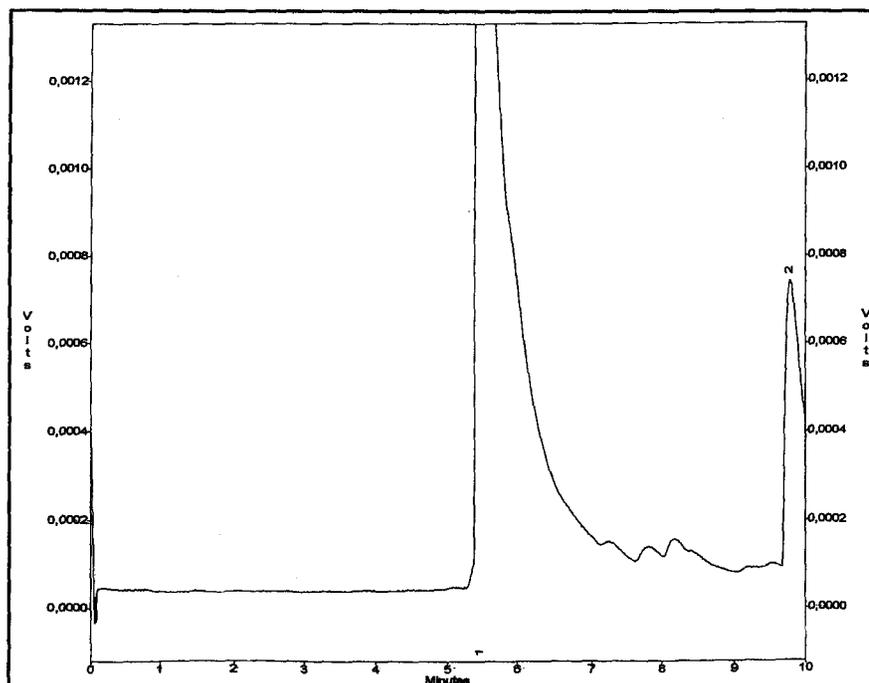


Figure 36 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan par SPME

Partie II.

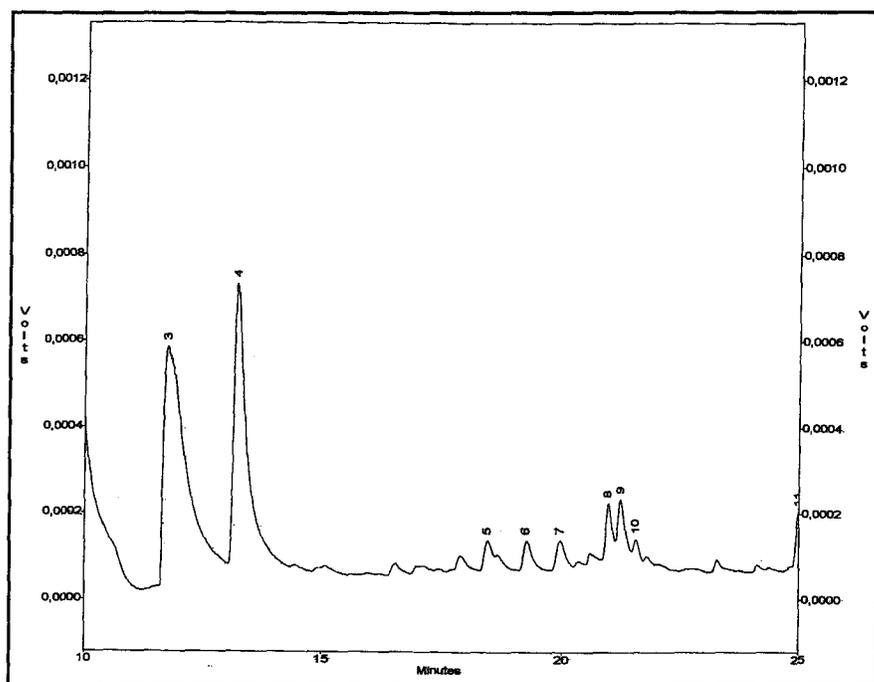
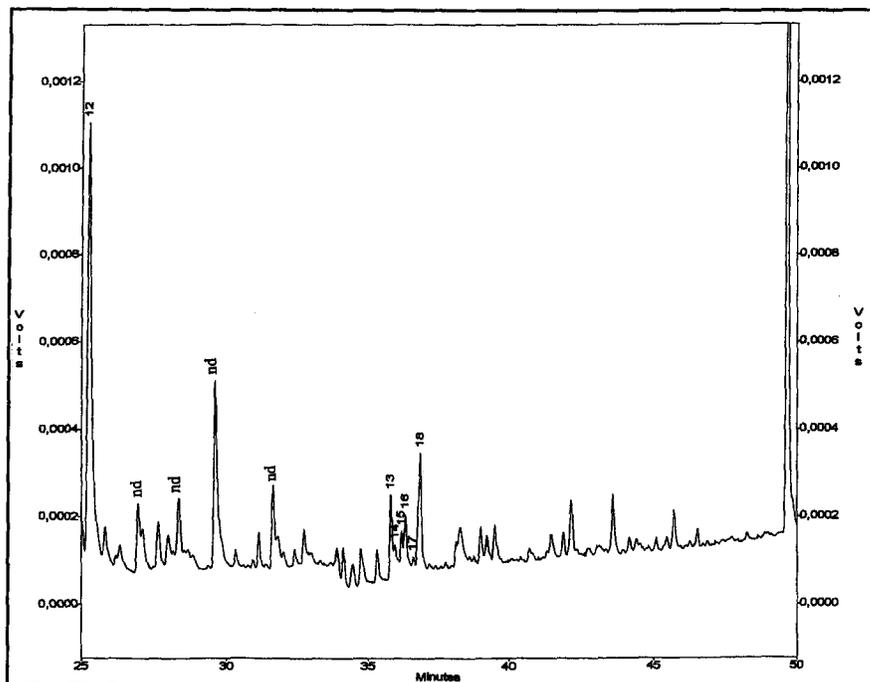


Figure 37 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan par SPME

Partie III.



nd : non déterminé en spectrométrie de masse

On peut faire plusieurs remarques quant à la séparation par chromatographie gazeuse en découpant le chromatogramme en trois parties en fonction de la présence des composés :

- entre 0 et 15 min : il y a quatre produits majoritaires présents en très grande quantité par rapport à l'ensemble du chromatogramme.
- entre 15 et 25 min : dans cette zone les produits sont moins importants en nombre et en quantité.
- au delà de 25 min, il y a une augmentation du nombre des composés avec des intensités variables.

3.3. Identifications par spectrométrie de masse :

L'association des pics analysés en spectrométrie de masse aux pics de chromatographie gazeuse a été déterminée par le calcul de temps relatifs. Nous avons utilisé trois composés de référence pour ces calculs :

- deux naturellement présents dans les échantillons et dont nous avons les témoins : la triméthylamine et le toluène,
- et un ajouté : l'éthylcaprylate présenté dans le chapitre 4.7 (*Résultats*).

L'identification a été réalisée par comparaison à une banque de données intégrée dans le logiciel d'exploitation du spectromètre de masse (LUCY version 1.). La reconnaissance apparaît très significative pour des coefficients de similitude supérieurs à 800 (les différentes comparaisons sont proposées en annexe).

La comparaison des spectres de masse avec la banque de données permet l'identification des produits comme suit :

Tableau 43 : Identification par spectrométrie de masse des composés extraits par SPME (figure 35, 36 et 37).

Pic N°	Noms	CS	Références	Annexes
1	triméthylamine	804	Tous les auteurs	1
2	3-OH-butanone	800	Olafsdottir, 1997	5
3	3-méthylbutanol	777	Josephson, 1983	6
4	toluène	849	Hiatt, 1983	7
5	4-heptanol	692	Chung, 1993	8
6	p-xylène	739	Hiatt, 1983	9
7	1,3-diméthylbenzène	730	Murray, 1988	10
8	acide 4-chloro-butanoïque	913		11
9	2-octanone	846	Josephson, 1983	12
10	non déterminé			13
11	nonane	651	Hiatt, 1983	14
12	2,2-diméthylheptanone	690		15
13	acide pentanoïque méthyl ester	765	Chinivasagam 1998	16
14	triméthylpyrazine	844	Chung, 1993	17
15	2-éthyl-3,5-diméthylpyrazine	821	Chung, 1993	18
16	tetraméthylpyrazine	814	Chung, 1993	19
17	2-undecanone	898	Chung, 1993	20
18	triméthyl-6-éthylpyrazine	827	Chung, 1993	21

CS : Coefficient de Similitude

Triméthylamine : nous n'allons pas nous attarder sur ce produit qui fait l'unanimité des auteurs et que nous avons déjà identifié dans le chapitre 1.2 (*Résultats*).

3-OH-butanone : participe à l'odeur produite par la dégradation microbienne au cours de l'altération. Son origine semble être les acides aminés comme la valine, la leucine et l'isoleucine via le 2-acétolactate (voie du catabolisme) (Olafsdottir, 1997).

3-méthylbutanol : il a été décrit comme l'alcool majoritaire après l'éthanol et le butanol (Josephson, 1983 et Olafsdottir, 1997). Il provient de la méthylation du butanol par les bactéries.

4-heptanol : on peut proposer deux hypothèses quant à sa présence. Josephson (1991) et Kawai (1996) (Chapitre 3.5.1.1, *Généralités*) présentent une voie de dégradation aboutissant au 4-heptenal pouvant être le précurseur du 4-heptanol. On peut aussi supposer comme autre précurseur le 4-heptanal responsable de l'odeur d'oxydation (chapitre 3.5.1.3, *Généralités*). On peut noter que Chung (1993) a mis en évidence la présence d'alcool à sept atomes de carbone mais ces travaux sont appliqués à de la chair de crabe.

2-octanone : Josephson (1983) a décrit la présence du 2-octanone et du 3-octanone dans des poissons du lac Michigan. Le 2-octanone est un produit du 3,5-octadien-one provenant de l'autooxydation sur l'acide eicosapentanoïque (chapitre 3.5.1.3, *Généralités*)(Josephson, 1991 et Kawai, 1996).

Nonane : Hiatt (1983) a extrait ce composé sur un distillat de poisson, il pourrait faire partie des polluants (composés organiques volatils). Il faut noter que son identification reste à confirmer car son coefficient de similitude est seulement de 651.

2-undecanone : comme le 4-heptanol, le 2-undecanone a été mis en évidence dans la chair de crabe. Il apporte caractéristiquement une odeur de « beurre » à l'échantillon (Chung, 1993).

Acide méthylesterpentanoïque : aucune référence n'existe sur ce produit dans le poisson. Par contre, des esters proches comme l'acide éthylesterpropanoïque et l'acide méthylesteracétique sont libérés lors de la culture sur des crevettes de *Shewanella putrefaciens* (bactérie responsable de l'altération chez les poissons) (Chinivasagam, 1998).

Acide 4-chlorobutanoïque, 2,2-diméthylheptanone : ce sont des produits qui n'ont jamais été retrouvés dans le poisson. Il est d'autant plus difficile d'en déterminer l'origine.

Pic 10 : seul le profil est présenté en annexe car l'identification a été infructueuse.

Toluène, p-xylène, 1,3-diméthylbenzène, triméthylpyrazine, 2-éthyl-3,5-diméthylpyrazine, tetraméthylpyrazine, triméthyl-6-éthylpyrazine : ces composés sont des contaminants qui n'interviennent pas dans l'arôme propre au poisson. Ils dépendent souvent de facteurs environnementaux (chapitre 3.5.1.5, *Généralités*).

3.4. Conclusion intermédiaire sur la SPME :

Dans cette étude, l'analyse SPME s'est déroulée sur des échantillons à température ambiante pour s'affranchir des artefacts liés au chauffage. Ces résultats montrent qu'il est tout à fait possible d'extraire des composés volatils en quantités suffisantes (seuil de détection) en un temps de contact de quatre heures.

Cette technique a aussi l'avantage de mettre en évidence des composés qui jusque là ont été extraits par des méthodes plus compliquées (en faisant référence aux auteurs cités dans le chapitre 3.3 précédent) nécessitant un matériel spécifique et une durée d'analyse longue. La SPME demande 15 min de conditionnement de la fibre, 50 min d'analyse en chromatographie gazeuse pour effectuer un blanc (éliminer les effets mémoire de la fibre), 4 heures d'extraction sur l'échantillon et 50 min de séparation en chromatographie gazeuse. La durée totale de l'analyse est de moins de 6 heures. On peut estimer que la durée de vie d'une fibre sur notre matrice est d'environ cinquante analyses.

Par rapport à la totalité des pics observés en chromatographie gazeuse, on ne réussit pas à tous les identifier car on est en dessous du seuil de détection du spectromètre de masse qui est moins sensible que l'ionisation de flamme. On peut d'ores et déjà souligner l'intérêt

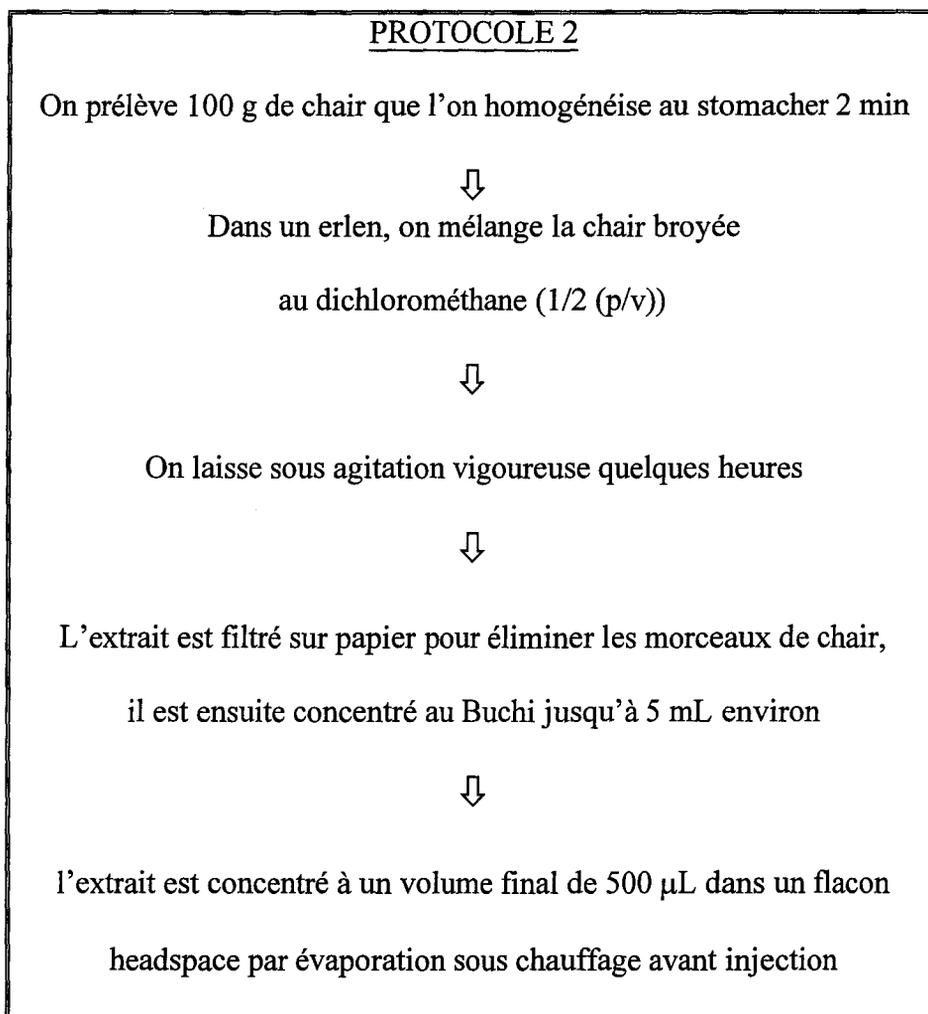
d'optimiser cette méthode afin d'obtenir une identification complète et de déterminer les seuils de détection pour chaque produit.

L'originalité de ce travail est de pouvoir posséder et maîtriser une technique de récupération des composés volatils facilement utilisables en routine et d'avoir pu identifier la majorités de ces composés.

4. EXTRACTION PAR LE DICHLOROMETHANE :

4.1. Protocole d'extraction :

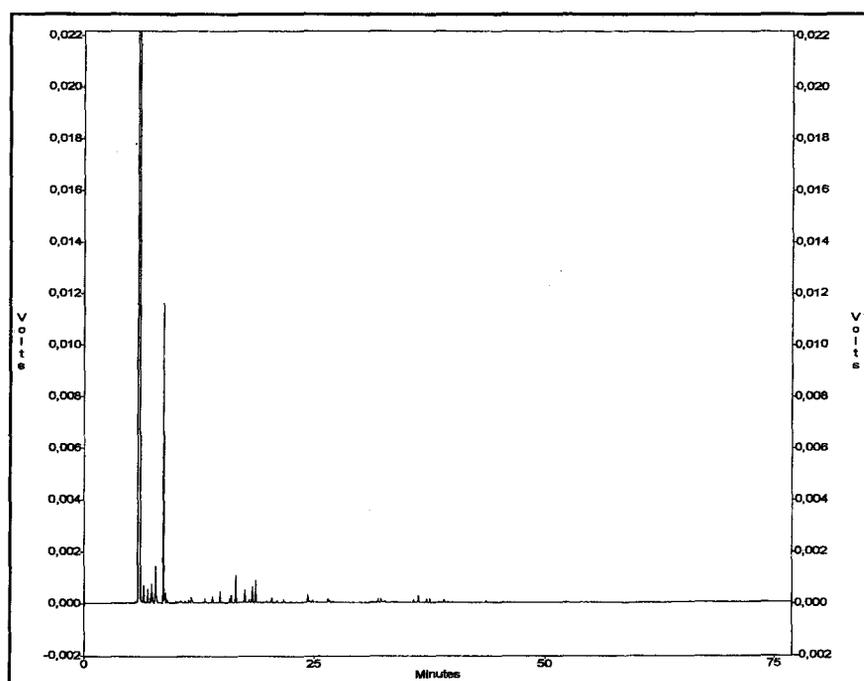
On se fixe le protocole 2 d'extraction afin de débiter les essais.



4.2. Mise au point du solvant :

On a pu remarquer dans le chapitre 2.0 que le problème majeur de l'utilisation de solvant est son degré de pureté. On comprend mieux l'intérêt de purifier au préalable le solvant lorsque l'on effectue une analyse sans échantillon, c'est à dire un témoin blanc dichlorométhane (figure 38).

Figure 38 : Analyse par chromatographie gazeuse du dichlorométhane utilisant le protocole 2.

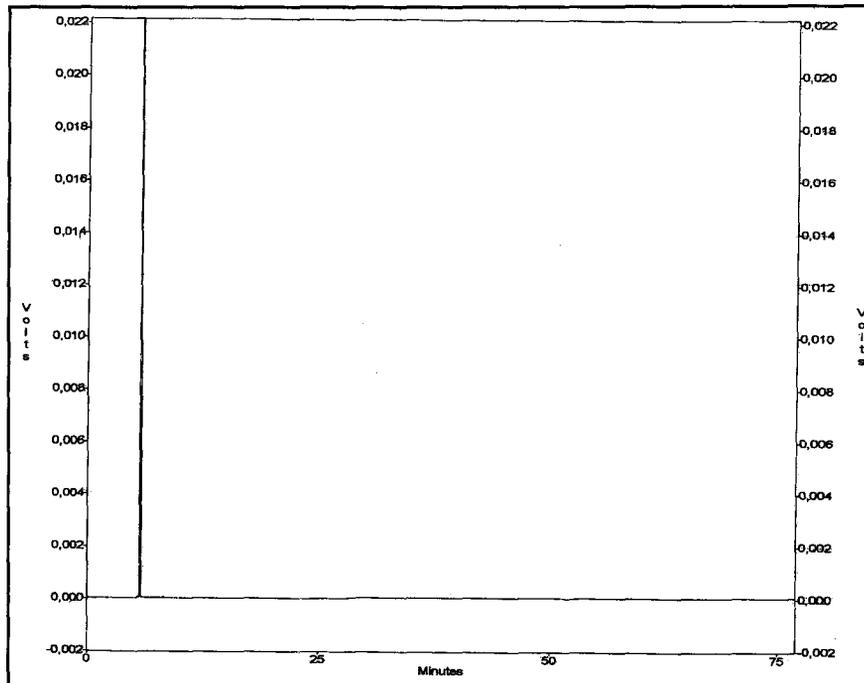


On constate la présence d'une quantité très importante de pics parasites qui peuvent gêner l'interprétation après extraction sur du poisson. Il y a encore plus de contaminants que lors de la précédente étude (chapitre 2.4, *Résultats*) car on concentre 400 fois l'extrait en utilisant le protocole 2.

La solution la plus simple et qui donne les meilleurs résultats est de distiller plusieurs fois le dichlorométhane. Pour cela on préconise une distillation au bain-marie qui permet une régulation plus constante de la température de 41-42 °C malgré un fort ralentissement du débit

de distillation, 50 mL par heure (on élimine la tête et la queue de distillation). On peut observer alors le résultat dans la figure ci-dessous.

Figure 39 : Analyse par chromatographie gazeuse du dichlorométhane distillé utilisant le protocole 2.



Le résultat est intéressant car la quasi-totalité des contaminants a disparu. On peut donc envisager la suite des essais en utilisant du dichlorométhane distillé.

4.3. Matériel :

Pour être sûr de ne récupérer que des produits issus des échantillons de poisson, il faut éliminer au maximum les contaminants apportés au cours du protocole en prenant quelques précautions. Pour cela, on travaille exclusivement avec du matériel en verre car le dichlorométhane est un solvant puissant.

- ♦ Erlen en verre avec bouchon en verre
- ♦ Barreau aimanté en verre
- ♦ Filtre papier rincé au dichlorométhane

- ♦ Pas d'utilisation de graisse de rodage
- ♦ Seringue d'injection avec piston en fer
- ♦ Seuls les septa des tubes headspace sont en PTFE (Polytetrafluoroéthylène)

4.4. Echantillonnage :

Pour pouvoir effectuer des analyses comparatives sur la méthodologie et sur la composition, il faut toujours partir du même échantillon. Pour cela nous avons travaillé sur un même lot de filets de merlan que l'on a découpés en dés afin d'avoir un échantillonnage le plus homogène. On a conditionné ce lot en portions de 100 g conservées à -20°C .

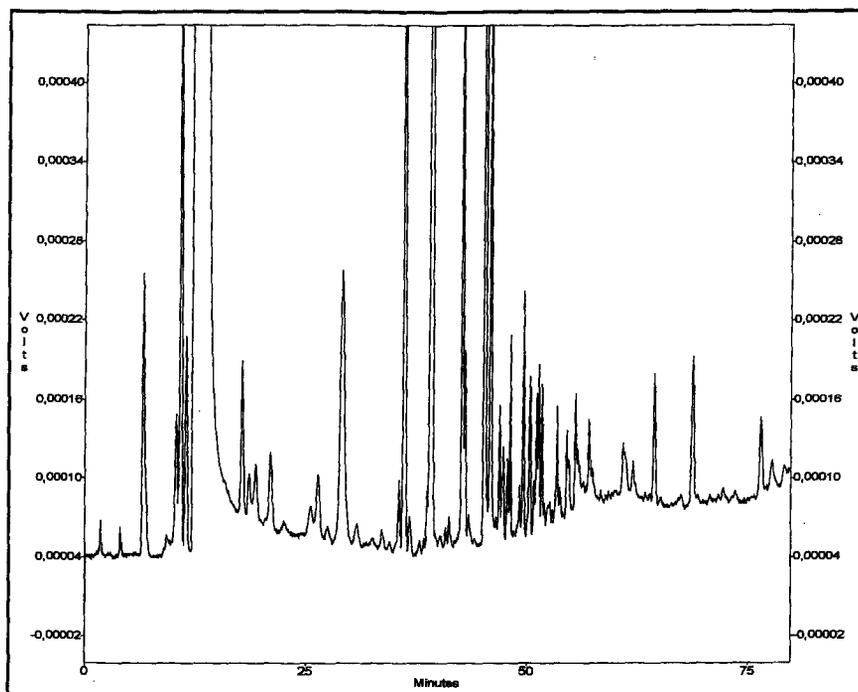
4.5. Applications du protocole 2 :

On va mettre en application le protocole 2 sur deux supports chromatographiques LMW amine et SPB-1, ceci dans le but de déterminer la meilleure séparation avant l'identification en spectrométrie de masse.

4.5.1. Séparation sur la colonne LMW amine :

On a appliqué le protocole 2 sur différents échantillons pour pouvoir déterminer l'intérêt du protocole et celui du support chromatographique. L'utilisation de ce type de colonne permet, par sa réactivité envers les amines, une bonne efficacité, ce qui limite les traînées à la descente des pics.

Figure 40 : Analyse par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan utilisant le protocole 2 avec la colonne LMW amine.

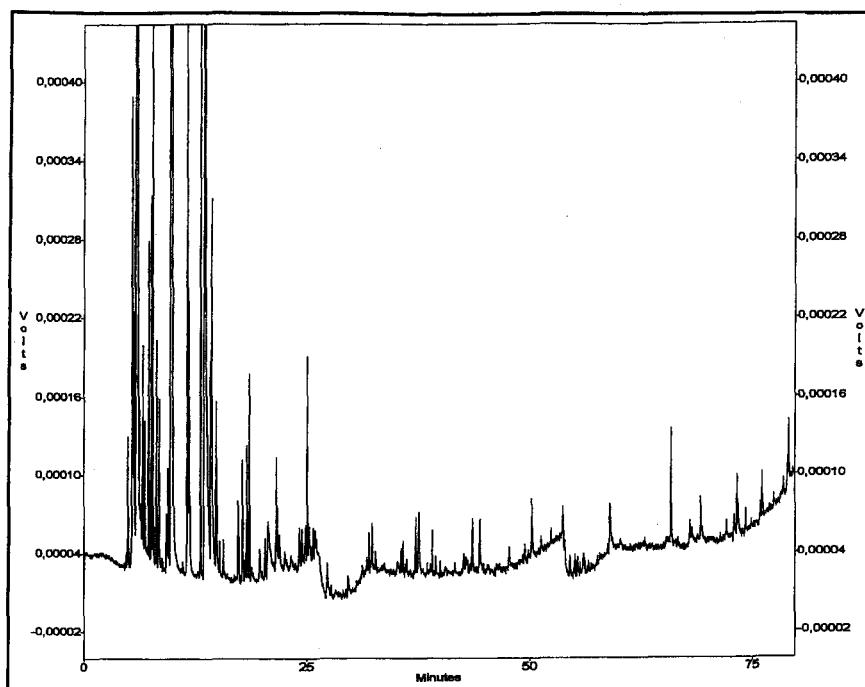


On réussit à visualiser de nombreux composés et surtout, par cette technique d'extraction, on peut diminuer les seuils de détection grâce à l'étape de concentration. Ce qui est plus problématique avec cette colonne adaptée aux composés aminés, c'est qu'elle a une phase stationnaire très épaisse, ce qui n'est pas conseillé pour les autres types de produits.

4.5.2. Séparation sur la colonne SPB-1 :

Il s'agit d'une colonne qui a des applications plus générales (alcool, cétone, aldéhyde...) et qui permet des séparations de composés de poids moléculaire faible avec une bonne résolution. De la même manière que précédemment, on va faire des essais du protocole 2 sur plusieurs échantillons (figure 41).

Figure 41 : Analyse par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan utilisant le protocole 2 avec la colonne SPB-1.



4.5.3. Conclusion intermédiaire :

Globalement, la résolution des deux colonnes est identique (la colonne SPB-1 a une meilleure efficacité). Travailler sur l'une ou l'autre n'entraîne aucune contrainte technique particulière. La seule remarque importante est que le temps d'analyse est réduit de plus de moitié avec la colonne SPB-1 par rapport à la colonne LMW amine. De plus si on considère les résultats de l'identification en spectrométrie de masse réalisée en SPME (chapitre 3.3, *Résultats*), l'utilisation d'une colonne plus générale comme la SPB-1 semble être recommandée pour les applications qui vont suivre.

4.6. Identifications par spectrométrie de masse :

4.6.1. Chromatogramme référence :

Les figures ci-dessous représentent un chromatogramme fractionné en trois parties (I (0 - 10 min), II (10 - 25 min), III (25 - 50 min)) caractéristique de l'analyse (chapitre 5.1, *Matériels et méthodes*) après extraction par le dichlorométhane.

Figure 42 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan après extraction au dichlorométhane.

Partie I.

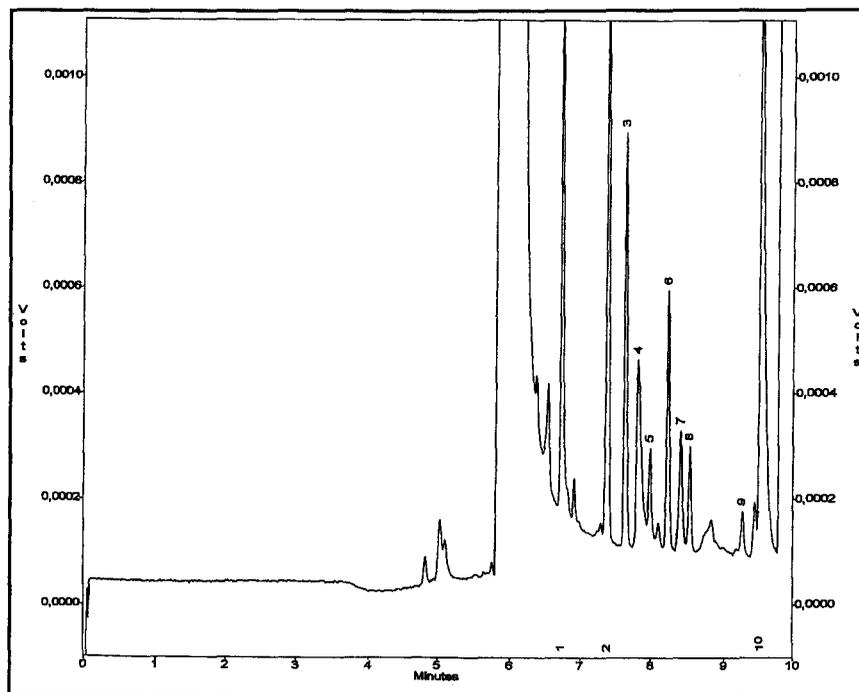


Figure 43 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan après extraction au dichlorométhane.

Partie II.

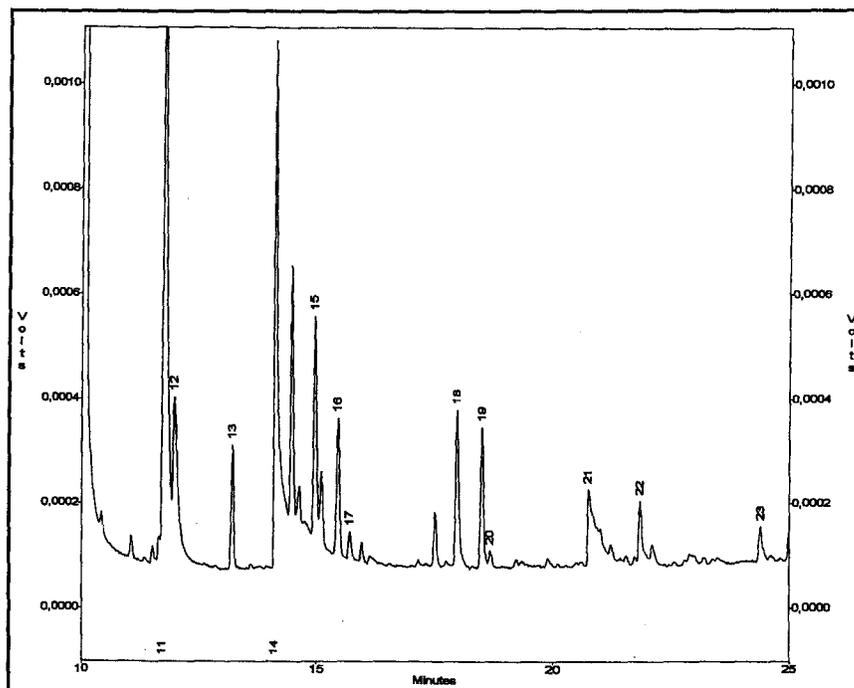
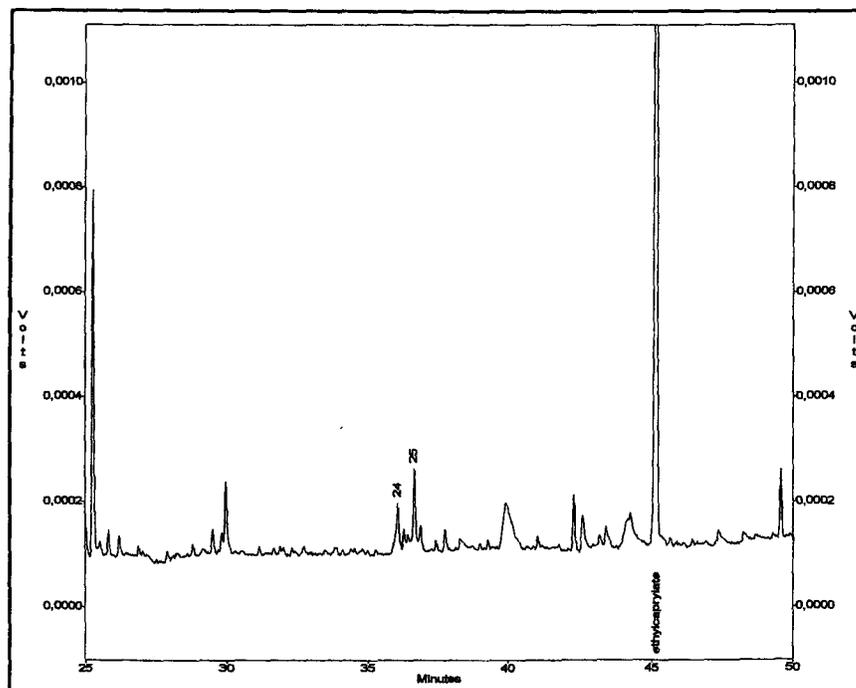


Figure 44 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan après extraction au dichlorométhane.

Partie III.



4.6.2. Analyses en spectrométrie de masse :

L'association des pics analysés en spectrométrie de masse aux pics de chromatographie gazeuse a été déterminée par le calcul de temps relatifs. Nous avons utilisé trois composés de référence pour ces calculs :

- un naturellement présent dans l'échantillon et dont nous avons le témoin :
le toluène,
- et deux ajoutés : l'éthylcaprylate (chapitre 4.7, *Résultats*) et le dichlorométhane.

L'identification a été réalisée par comparaison à une banque de données intégrée dans le logiciel d'exploitation du spectromètre de masse (LUCY version 1.). La reconnaissance apparaît très significative pour des coefficients de similitude supérieurs à 800 (les différentes comparaisons sont proposées en annexe).

On peut regrouper dans le tableau ci-dessous la correspondance des pics et leur identification par rapport à la banque de données.

Tableau 44 : Identification des composés extraits au dichlorométhane en spectrométrie de masse (figure 42, 43, 44).

Pic N°	Noms	CS	Références	Annexes
1	1,2-éthanediol	795		22
2	hexane	822		23
3	chloroforme	935	Chung, 1993	3
4	triméthylloxirane	878		24
5	1-chloro-2-méthylpropane	727		25
6	3-méthylbutanal	892	Olafsdottir, 1997	26
7	2-pentanone	820		27
8	2-méthylbutanal	842	Olafsdottir, 1997	28
9	2-méthylhexane	901		29
10	heptane	818		30
11	3-méthylbutanol	826	Josephson, 1983	6
12	2-méthylbutanol	831	Josephson, 1983	31
13	toluène	888	Hiatt, 1983	7
14	1,2-butanediol	796		32
15	3-OH-3-méthyl-2-butanone	810		33
16	2-hexanol	859	Josephson, 1983	34
17	1-OH-3-méthyl-2-butanone	785		35
18	4-méthyl-2-heptanol	748		36
19	4-heptanol	764	Chung, 1993	8
20	2,4-diméthylheptène	762		37
21	diméthylsulfone	903		38
22	3,3-diméthylbutanol	673		39
23	acide butanoïque méthyl ester	850	Chinivasagam, 1993	40
24	triméthylpyrazine	778	Chung, 1993	17
25	tétraméthylpyrazine	892	Chung, 1993	19

Chloroforme, toluène, triméthylpyrazine et tétraméthylpyrazine : ils ont déjà été identifiés mais comme des produits contaminants qui peuvent être liés à l'environnement (chapitre 3.5.1.5, *Généralités*) (Chung, 1993 et Hiatt, 1983).

2-méthylbutanal et 3-méthylbutanal : Olafsdottir (1997) présente ces produits comme le résultat de la dégradation bactérienne (*Streptococcus lactis*) associée essentiellement à la valine, la leucine et l'isoleucine.

3-méthylbutanol et 2-méthylbutanol : Josephson (1983) a isolé ces produits sur des poissons du lac Michigan. Ils pourraient être en rapport direct avec ceux précédemment cités ou provenant de la méthylation du butanol par les bactéries.

2-hexanol : Proche, le 1-hexanol a été identifié par Josephson (1983) mais sans préciser son origine. Le 2-hexanol quant à lui provient certainement de l'action d'une lipooxygénase sur un acide gras insaturé, comme la plupart des alcools produits (chapitre 3.5.1.3, *Généralités*).

4-heptanol : on peut proposer les deux mêmes hypothèses que dans le chapitre 3.3 (*Résultats*) avec une origine possible par 4-heptenal (Josephson, 1991 et Kawai, 1996) (Chapitre 3.5.1.1, *Généralités*) mais aussi le 4-heptenal responsable de l'odeur d'oxydation (chapitre 3.5.1.3, *Généralités*).

Acide butanoïque méthyl ester : On peut faire la même remarque que dans le chapitre 3.3 (*Résultats*) avec l'acide pentanoïque méthyl ester où l'origine est certainement bactérienne par action de *Shewanella putrefaciens* (Chinivasagam, 1998).

Nous allons proposer une origine sur les composés qui vont suivre car ils n'existent pas dans nos références bibliographiques.

1-OH-3-méthyl-2-butanone et 3-OH-3-méthyl-2-butanone : on a pu mettre en évidence jusqu'à présent de nombreux composés avec une structure de base à quatre atomes de carbone. Ces deux produits peuvent provenir de l'action des enzymes bactériennes sur des produits comme le butanal ou le butanol.

1,2-butanediol et 1,2-éthanediol : la présence d'alcool ou de dialcool n'est pas surprenante. Ce qui est le plus étonnant par rapport à ce qui a été décrit dans la littérature est la présence des fonctions alcools en position 1 et 2. Malgré tout, le 2,3-butanediol est un catabolite normal venant de la réduction de l'acetoïn intervenant dans les voies métaboliques d'interconversion de la valine.

Hexane et heptane : ce sont des structures simples qui se trouvent naturellement présentes.

2-pentanone, 4-méthyl-2-heptanol et 3,3-diméthylbutanol : ce sont tous les trois des produits volatils pouvant par leur fonction alcool et cétone libérer une odeur. En ce qui concerne le 2-pentanone, d'autres cétones à un nombre de carbone plus important ont déjà été mise en évidence (exemple 2 et 3-heptanone, 2 et 3-octanone)(Josephson, 1983), il n'est pas étonnant de retrouver ce composé. L'heptanol et le butanol étant présents à l'état naturel, les capacités de méthylation des bactéries d'altération peuvent produire à partir de ces composés le 3,3-diméthylbutanol et le 4-méthyl-2-heptanol.

Triméthyloxirane, 1-chloro-2-méthylpropane, 2-méthylhexane, 2,4-diméthylheptène et diméthylsulfone : Il semble hasardeux de présenter une origine possible pour ces composés. Ils ne sont pas à négliger car ils peuvent provenir de voies de dégradation inconnues et être révélateurs de l'altération.

4.7. Recherche d'un étalon interne :

L'étalon interne va être utile dans un premier temps pour optimiser la méthode d'extraction à l'aide de coefficients de réponse déterminés sur chaque produit. Il va servir aussi ultérieurement à calculer les quantités prenant en compte le rendement global. Il faut qu'il ne soit pas présent dans les produits dosés, mais qu'il ait des caractéristiques proches afin qu'il soit récupéré de la même manière au cours de l'extraction par le dichlorométhane.

Plusieurs étalons internes sont référencés dans la bibliographie :

+ 2,4,6 triméthylpyridine (Chung, 1993 et Baek, 1996),

+ 4-heptanone (Erickson, 1994),

+ pentachloroanisole (Boyle, 1992),

+ amyl alcool (Josephson, 1983),

+ Hiatt (1983) quant à lui utilise un mélange de 2-bromo-1-chloropropane, d'1,4-dichlorobutane, de benzène et de toluène.

4.7.1. Essais préliminaires :

Il faut dans un premier temps trouver un produit qui puisse avoir un temps de rétention différent de ceux rencontrés dans un chromatogramme type. Pour cela nous avons fait les essais suivants :

Tableau 45 : Temps de rétention de différents produits sur SPB-1.

Produits	Temps de rétention (min)
Méthanol	5,05
Ethanol	5,3
Isopropanol	5,9
Propylamine	6,1
Hexane	7,2
Butylamine	8,01
Butanol	8,62
Heptane	9,7
Pentylamine	12,7
Toluène	12,9
Ethylbutyrate	14,9
Ethylcaprylate	44,9

En ce qui concerne le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol, l'hexane, la butylamine, l'heptane, la pentylamine et l'éthylbutyrate, leur temps de rétention correspond au temps de rétention des produits. Par contre pour le butanol et le toluène, ils ne se trouvent pas coélus avec des composés de l'échantillon sur le profil chromatographique. Mais on ne peut pas employer ces deux produits pour les raisons suivantes :

- Olafsdottir (1997) cite le butanol comme pouvant être retrouvé dans des échantillons (même si nos essais ne le montrent pas),
 - et le toluène quant à lui a déjà été retrouvé comme contaminant (Hiatt, 1983)
- donc on ne peut les employer.

Le meilleur compromis est l'éthylcaprylate qui a un temps de rétention qui ne perturbe pas le profil chromatographique des composés dosés en se trouvant en fin de séparation et qui ne rallonge pas le temps d'analyse (50min).

Ethylcaprylate (EC) : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ (Sigma Aldrich)

4.7.2. Détermination de la quantité d'Ethylcaprylate :

Il faut pouvoir utiliser l'étalon interne dans des quantités intermédiaires entre le rapport étalon interne et solvant tout en se rapprochant des quantités des produits dosés. On peut présenter les différents essais dans le tableau ci-dessous.

Tableau 45 : Détermination de la quantité d'éthylcaprylate.

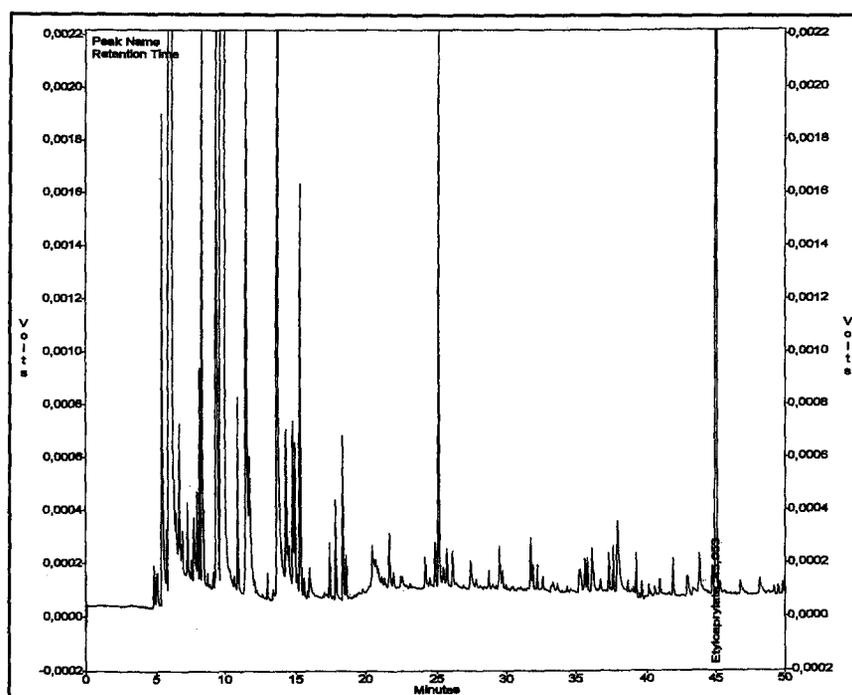
Echantillon	Dilution Ethylcaprylate	Rapport (Dichloromét./Ethylcaprylate)
100 µL EC qsp 500 µL	1/100	Non significatif
100 µL EC qsp 500 µL	1/1000	32,30
100 µL EC qsp 500 µL	1/5000	157,27
100 µL EC qsp 500 µL	1/10000	285,65
100 µL EC dans éch. 50g	1/10000	239,04
200 µL EC dans éch. 50g	1/10000	142,70
300 µL EC dans éch. 50g	1/10000	56,34

On retient l'ajout d'une quantité de 200 µL d'éthylcaprylate pour 50 g d'échantillon dans les analyses suivantes.

4.7.3. Utilisation de l'éthylcaprylate dans un échantillon :

La figure 46, ci-dessous, visualise le standard interne ajouté dans les proportions retenues précédemment.

Figure 45: Analyse par chromatographie gazeuse d'un échantillon de merlan avec l'étalon interne.



4.8. Optimisation du protocole 2 :

L'optimisation du protocole 2 est nécessaire à ce niveau de l'avancée des travaux car les différents paramètres (temps, température, concentration...) ont été fixés empiriquement en fonction des travaux utilisant ce procédé (le plus souvent sur des produits qui ne sont pas des poissons). Chacune des étapes va faire l'objet d'une optimisation afin de nous permettre de définir et développer une méthode «standard» qui puisse être utilisée en routine avec les meilleurs résultats. La recherche du standard interne était indispensable pour développer cette optimisation.

4.8.1. Echantillon :

Il faut pouvoir définir la répartition entre l'échantillon prélevé et la quantité d'eau ajoutée pour le broyage. Pour cela nous avons modifié la répartition échantillon/eau (l'eau facilite le broyage de la chair de poisson et la dissolution des produits hydrophiles).

Afin de déterminer le meilleur mélange, nous avons calculé les différents coefficients de réponse des produits par rapport au standard interne (tableau 47).

Tableau 47 : Répartition échantillon / eau (p/p).

Tps de rétention (min)	Surface				Coefficients de réponse Calculés par rapport au SI			
	1/0	2/1	1/1	1/2	1/0	2/1	1/1	1/2
6,79	4927	3407	1728	850	0,0819	0,1213	0,1735	0,2167
7,44	3207	3024	3798	2848	0,0533	0,1077	0,3814	0,7262
7,69	2432	1959	934	616	0,0404	0,0697	0,0938	0,1571
7,84	2106	1698	725	462	0,0350	0,0605	0,0728	0,1178
8,04	590	606	404	205	0,0098	0,0216	0,0406	0,0523
8,28	1268	1339	714	378	0,0211	0,0477	0,0717	0,0964
8,45	976	754	247	132	0,0162	0,0268	0,0248	0,0337
8,57	996	562	278	137	0,0166	0,0200	0,0279	0,0349
9,57	11297	6189	2336	1196	0,1877	0,2203	0,2346	0,3049
9,94	128374	151483	186346	83205	2,1333	5,3932	18,7113	21,2149
11,72	12199	7513	2022	0	0,2027	0,2675	0,2030	0,0000
11,95	3452	2413	770	626	0,0574	0,0859	0,0773	0,1596
13,3	971	841	323	0	0,0161	0,0299	0,0324	0,0000
14,46	5233	2238	530	312	0,0870	0,0797	0,0532	0,0796
14,95	4247	1727	552	124	0,0706	0,0615	0,0554	0,0316
15,43	2393	1103	368	125	0,0398	0,0393	0,0370	0,0319
17,5	695	428	126	51	0,0115	0,0152	0,0127	0,0130
17,9	2218	1513	410	167	0,0369	0,0539	0,0412	0,0426
18,4	2518	1209	357	157	0,0418	0,0430	0,0358	0,0400
20,5	2866	786	341	0	0,0476	0,0280	0,0342	0,0000
21,78	2158	635	187	0	0,0359	0,0226	0,0188	0,0000
24,3	728	344	0	0	0,0121	0,0122	0,0000	0,0000
25,23	7162	3423	1114	505	0,1190	0,1219	0,1119	0,1288
29,68	1672	824	237	98	0,0278	0,0293	0,0238	0,0250
36,3	2299	0	370	82	0,0382	0,0000	0,0372	0,0209
				somme	3,4397	6,9787	20,6062	23,5278

0 : pic non déterminé

En déterminant la somme des coefficients de réponse, on guide notre choix vers le rapport (1/2 (p/p)). On peut par contre tempérer ce choix en optant plutôt vers **un rapport échantillon/eau de (1/1 (p/p))** qui évite le mieux les « pics non déterminés ».

4.8.2. Temps de broyage :

Cette étape de broyage au stomacher permet non seulement de « mixer » les morceaux de chair mais aussi de mettre la chair en contact avec l'eau pour former une pâte homogène qui est plus facile à utiliser mais surtout qui offre un meilleur échange avec le dichlorométhane. Le temps de broyage doit être optimisé pour permettre une récupération maximale. Les essais sont résumés dans le tableau 48.

Tableau 48 : Détermination du temps optimal de broyage.

Tps de rétention (min)	Surface				Coefficients de réponse Calculés par rapport au SI			
	0 s	60 s	150 s	300 s	0 s	60 s	150 s	300 s
6,79	5474	4630	6133	0	0,1289	0,1349	0,2863	0,0000
7,44	11227	12861	9209	9268	0,2643	0,3746	0,4298	0,5977
7,69	3442	3703	2049	3245	0,0810	0,1079	0,0956	0,2093
7,84	173	1056	117	0	0,0041	0,0308	0,0055	0,0000
8,04	1078	1275	645	0	0,0254	0,0371	0,0301	0,0000
8,28	4201	3490	4759	2516	0,0989	0,1016	0,2221	0,1622
8,45	1083	1078	615	520	0,0255	0,0314	0,0287	0,0335
8,57	1579	1342	932	661	0,0372	0,0391	0,0435	0,0426
9,57	754	598	346	314	0,0178	0,0174	0,0162	0,0202
9,94	322803	275313	201149	151535	7,5997	8,0187	9,3890	9,7720
11,72	334	186	136	138	0,0079	0,0054	0,0063	0,0089
11,95	125	100	78	0	0,0029	0,0029	0,0036	0,0000
13,3	550	509	372	0	0,0129	0,0148	0,0174	0,0000
14,46	1513	1003	834	0	0,0356	0,0292	0,0389	0,0000
14,95	598	651	485	0	0,0141	0,0190	0,0226	0,0000
15,43	446	213	544	0	0,0105	0,0062	0,0254	0,0000
17,5	537	166	82	0	0,0126	0,0048	0,0038	0,0000
17,9	996	323	499	0	0,0234	0,0094	0,0233	0,0000
18,4	1041	623	566	0	0,0245	0,0181	0,0264	0,0000
20,5	571	404	0	0	0,0134	0,0118	0,0000	0,0000
21,78	452	141	0	0	0,0106	0,0041	0,0000	0,0000
29,76	926	171	0	0	0,0218	0,0050	0,0000	0,0000
31	298	283	265	288	0,0070	0,0082	0,0124	0,0186
31,7	1945	698	1869	824	0,0458	0,0203	0,0872	0,0531
35,83	647	309	315	0	0,0152	0,0090	0,0147	0,0000
36,1	178	222	191	0	0,0042	0,0065	0,0089	0,0000
37,5	1049	129	0	0	0,0247	0,0038	0,0000	0,0000
41,8	374	361	231	0	0,0088	0,0105	0,0108	0,0000
				somme	8,1005	8,4344	10,0314	10,1113

0 : pics non déterminés

Il n'y a pas de différence très nette entre les rapports. On peut seulement constater une légère augmentation du rapport au cours du temps accompagnée d'une diminution des pics identifiés. Pour ces deux raisons, le meilleur compromis est un **temps de broyage de 60 s**.

4.8.3. Temps de contact avec le dichlorométhane :

Dans cette partie, il nous faut déterminer le temps de contact nécessaire au dichlorométhane pour extraire le maximum de composés en un temps raisonnable. Les essais

ont été réalisés pour 1, 2, 4 et 8 heures d'agitation de la chair de poisson avec le dichlorométhane.

Tableau 49 : Détermination du temps optimal d'extraction.

Tps de rétention (min)	Surface				Coefficients de réponse calculés par rapport au SI			
	1 H	2 H	4 H	8 H	1H	2 H	4 H	8 H
6,79	1392	5735	10442	4630	0,1484	0,1184	0,2907	0,1349
7,44	2052	15158	10412	12861	0,2187	0,3129	0,2899	0,3746
7,69	325	3548	2922	3703	0,0346	0,0732	0,0813	0,1079
7,84	372	205	694	1056	0,0396	0,0042	0,0193	0,0308
8,04	376	1205	1212	1275	0,0401	0,0249	0,0337	0,0371
8,28	102	2856	2677	3490	0,0109	0,0590	0,0745	0,1016
8,45	107	912	971	1078	0,0114	0,0188	0,0270	0,0314
8,57	231	1436	2824	1342	0,0246	0,0296	0,0786	0,0391
9,57	374	2637	930	798	0,0399	0,0136	0,0259	0,0232
9,94	54448	624283	248950	275313	5,8028	5,8634	6,9307	8,0187
11,72	286	724	65	186	0,0305	0,0149	0,0018	0,0054
11,95	325	78	116	100	0,0346	0,0016	0,0032	0,0029
13,3	51	989	625	709	0,0054	0,0204	0,0174	0,0207
14,46	286	6484	9425	9003	0,0305	0,1338	0,2624	0,2622
14,95	926	7740	5691	6510	0,0987	0,1598	0,1584	0,1896
15,43	123	2416	1068	2013	0,0131	0,0499	0,0297	0,0586
17,5	0	213	112	166	0,0000	0,0044	0,0031	0,0048
17,9	0	936	598	323	0,0000	0,0193	0,0166	0,0094
18,4	0	1269	1082	623	0,0000	0,0262	0,0301	0,0181
20,5	159	78	326	404	0,0169	0,0016	0,0091	0,0118
21,78	109	159	181	141	0,0116	0,0033	0,0050	0,0041
29,76	76	931	547	771	0,0081	0,0192	0,0152	0,0225
31	192	65	58	283	0,0205	0,0013	0,0016	0,0082
31,7	734	897	913	698	0,0782	0,0185	0,0254	0,0203
35,83	201	353	442	309	0,0214	0,0073	0,0123	0,0090
36,1	123	653	422	222	0,0131	0,0135	0,0117	0,0065
37,5	284	163	317	129	0,0303	0,0034	0,0088	0,0038
41,8	71	537	487	361	0,0076	0,0111	0,0136	0,0105
				somme	6,3502	6,5188	7,7962	8,9196

0 : pic non déterminé

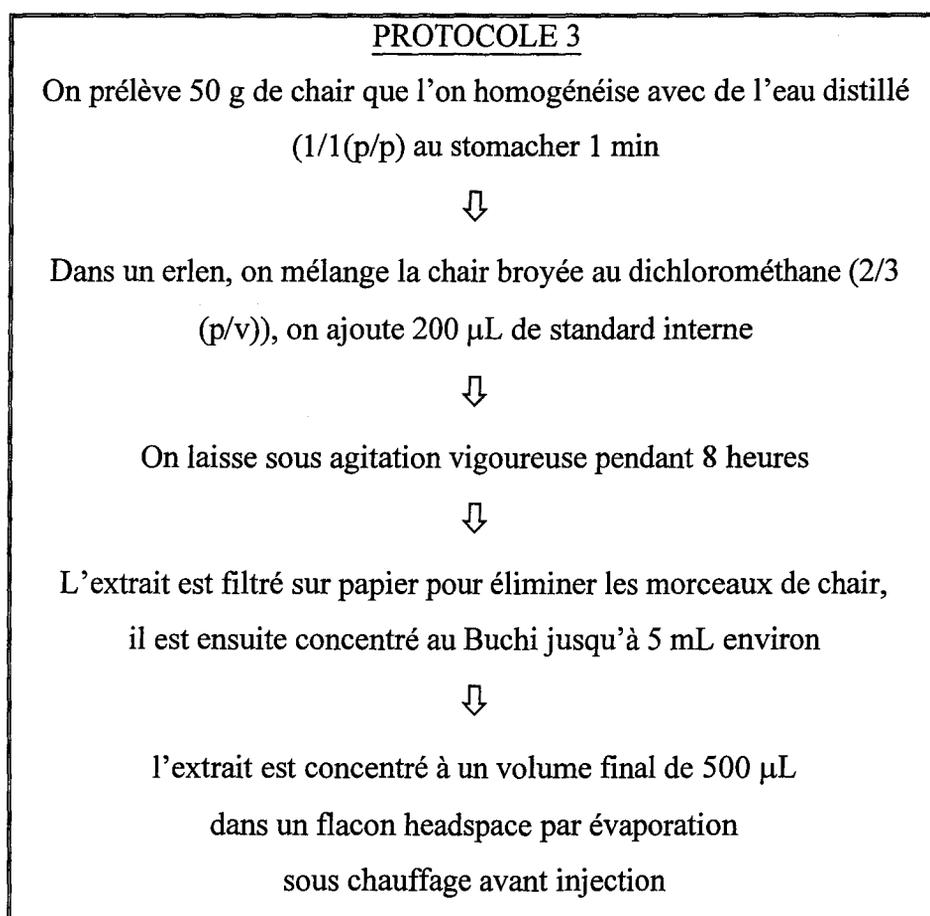
Le meilleur temps d'extraction du dichlorométhane apparaît être **8 heures d'incubation sous agitation.**

4.8.4. Volume de dichlorométhane :

Il est conseillé dans le cas d'extraction par des solvants que le volume du solvant soit au moins égal à celui de l'échantillon. Ce qui va guider notre choix est la nécessité d'avoir un volume suffisant pour que l'agitation soit correcte tout au long des 8 heures. Jusqu'à présent, on a ajouté 200 mL de dichlorométhane pour 100 g de chair, ce qui semble excessif au vu de la difficulté à distiller le dichlorométhane. Par contre, le volume de 100 mL ne favorise pas une bonne agitation de la chair. On retient donc le volume intermédiaire **de 150 mL de dichlorométhane à ajouter à 100 g de chair.**

4.8.5. Protocole d'extraction optimisé :

Le protocole 2 devient donc le protocole 3 suivant :



4.9. applications :

On a réalisé une extraction de composés volatils sur trois espèces de poisson (merlan, hareng, cabillaud) à un niveau d'altération de J+1 en utilisant le protocole 3. Les analyses ont été réalisées le même jour et les poissons ont été conservés ensemble pour avoir les mêmes conditions

Tout d'abord, l'analyse du merlan présente un profil chromatographique quasiment identique à celui de l'échantillonnage effectué pour les études précédentes. On peut le comparer à celui de la figure 45. Ceci permet de montrer que les produits identifiés ne sont pas spécifique de l'échantillonnage.

En comparant l'extraction réalisée sur le merlan et celles sur le cabillaud (figure 45 et 46), on peut constater la présence de 19 pics ayant un temps de rétention identique. Ceci conforte l'idée que des produits sont communs à différentes espèces. Par contre pour les composés ayant des temps de rétention différents chez le cabillaud, une identification en spectrométrie de masse semble intéressante.

L'extraction réalisée sur le hareng a montré qu'il faudrait une adaptation spécifique de la technique sur les poissons gras car ils contiennent une quantité importante de lipides gênant l'analyse. On retrouve 12 composés identiques à la fois au merlan et au cabillaud.

Cette étude montre que la technique d'extraction au dichlorométhane donne des résultats constants en fonction de trois espèces. On peut envisager une application plus large de cette méthode à l'ensemble des poissons, afin de comparer les profils chromatographiques. De plus, elle permet une détection des composés volatils à un stade d'altération très précoces (J+1) ce qui motive essentiellement nos travaux de recherche.

Figure 46 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de cabillaud après extraction au dichlorométhane.

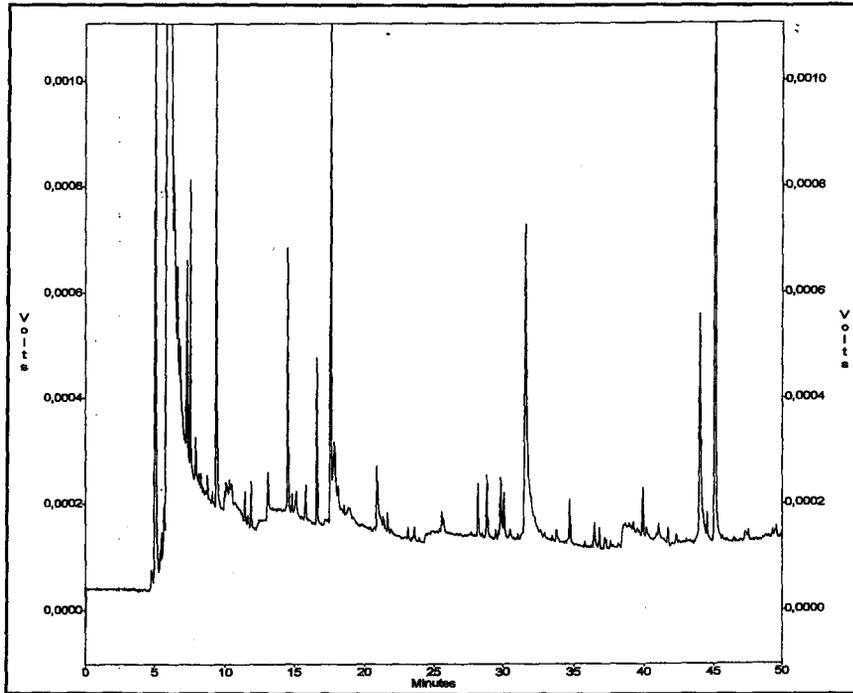
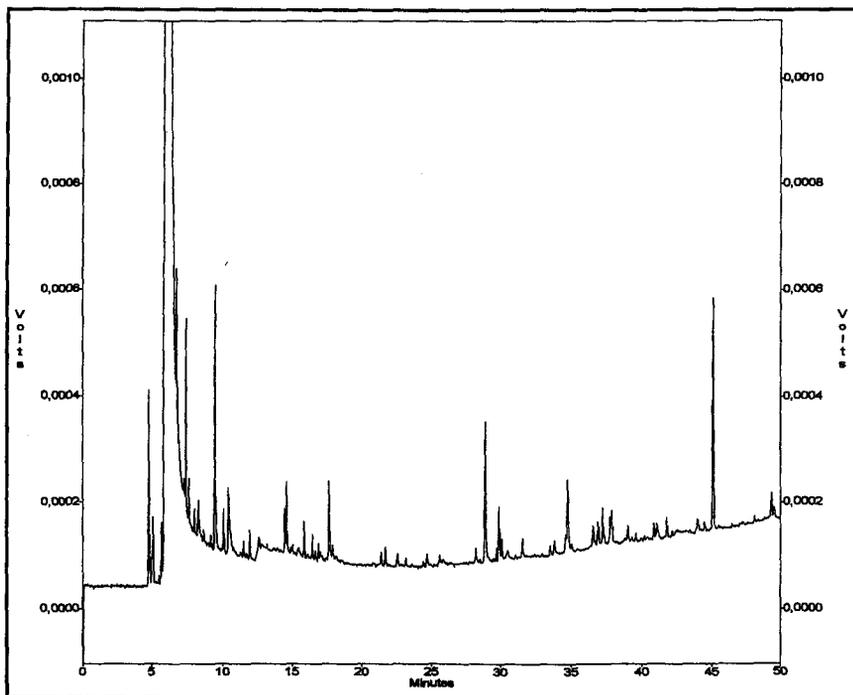


Figure 47 : Séparation par chromatographie gazeuse d'un échantillon de hareng après extraction au dichlorométhane.



4.9.1. Conclusion intermédiaire sur l'extraction par le dichlorométhane :

Nous avons pu à l'aide de cette méthode d'extraction au dichlorométhane sélectionner un support chromatographique bien adapté aux composés extraits. Cette méthode permet la récupération d'un nombre important de produits que l'on a réussi en partie à identifier en spectrométrie de masse. Ces produits sont d'origines diverses et pourraient être étudiés de manière plus approfondie au cours de l'altération pour suivre leur évolution.

La recherche d'un standard interne nous a permis d'optimiser la technique en étudiant chacune des étapes de l'extraction. Le standard interne pourra être utilisé par la suite pour quantifier les différents composés volatils en prenant en compte les différents rendements afin de calculer des coefficients de réponse.

En incluant la préparation des échantillons, l'extraction, la concentration et la séparation chromatographique, la durée totale d'une analyse n'exède pas 10 heures.

4.10. Comparaison entre la SPME et l'extraction au dichlorométhane - conclusion :

Il faut souligner en préambule à cette comparaison que le choix d'étudier en parallèle deux techniques différentes est scientifiquement très intéressant car il permet une double approche sur un sujet pour lequel nous n'avons aucune expérience et nous permet d'établir des comparaisons.

Au niveau technique : sans aucun doute la SPME apparaît la mieux adaptée à un travail d'analyse de routine. En effet, le principal avantage est de réaliser la prise d'échantillon sans aucune étape de purification. De plus le temps, le coût et la mise en place d'une analyse sont plus restreints que pour l'extraction par le dichlorométhane. L'intérêt aussi est de pouvoir

prélever les composés volatils directement sur le lieu où se trouve le poisson et pouvoir réaliser la séparation chromatographique ultérieurement.

Au niveau quantitatif : la caractérisation d'un standard interne dans la méthode d'extraction au dichlorométhane permet d'ores et déjà de pouvoir quantifier les composés volatils identifiés. Par contre pour la SPME, cette technique a plutôt des applications semi-quantitatives ou de dépistage. Elle apporte seulement des éléments sur la quantité ou sur le rapport entre plusieurs produits qui peuvent être complétés si nécessaire par une extraction au dichlorométhane. On peut souligner l'aspect complémentaire des deux techniques.

Au niveau des résultats : L'extraction par le dichlorométhane permet de récupérer un plus grand nombre de composés en partie différents de la SPME qui sélectionne des produits plus légers comme la triméthylamine. L'analyse en SPME a une durée plus courte (6 heures) que celle par l'extraction au dichlorométhane (10 heures) par contre il est plus facile de réaliser des séries d'analyse en utilisant l'extraction.

En conclusion, la SPME apparaît comme un bon moyen de détection (rapide et utilisable facilement en routine) et l'extraction au dichlorométhane permet une quantification plus précise.

Il semble nécessaire d'optimiser l'utilisation de la SPME en définissant les seuils de détection pour chacun des composés volatils pour différents types de poissons (poissons gras et poissons maigres). En ce qui concerne l'identification des composés volatils, il faut la poursuivre systématiquement pour tout nouveau profil chromatographique à la fois en SPME et pour l'extraction afin de compléter l'identification qui a été commencée dans ce travail.

De manière générale, on peut supposer que l'utilisation de composés volatils comme marqueurs précoces d'altération du tissu musculaire du poisson est une voie qui mérite d'être

étudiée et approfondie. En effet, les premiers résultats obtenus dans ce travail laissent envisager un champ d'investigation assez large.

CONCLUSIONS

Notre travail avait pour but la recherche de marqueurs chimiques précoces pour l'évaluation de l'altération du tissu musculaire de poissons marins. Il convient de faire le bilan sur les trois axes de recherches (les dérivés nucléotidiques, les amines biogènes et les composés volatils) qui ont été abordés en proposant différentes perspectives.

En ce qui concerne les dérivés nucléotidiques, nous avons mis en place une technique chromatographique en CLHP qui permet de séparer l'ATP, l'ADP, l'AMP, l'IMP, l'inosine, la guanosine, l'hypoxanthine et la guanine. La difficulté a été de pouvoir travailler à la fois sur des bases et des nucléosides, mais aussi sur des nucléotides. L'intérêt d'avoir étudié ces différents types de dérivés nucléotidiques est de pouvoir suivre entièrement le catabolisme de l'ATP. L'originalité de cette méthode est de ne négliger aucune voie de dégradation. En effet, l'IMP peut donner à la fois de la guanosine par l'intermédiaire du XMP et du GMP, mais aussi de l'inosine. Ces deux voies de dégradation ont été présentées par Fischer (1995). Cette nouvelle approche pourrait expliquer certaines fluctuations, rapportées dans la bibliographie, lors de dosages ne tenant pas compte de cette dégradation. On a pu vérifier sur des échantillons de hareng la méthode d'extraction à partir du tissu musculaire, la séparation par CLHP et la méthode de quantification des différents dérivés. Après quelques adaptations méthodologiques sur la prise d'échantillon, des travaux ultérieurs pourront mettre en application cette méthodologie sur différentes espèces de poisson au cours de suivis d'altération lors de conservation sous glace fondante. Il sera intéressant d'étudier des poissons différents (poissons maigres et poissons gras), par exemple le cabillaud, le hareng et le maquereau, mais aussi le saumon pour lequel il y a une demande de la part des professionnels pour évaluer objectivement sa fraîcheur. Ces suivis serviront à noter et à comparer l'évolution de chaque dérivé nucléotidique mais aussi à pouvoir les regrouper dans un indice plus fiable, éliminant les variations intrinsèques de chaque poisson. On ne retiendra pas dans cet indice

les premiers nucléotides comme l'ATP, l'ADP et l'AMP car ils disparaissent très rapidement après la mort du poisson. Par contre, on pourra y introduire l'une ou l'autre des voies de dégradation ou même les deux en fonction du niveau d'altération et de la quantité de composés. Des perspectives intéressantes ont ainsi été ouvertes sur ce sujet qu'il ne faut pas abandonner.

Les amines biogènes ont constitué une partie importante de notre travail, non pas au niveau de la séparation par CLHP qui avait déjà été élaborée, mais surtout au niveau des applications à des poissons. Pour cela, nous avons défini un modèle d'étude allant de l'étape de quantification jusqu'à l'exploitation des résultats que nous pouvons énumérer ci-dessous :

- Tout d'abord la quantification : nous disposons d'une méthode CLHP qui réussit à séparer sept amines biogènes (putrescine, cadavérine, histamine, tyramine, tryptamine, spermine et spermidine). A l'aide de la méthode des ajouts dosés, nous avons pu calculer pour chaque amine des droites de régressions qui tiennent compte de la matrice (tissu musculaire) pour estimer les quantités. On a démontré que cette matrice pouvait être différente d'une espèce à l'autre (étude sur du merlan et du carrelet) et pouvait évoluer en fonction de la fraîcheur. Cet effet modifie la détermination des droites de régression. Pour s'affranchir des perturbations de dosage liées aux modifications de l'effet matrice, notre calcul de droite de régression a été effectué sur plusieurs jours d'altération (J+1, J+4, J+7). Notre méthode permet la détection de faibles quantités d'amine biogène (de l'ordre du ppm) avec maintenant une quantification la plus juste incluant les changements de la matrice.

- Indice de fraîcheur : au cours des suivis d'altération, nous avons corrélé les quantités d'amines biogènes avec un indice de fraîcheur représentatif de la qualité organoleptique du poisson. Cet indice de fraîcheur est déterminé par une analyse sensorielle de plusieurs notateurs. Nous avons mis en place une procédure de notation individuelle utilisant un barème

normalisé afin de limiter au maximum la subjectivité des notateurs. De surcroît pour vérifier l'homogénéité des notateurs, nous avons réalisé une analyse statistique.

- Suivi d'altération : nous avons effectué un suivi d'altération sur le merlan et un sur le carrelet. Pour suivre l'évolution des amines biogènes, nous avons déterminé un indice d'amines (IA') qui est plus révélateur que les amines biogènes prises individuellement. Il reprend au numérateur celles qui augmentent et au dénominateur la totalité. On a proposé un modèle linéaire permettant de relier la Fraîcheur (IF) avec l'IA' : pour le merlan $IF = 2,6 - 0,024 IA'$ et pour le carrelet $IF = 2,38 - 0,025 IA'$. Au vu de ces équations, on en a déduit une analogie dans l'évolution donc dans la dégradation.

Parallèlement à leur intérêt dans l'évaluation de l'altération, ces travaux ont conduit également à une application dans le domaine de la sécurité alimentaire. Ils ont permis de proposer une méthode de quantification de l'histamine conforme à la directive du conseil du 22 juillet 1991 (91/493/CEE).

La partie la plus innovante du travail concerne les composés volatils. En effet, en nous appuyant sur le dosage de l'azote basique volatil total, nous avons développé cette nouvelle approche qui consiste à étudier les molécules aromatiques (odorantes) produites au cours de l'altération. Pour cela, il nous a fallu dans un premier temps comparer différentes techniques de récupération des composés volatils (extraction par des solvants, SPME, distillation sous vide, étude directe sur la chair). La mieux adaptée et celle qui permettait de récupérer un maximum de produits a été la SPME. En effet, elle s'applique sur des échantillons sans aucune étape de préparation et l'analyse a pu être effectuée en 6 heures. On a réussi par spectrométrie de masse en mode impact électronique à identifier 18 composés volatils extraits à température ambiante. Nous avons aussi concentré nos efforts sur la méthode d'extraction au dichlorométhane. Il a fallu adapter une méthode à notre substrat en se débarrassant de tous

les contaminants apportés à chaque étape du protocole et tout d'abord ceux contenus dans le solvant. Après avoir déterminé un standard interne (l'éthylcaprylate), nous avons pu optimiser les différentes phases de l'extraction en calculant les coefficients de réponse des composés par rapport à l'éthylcaprylate. Cette méthode a permis la séparation et l'identification en spectrométrie de masse de 25 produits. Elle a une durée d'analyse de 10 heures, plus longue que la SPME, mais permet de réaliser des séries d'échantillons plus importantes. De plus l'extraction par le dichlorométhane peut être utilisée à l'aide du standard interne, à l'inverse de la SPME, pour quantifier précisément. Le champ d'investigation dans ce sujet est assez large au vu de cette première série de travaux.

Nous pouvons conclure l'ensemble du travail présenté dans cette thèse en soulignant que la difficulté de rechercher des marqueurs d'altération est surtout liée à l'hétérogénéité de composition des poissons. En effet, les différences entre espèces et entre individus sont complexes à estimer et ne sont pas évidentes à surmonter. Il apparaît donc important de ne pas avoir une seule approche de la problématique mais plutôt d'aborder plusieurs axes de recherches complémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. BIBLIOGRAPHIE

- Ackman R.** (1980) Fish lipid. ED Fish News Books Lim., England, 86-103.
- Ackman R., Hingley J., MacKay K.** (1972) Dimethyl sulfide as an odor component in Nova Scotia Fall mackerel. *J. Fish Res. Bd Can.*, **29**, 1085-1088.
- Alberts B., Lewis KS., Robets K., Bray D., Raff M., Watson JD.** (1992) The cell. Ed Flammarion Médecine et Sciences, Paris, 692-701.
- Amlacher E.** (1962) Rigor mortis in fish. *Fish as food*, 2, Academic Press, New York, 35-42.
- Arnold S., Brown W.** (1978) Histamine, toxicity from fish products. In *advance in food research*, Academ. press. Inc., New York, 113-154.
- Artemis P., Simopoulos M.** (1995) Nutritional aspect of fish. In *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality*, Ed Elsevier, 37-44.
- Bendall J.** (1969) Muscle, molecules and movement, an assay in the contraction of muscles. *American Elsevier*, New York, 125-134.
- Beatty S., Gibbons N.** (1937) The measurement of spoilage in fish. *J. Biol. Bd. Can.*, **3**, 77-91.
- Baek H., Cadwallader K.** (1996) Volatile compounds in flavor concentrates produced from crayfish-processing byproducts with and without protease traitement. *J. Agric. Food Chem.*, **44(10)**, 3262-3267.
- Bailey AJ., Etherington DJ.** (1980) Metabolism of collagen and elastin. *Comprehensive Biochem.*, Elsevier, New York, 130-139.
- Barbieri G., Bolzoni L., Careri M., Mangia A., Parolari G., Spagnoli S., Virgili R.** (1994) Study of the volatile fraction of parmesan cheese. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1170-1176.
- Barett E., Kwan H.** (1985) Bacterial réduction of OTMA. *Ann. Rev. Microbiol.*, **39**, 131-149.
- Barsoum G.S, Gaddum J.H.** (1935) The pharmalogical estimation of adenosine and histamine in blood. *J. Physiol. (London)*, **85**, 1-14.
- Bassette R., Ward G.** (1969) *Microchem. J.*, **14**, 471-477.
- Billon J., Ollieuz N. Tao S.** (1979) Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'ABVT pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. *R.T.V.A.*, **149**, 13-17.
- Boisseau M., Seigneur M.** (1996) Use of ω -3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of thrombosis. ω -3, lipoprotein and artherosclerosis. Ed. Davignon, Eurotext Paris, 87-95.
- Bonde G.** (1977) Bacterial indication of water pollution. In *Adv. in aquatic microbiol.* Ed. M.R. Roop Acad. Press. Londres, 273-364.



- Bourgeois C., Mesclé J., Zucca J.** (1988) Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Microbiologie alimentaire. Ed. Lavoisier Paris.
- Bourne M.** (1982) Food texture and viscosity : concept and measurement. Food Sci. Technol., Academic press.
- Borderias A., Lamua M., Tejada M.** (1983) Texture analysis of fish fillets and minced fish by both sensory and instrumental methods. J. Food Technol., **18**, 85-95.
- Boyle J., Lindsay R., Stuibler D.** (1992) Bromophenol distribution in salmon and selected seafoods of fresh and saltwater origin. J. Food Sci., **57(4)**, 918-922.
- Brink B., Damink C., Joosten H., Huis J.** (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. Int. J. Food Microbiol., **11**, 73-84.
- Brody J.** (1965) Fishery by products technology. Ed the AVI Publ. Cy. Inc.
- Buckzo W.** (1980) biological effect of degradation products of collagen by bacterial collagenase. Biol. J. Pharmac., **69**, 551-554.
- Busto O., Miracle M., Guasch J., Borrull F.** (1996) Determination of biogenic amines in wines by HPLC with on-column fluorescence derivatization. J. Chromatogr., **757**, 311-318.
- Cha Y., Cadwallader K.** (1995) Volatile components in salt-fermented fish and shrimp pastes. J. Food Sci., **60**, 19-24.
- Chamberlain T., Kow F.** (1994) Getting the best out of those oreos. Australian fisheries, **53(6)**, 30-32.
- Chegaray S.** (1999) Boulogne : mutation tout azimuts. Le marin, **2690**, 13-29.
- Cheminitius G., Bilitewski U.** (1996) Development of screen-printed enzyme electrodes for the estimation of fish quality. Sensors and Actuators B, **32**, 107-113.
- Chinivasagam H., Bremmer H., Wood A., Nottingham S.** (1998) Volatile components associated with bacterial spoilage of tropical prawns. Int. J. Food Microbiol., **42**, 45-55.
- Chung H., Cadwallader K.** (1993) Volatile components in blue crab meat and processing by-product. J. Food Sci., **58**, 1203-1207.
- Conway E.** (1962) determination of volatile amine. Conway microdiffusion analysis and volumetric error. 5th Ed. Crosby Lockwood, London, 195-603.
- Crahay F., Noirefalise A.** (1996) Les amines biogènes dans les aliments. Rev. Med. Liège, **51**, 7, 479-484.
- Dalgaard P., Gram L., Huss H.** (1993) Spoilage and shelf-life of cod fillets packed vacuum or modified atmospheres. Int. J. Food Microbiol., **19**, 283-294.
- Dalgaard P.** (1995) Qualitative and quantitative characterisation of spoilage bacteria from packed fish. J. Food Microbiol., **26**, 319-333.
- Dalgaard P., Munoz L., Mejlholm O.** (1998) Specific inhibition of *Photobacterium phosphoreum* extends the shelf-life of modified-atmosphere-packed cod fillets. J. Food Protect., **61**, 1191-1194.

- Davidek T., Davidek J.** (1995) Biogenic amines. In « natural toxic compound of food ». CRC Press, Boca raton, Fl, 108-123.
- Davis H.** (1982) Fluorescence of fish muscle : description and measurement of changes occuring during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 1138-1142.
- De Saint-Blanquat G.** (1980) Aspect toxicologiques et nutritionnels des nitrates et nitrites. *Ann. Nutr. Alim*, **34**, 827-864.
- Downey G.** (1996) Non-invasive and non-destructive percutaneous analysis of narmed salmon flesh by near infra-red spectroscopy. *Food Chemistry*, **55(3)**, 305-311.
- Duriez P.** (1996) Association of vitamin E and fish oil. ω -3, lipoprotein and artherosclerosis. Ed. Davignon, Eurotext Paris, 151-153.
- Dyer W.J.** (1961) Fish proteins with special reference to freezing. . Ed. Acad. Press. New york, **1**, 275-328.
- Easley D., Kleopfer R., Carasea A.** (1981) GC-MS determination of volatile organic compounds in fish. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 653-656.
- Erickson M.** (1994) Comparaison of chemical measurements to differentiate oxidative stability of frozen minced tilapia fish miscle. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **29**, 585-591
- Etievant P.** (1996) Artifacts and contaminants in the analysis of food flavor. *Critical reviews in food science and nutrition*, **36(7)**, 733-745
- Fiddler W., Doerr R., Gates A.** (1991) Gas chromatographic method for determination of dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine oxide in fish-meat Frankfukfurters. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 400-403.
- Fischer J.** (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.
- Fretheim K.** (1980) Influence of generation temperature on the chemical composition, antioxydative, and antimicrobial affects of wood smoke. *J. Food Dci.*, **45**, 999-1002.
- Fruchart J.** (1996) Triglyceride rich particules and artherosclosis. Role of ω -3 polyunsaturated fatty acids. ω -3, lipoprotein and artherosclerosis. Ed. Davignon, Eurotext Paris, 121-128.
- Fuji K., Murota K.** (1982) Isolation of skeletal muscle collagen. *Anal biochem.*, **127**, 449-452.
- Georgala D.L.** (1957) Changes in the skin flora of cod after washing and icing. *J. Appl. Bacteriol.*, **20(1)**, 23-29.
- Gilbert J.** (1975) The chemistry of smoked food. *J. Sci. Food Aric.*, **10**, 245-261.
- Gouygou J., Siquin C., Etienne M., Landrein A., Durand P.** (1992) Quantitative and qualitative determination of biogenic amines in fish. *The ressource and its explotation*, 178-186.
- Gram L. , Trolle G., Huss 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.

- Grosh W.** (1993) Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. *Trends Food Sci. Technol.*, **4**, 68-73.
- Gustavson KH.** (1954) The chemistry and reactivity of collagen. Academic press, New york.
- Hamm R.** (1977) Analysis of smoke and smoked foods. *Pure Appl. Chem*, **49**, 1655-1666.
- Hardy T., Burt R., Gunstone F.** (1974) Hept-cis-4-enal and its contribution to the off flavour of cold-stored cod. *J. Sci. Food Chem.*, **24**, 1477-1481.
- Heia K., Nilsen H., Oehlenschlager J., Schubring K., Nesvabda P.** (1997) Evaluation of fish freshness by physical measurement techniques. Proceeding of the final meeting of the concerted action, 347-354.
- Herbert R., Ellis J., Shewan J.** (1995) Isolation and identification of the volatile sulphides produced during chill-storage of north sea cod. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1195-1202.
- Hiatt M.** (1983) Determination of volatile organic compounds in fish samples by vacuum distillation and fused silica capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **55**, 506-516.
- Hiatt M., Farr C.** (1995) Volatile organic compound determination using surrogate-based correction for method and matrix effects. *Anal. Chem.*, **67**, 426-433.
- Hirano T., Zang, Morishita A., Suzuki T., Shirai T.** (1992) Identification of volatile compounds in ayu fish and its feed. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 547-557.
- 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.
- 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.
- Hoffman M., Monroe DM., Roberts HR.** (1996) Cellular interaction in hemostasis. *Hémostasis*, **26(1)**, 12-16.
- Hoffmann A.** (1981) The use of the GR torrmyeter for assessment of frehsness of iced tropical fish from the indian ocean. *Tropical Sci.*, **23**, 283-291.
- 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.
- Horst K.** (1984) Danerkonserven aus blauen wittling. *Ed Arbeiten Inst. Biochem. And Technol.* 1.
- Hsieh R., Kinsella J.** (1989) Lipoxygenase generation of specifc volatile flavor carbonyl compounds in fish tissues. *J. Agric. Food Chem.*, **37 (2)**, 279-286.
- Hughes M, Potter M.** (1991) Scombroïd fish poisoning : from pathogenesis to prevention. *New Eng. Med.*, **324**, 766-768.
- Hui J.Y., Taylor S.L.** (1983) HPLC determination of putrefactive amine in foods. *J. Assoc.Off. Anal. Chem.*, **66(4)**, 853-857.
- Huss H.** (1997) Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control*, **2**, 91-98.

- Hwang D., Chang S., Shiua C., Chai T.** (1997) HPLC determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. *J. Chromatogr.*, **693**, 23-30.
- Imberman M., Oppenheim F., Franzblau C.** (1982) The appearance of free hydroxyproline as the major product of degradation of newly synthesized collagen in cell culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **719**, 480-487.
- Ijomah P., Clifford M., Walker R., Wright J., Hardy R. Murray C.** (1991) The importance of endogenous histamine relative to dietary histamine in the etiology of scombrototoxicosis. *Food Addit. Contam.*, **8**, 531-542.
- Ikeda S.** (1980) *Advances in fish science and technology*. Ed. Fishing News Books Ltd England, 111-123.
- Jason A., Richards J.** (1975) The development of an electronic fish freshness meter. *J. Phys. E.*, **8**, 826-830.
- 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.
- Jensen B., Refsgaard H., Olafsdottir G.** (1997) Evaluation of fish freshness. Proceeding of the final meeting of the concerted action, 55-69.
- Jones N., Murray J.** (1964) Rapid measures of nucleotide dephosphorylation in iced fish muscle. Their values as indices of freshness and IMP concentration. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 684.
- Jones W, Egoville M., Strolle E., Dellamonica E.** (1988) *J. Chromatogr.*, **455**, 45-51.
- Joosten H.M. and Northolt L.J.** (1989) Detection, growth, and amine-producing capacity of *Lactobacilli* in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2356-2359.
- Josephson D., Lindsay R., Stuiber D.** (1983) Identification of compounds characterizing the aroma of fresh white fish. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 326-330.
- Josephson D., Lindsay R., Stuiber D.** (1991) Influence of maturity on the volatile aroma compounds from fresh pacific and great lake salmon. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1576-1581.
- Justine N** (1985) Ionisation- gadget ou révolution. *Filière viande*, **79**, 16-20.
- Kaitaranta J.K.** (1980) Lipids and fatty acids of a white fish flesh and roe. *J. Sci. Food Agric.*, **31**(2), 1303-1308.
- Kamio Y., Nakamura K.** (1987) Putrescine and cadaverine are constituent of peptidoglycane in *Veillonella alcalescens* and *Veillonella parvula*. *J. Bacteriol.*, **169**, 2881-2884.
- Karube I., Matsuka H., Susuki S., Watanabe E.** (1984) Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 314-319.
- Kausik S.J.** (1997) nutrition-alimentation et composition corporelle chez le poisson. *Cah. Nutr. Diét.*, **32** (2), 100-106.
- Kawai T.** (1996) Fish flavor. Critical reviews in food science and nutrition, **36**, 257-298.

- Kelleher S., Zall R.** (1983) Ethanol accumulation in muscle tissue as a chemical indicator of fish spoilage. *J. Food Biochem.*, **7**, 87-91
- Kikuchi S., Ishimoto M.** (1980) Nitrate respiration of *Klebsiella pneumoniae* on amino acids, especially on serine. *Z. Allgem. Mikrobiol.*, **20**, 405-413.
- Kinietz M.** (1968) Massenspektrometrie, verlag chimie gmhb, weimheim, 44-45.
- Kirchbaum J., Lukas B., Benert W.** (1994) HPLC analysis of biogenic amines and amino acid in food. *International laboratory*, july, 17-30.
- Klausen N., Lund E.** (1986) Formation of biogenic amines in herring and mackerel. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **182**, 459-463.
- Knowles M.** (1975) Phenol in smoked cured meats : nitrosation of phénols in liquid smoked and smoked bacon. *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 267-276.
- Labuza T.P** (1971) Kinetics of lipid oxidation in foods. *Cr. Critical Reviews in Food Technol.*, **10**, 355-403.
- Lannelongue M., Finne G., Hanna M., Nickelson R., 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**, 1197-1203.
- Laroche M., Bonnet S., Fauconneau B., Marcel J.** (1996) Evolution post mortem de quelques caractéristiques de la chair de truite fario et de carpe. *Refrigeration and aquaculture*, 117-125.
- Legrand G., Adrian J.** (1981) Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition. Ed Lavoisier-Technique et documentation.
- Lerke P., Porcuna M., Chin H.** (1983) Screening test for histamine in fish. *J. Food Sci.*, **48(1)**, 155-157.
- Likens S., Nickerson G.** (1964) Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Am. Soc. Brew. Soc.*, 5-13.
- Lin J., Lai C.** (1980) HPLC determination of natural occurring primary and secondary amine with dabsyl chloride. *Anal. Chem.*, **52**, 630-635.
- Lindsay R., Josephson D., Olafsdottir G.** (1986) Chemical and biochemical indices for assessing the quality of fish packaged in controlled atmospheres. *Proceedings of an international symposium sponsored by the university of alaska sea grant program, elsevier science publishers, Amsterdam*, 221-234.
- Lindsay R.** (1990) fish flavor. *Food reviews international*, **6**, 437-455
- Liston J.** (1980) *Microbiology in fishery science*. Ed J.J Connell, Fishing News Book Ltd Farnham, England, 37-44.
- Lockhart W., Murray J.** (1988) Determination of trace volatile organic compounds in fish tissues by GC. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71 (6)**, 1086-1089.
- Long T.** (1993) Statistical power in the detection of matrix effect. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **117**, 387-392.

- López-Sabater E., Rodríguez-Jerez J., Roig-Sagues A., Mora-Ventura M.** (1993). Determination of histamine in fish using an enzymic method. *Food Addit. Conyam.*, **10(5)**, 593-602.
- López-Sabater E., Rodríguez-Jerez J., Roig-Sagues X., Mora-Ventura M.** (1994). Bacteriologic quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning : effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *J. Food Protect.*, **57(4)**, 318-323.
- Love R., Yamaguchi K.** (1976) The connective tissue and collagen of cod during starvation. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55B**, 487-491.
- Ludorff W., Meyer V.** (1973) *Fishe und fischerzeugnisse*. Ed Paul Parey, Berlin.
- Luong J., Male K., Masson C., Nguyen A.** (1992) Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes. *J. Food Sci.*, **57**, 77-81.
- Luong J., Male K., Huynh M.** (1991) Applications of polarography for assessment of fish freshness. *J. Food Sci.*, **56**, 355-340.
- Mc Gill A., Hardy T., Burt R., Gunstone F.** (1974) Hept-cis-4-enal and its contribution to the off flavour of cold stored cod. *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 1477-1481.
- Magnusson O., Johansen S., Nordtvedt T.** (1996) Effect of icing and storage temperature on salmon quality quality. *Réfrigération and aquaculture*, 247-254.
- Malle P., Nowogrocki G., Taillez R.** (1983) Relationship between deterioration index and rates of TVBN for marine fish. *Sciences des aliments*, **3**, 311-322.
- Malle P., Tao H.** (1987) Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *J. Food Protect.*, **50**, 756-760.
- Malle P., Vanelle A.M., Petit A.** (1989) Teneur en ABVT du tissu musculaire des poissons marins. *Rec. Med. Vét.*, **165**, 395-402.
- Malle P., Poumeyrol M.** (1989) A new chemical criterion for the quality control of fish : TMA/TVBN (%). *J. Food Protect.*, **52**, 419-423.
- Malle P.** (1992). *Microbiologie des poissons marins évaluation expérimentale de l'altération*. These n°964, U.S.T. Lille I.
- Malle P., Vallé M., Bouquelet S.** (1996). Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. . *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **(79)**, 43-49.
- Malle P., Valle M.** (1996) Etude comparative des modes de conservation de filet de poissons frais préemballés. *Recueil Med. Vet.*, 383-389.
- Malle P., Valle M., Demarque P., Eb P., Taillez R** (1998) detection and enumeration of H₂s bacteria : application to shewanella putrefasciens. *J. Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **6**, 93-103.
- McAnulty R., Laurent GJ.** (1987) Collagen synthesis and degradation in vivo. Evidence for rapid rates of collagen turnover with extensive degradation of newly synthesized collagen in tissues of the adult rat. *Collagen Rel. Res.*, **7**, 93-104.

- Manohar S.** (1971) Characteristics of white muscle fluorescence in pre-rigor fish. *Fish inspection and quality control fishing new*, 211-215.
- Meiberg J., Harder W.** (1978) Aerobic and anaerobic metabolism of TMA, DMA, MA in in *Hyphomicrobium*. *J. Gen. Microbiol.*, **106**, 265-276.
- Misharina T., Golovnia R.** (1992) Efficiency of the extraction of volatile substance from food products by various methods. *J. Anal. Chem.*, **47**, 1170-1176.
- Mietz J.L., and Karmas E.** (1977) Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC. *J. Food Sci.*, **42**, 155-158.
- Motohiro T.** (1962) Studies on the petroleum odor in canned chum salmon. *Mem. Fac. Fish*, **10**, 1-7.
- Mottram D., Puckey D.** (1978) Artefact formation during the extraction of bacon volatiles in a Likens-Nickerson apparatus. *Chem. Ind.*, **3**, 385-389.
- Mulchandani A., Luong J., Male K.** (1989) Development and application of a biosensor for Hypoxanthine in fish extract. *Anal. Chimica Acta*, **221**, 215-222.
- Mulchandani A., Male K., Luong J.** (1990) Development of a biosensor for assaying postmortem Nucleotide degradation in fish tissues. *Biotechnol. Bioengineer*, **35**, 739-745.
- Murray A., Riley J.** (1973) The determination of chlorinated aliphatic hydrocarbons in air, natural waters, marine organisms, and sediment. *Anal. Chim. Acta*, **65**, 261-270.
- Murray I., and Burt J.** (1969) The decomposition of fish. *Torry advis.* 38 Note, Aberdeen.
- Murray J., Thomson A.** (1983) Reverse phase ion pairs separation of nucleotides and related products in fish muscle. *Journal of high resolution chromatography*, 10391-10392.
- Nagashima Y., Munehiko T., Taguchi T.** Evaluation of yellowfin tuna freshness by physicochemical properties of the eye fluid. *Journal of tokio university of fisheries*, **77**, 153-159.
- Naguib K., Ayesh A.M., Shalaby A.R.** (1995) Studies on the determination of biogenic amines in foods. Development of a TLC method for the determination of eight biogenic amines in fish. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 134-139.
- Nguyen A., Luong J., Masson C.** (1990) determination of nucleotides in fish tissues using capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **62**, 2490-2493.
- Notevarp O.** (1961) Recent finding in fatty acid composition of marine oils. *Ed. Acad. Press. New York*, **1**, 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.
- Olafsdottir G., Martinsdottir E, Jonsson E.** (1997) Rapid gas sensor measurements to determine spoilage of capelin. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2654-2659.
- Olafsdottir G., Fleurence J.** (1997) Evaluation of fish freshness. *Proceeding of the final meeting of the concerted action*, 55-69.

- Overton S., Manura J.** (1995) Analysis of volatile organics in cooking oils by thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1314-1320.
- Pearson C., Mc Connell G.** (1975) Chlorinated C1 and C2 hydrocarbons in the marine environment. *Proc. R. Soc. Lond.*, **189**, 305-332.
- Pedrosa A., Regenstein J.** (1988) Shelf-life extension of fresh fish- a review – part I – Spoilage of fish. *J. Food Quality*, **11**, 117-127.
- Przyjazny A., Janicki W., Chrzanowski W, Staszewski R.** (1983) *J. Chromatogr.*, **280**, 249-255.
- Raoul S., Gremaud E., Biaudet H, Turesky R.J.** (1997) Rapid SPME method for the detection of volatile nitrosamines in food. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4706-47013.
- Rawles D., Martin R.** (1996) Biogenic amines in fish and shellfish. *Advances food and nutrition research*, **39**, 329-365.
- Rawn J.D.** (1995) *Biochemistry*. Ed De Boek, Paris, 84-98.
- 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.
- Ringo E., Stenberg E., Strom A.** (1984) Amino acid and lactate catabolism in OTMA respiration of *Alteromonas putrefasciens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47(5)**, 1084-1089.
- Rodriguez I., Lee H., Li S.** (1996) Separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr.*, **745**, 255-262.
- Rodriguez-Jerez J.J., Grassi M., Civera T.** (1994) A modification of l-tryptophan enzymic test for histamine quantification. *J. Food Prot.*, **57(11)**, 1019-1021.
- Roig-Sagues A.X., Hernandez-Herrero M., Lopez-Sabater E.I., Rodriguez-Jerez J.J., Mora-Ventura M.** (1996) Histidine decarboxylase activity of bacteria Isolated from raw and ripened Salchichon, a spanish cured sausage. *J. Food. Protect.*, **59(5)**, 516-520.
- Sakaguchi M., Koise A.** (1992) Freshness assessment of fish fillets using the torrimeter and K-values. *Quality assurance in the fish industry*, Elsevier publisher, 333-338.
- Sainclivier M.** (1983) L'industrie alimentaire halieutique : 1er volume le poisson matière première. *Bulletin scientifique et technique de l'ENSA et du centre de recherche de 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.
- Sakakibara H., Yanai T., Yajima I., Hayashi K** (1990) Volatile flavor compounds of some kinds of dried and smoked fish. *Agric. Biol. Chem.*, **54(1)**, 9-16.

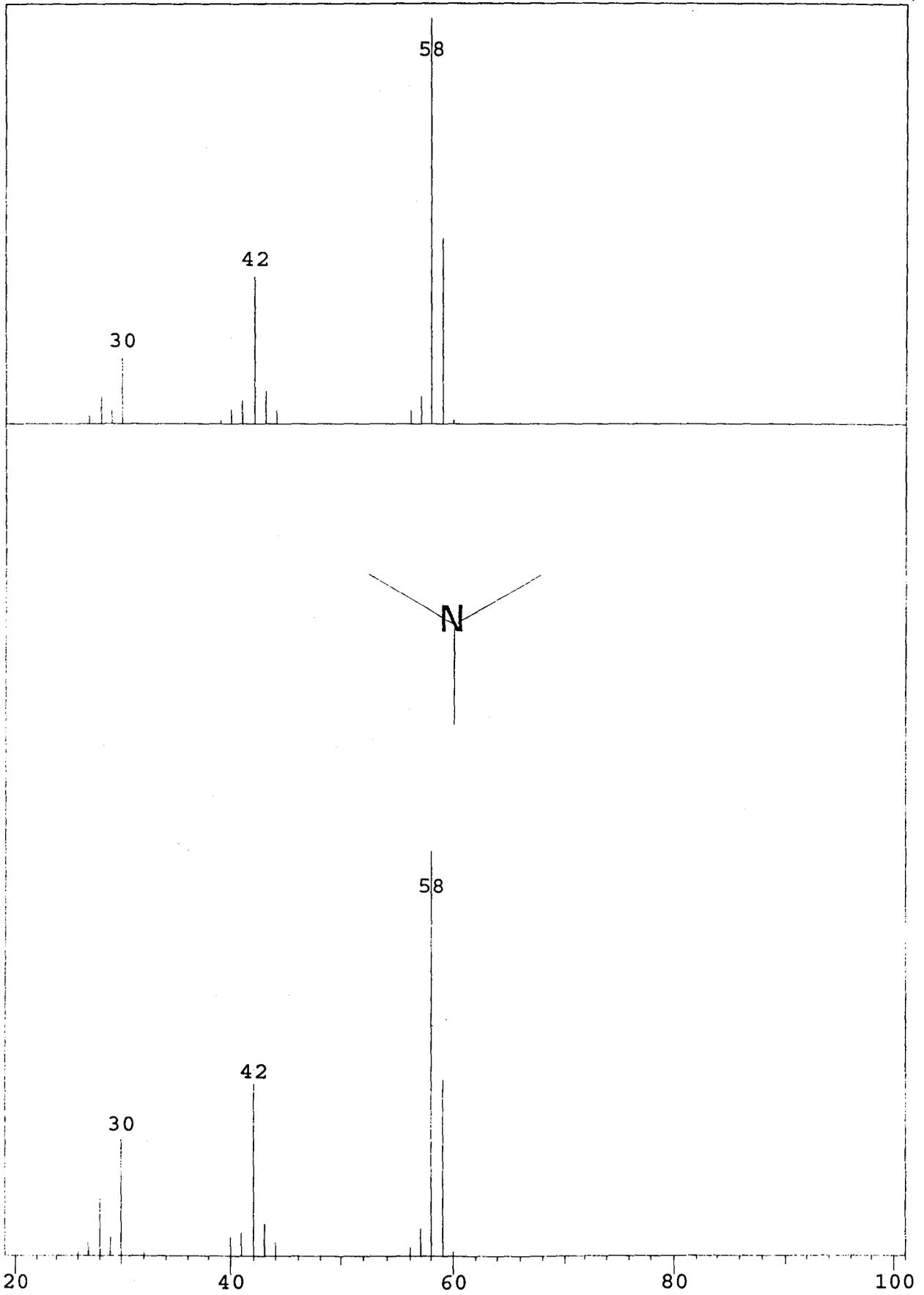
- Seto Y.** (1994) Determination of volatile substances in biological samples by headspace gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **674**, 25-62.
- Scherrer B.** (1984) *Biostatistique*. Ed. Gaëtan Morin , québec, 401-422.
- Shewan J.** (1961) The microbiology of sea water fish. *Fish as food*. Ed academic Press(Londres), **1**, 487-559.
- Shewan J.** (1971) The microbiology of fish and fishery products - a progress report. *J. Appl. Bacteriol.*, **34**, 299-315.
- Shewan J.** (1976) The biochemistry and microbiology of low temperature spoilage. *Food Tech. Australia*, **11**, 409-410.
- Shewan J.** (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.
- Shimakura K., Yamaka H., Shiomi K., Kikuchi T.** (1991) Gas liquid determination of pyrrolidine and piperidine in canned fish products. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, **57**, 1753-1757.
- Shimoda M., Peralta R., Osajima Y.** (1996) Headspace gas analysis of fish sauce. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3601-3605.
- Sikorki Z., Scott D., Buisson D.** (1984) The role of collagen in the quality and processing of fish. *Critical reviews in food science and nutrition*, **20(4)**, 301 - 343.
- Silva J., White T.** (1994) Bacteriological and color changes in modified atmosphere packaged channel catfish. *J. Food Protect.*, **57**, 715-719.
- Simidu W.** (1961) Non protein nitrogenous compounds « fish as food ». Ed. Acad. Press. New york, **1**, 353-384.
- Simmonds C., and Lamprescht E.** (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 M., and Davies P.** (1985) Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiol.*, **78**, 89-91.
- 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**, 1-4.
- 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.
- Staruszkiewicz W.F., Bond J.F.** (1981) Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine, and histamine in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 584-591.

- Stratford M., Watfa R., Murray J., Martin S.** (1990) Determination of collagen and protein turnover by HPLC. *J. Chromatogr.*, **256**, 383-395.
- Swan P.** (1975) The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compound. *J. Sci. Food Agr.*, **26**, 1761-1770.
- Tabor C.W., Tabor H.** (1976) Putrescine, spermidine and spermine. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 285-306.
- Tarin C.** (1999) Commerce extérieur. Produits de la mer, **50**, 4-7.
- Taylor S.I.** (1986) Histamine food poisoning : toxicology and clinical aspect. *Cr. Rev. Toxicol.*, **17**, 91-128.
- Tourret A.** (1989) Technique de conditionnement et augmentation de la durée de conservation d'un produit alimentaire. Thèse université de Reims Champagne-ardenne.
- Tressl R., Grunewald K., Silwar R., Bahri D.** (1979) Chemical formation of flavor substances. Applied Science, London.
- Triqui R., Reineccius G.** (1995) Change in flavour profiles with ripening of anchovy. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1883-1889.
- Triqui R., Reineccius G.** (1995) Flavor development in the ripening of anchovy. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 453-458.
- Tsuchiya T.** (1961) Biochemistry of fish oils. Ed. Acad. Press. New york, **1**, 211-258.
- Tsukioka T, Ozawa H., Murakami T.** (1993) GC-MS determination of lower aliphatic amines in environmental samples. *J. Chromatogr.*, **642**, 395-400.
- Valle M., Malle P., Bouquelet S.** (1996) Liquid chromatographic determination of fish decomposition indexes from analyses of plaice, whiting and herring. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **79(5)**, 1134-1140.
- Valle M., Malle P., Bouquelet S.** (1997) Optimization of a liquid chromatographic method for determination of amines in fish. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **80(1)**, 49-56.
- Valle M, Eb P., Taillez R., Malle P.** (1998) Optimization of the enumeration of total aerobic bacterail flora in the flesh of seafish. *J. Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **6**, 29-42.
- Veciana Nogues M., Hernandez-Jover T., Marine Font A., Vidal Carou M.** (1995) Liquid chromatography method for determination of biogenic amines and fish product. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **78(4)**, 1045-1050.
- Veciana Nogues M., Marine Font A., Vidal Carou M.** (1997) Biogenic amines as hygienic quality indicator of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amine and organoleptic change *J. Food Sci.*, **55**, 1192-1195.
- Vidal Carou M., Veciana Nogues M.** (1990) Spectrofluorometric determination of histamine in fish and meat products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73(4)**, 565-567.
- Walters M.** (1984) determination of histamine in fish by HPLC. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67(6)**, 1040-1043.

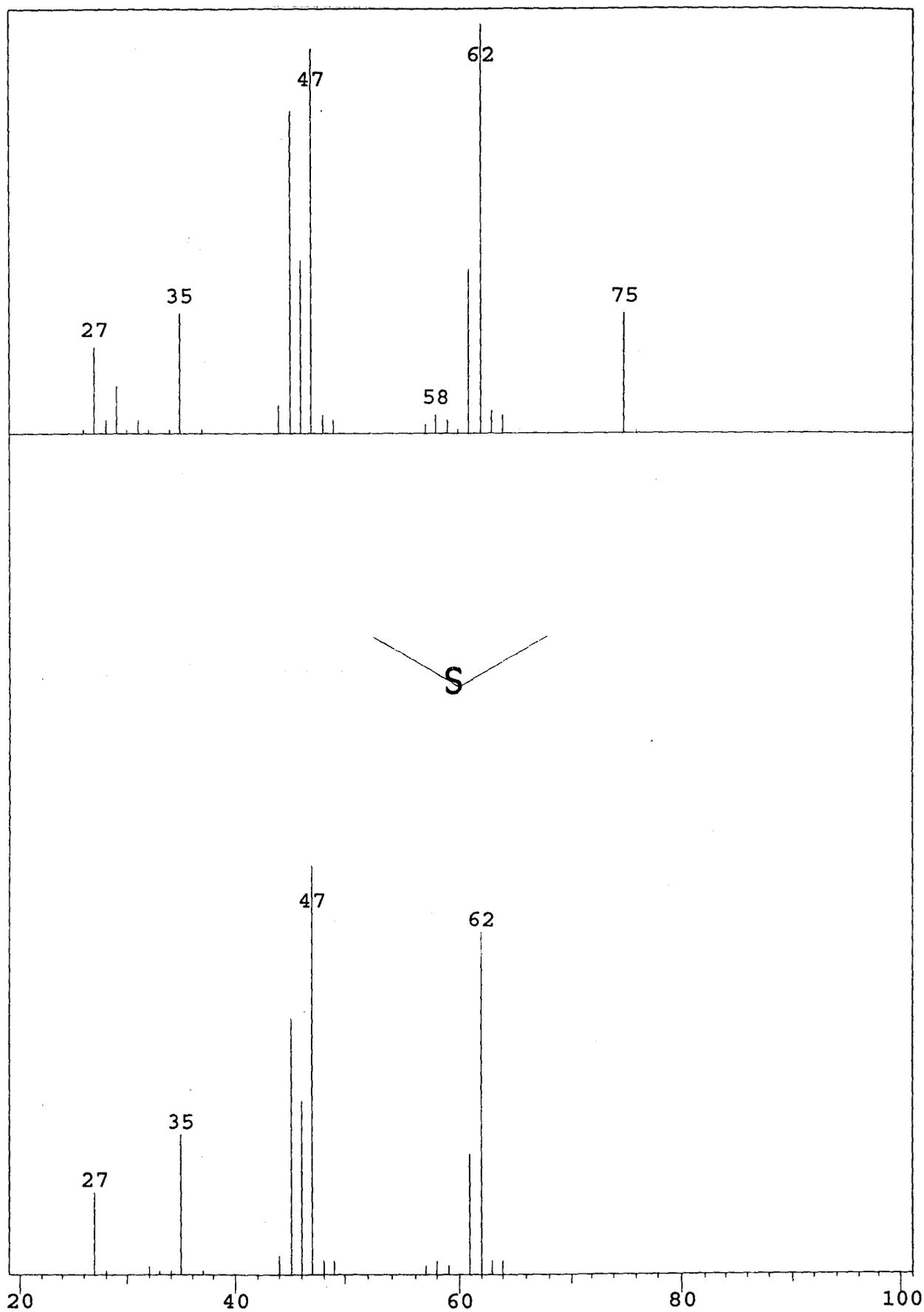
- Wang Y., Enriquez-Ibarra L., Bonilla M., McNair H., Flick G.** (1994) Analysis of biogenic amine in finfish. A progress report. Virginia tech, Blackburg, VA.
- Wendakoon C.N., Sakaguchi M.** (1992) Effect of spices on growth and biogenic amines formation by bacteria in fish muscle. Quality assurance in the fish industry, **30**, 305-313.
- Whitefield F., Timdale C.** (1984) The role of microbial metabolites in food off-flavours. Food technol. Australia, **36**, 204-213.
- Whitefield F., Helidoniotis F., Shaw K., Svoronos D.** (1997) Distribution of bromophenols in australian Wild-harvested and cultivated prawns. J. Agric. Food Chem., **45**, 4398-4405.
- Widder S., Grosh W., Sen A.** (1991) Changes un the flavour of butter oil during storage. Z. Lebensm.-Unters. Forsh., **193**, 32-35.
- Widder S., Grosh W.** (1994) Study on the cardboard off-flavour formed in butter oil. Z. Lebensm.-Unters. Forsh., **198**, 297-301.
- Widder S., Grosh W.** (1997) Precursors of 2-nonenals causing the cardboard off-flavour formed in butter oil. Nahurung, **41**, 42-45.
- Williams D., Poole S., Petroff M.** (1991) Inosine and Hypoxanthine formation in tropical fish and its use in fish species differentiation. Food Austr., **43**, 500-503.
- Yamaka H., Shimakura K., Shiomi K., Kikuchi T., Iida H., Nakamura K.** (1987) Concentration of polyamines in frshwater fishes. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish, **53**, 2041-2045.
- Yamaguchi K., Lavety J., Love R.** (1976) The connective tissue of fish. J. Food Techn., **11**, 389-394.
- Ye R., Averill B., and Tiedje J.** (1994) Denitrification : production and consumption of nitric oxide. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 1053-1058.
- Ye R., Ka J., Krishnapillai V., Zimmermann A., Baird C., Tiedje J.** (1995) Anaerobic activation of entire denitification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an Analog of Fnr. J. Bacteriol., **177**, 3606-3609.
- Young K., Wittle K.** (1985) Colour measurement of fish minces using L, a , b values. J. Sci. Food Agric., **36**, 383-392.
- Zhang Z., Pawliszyn J.** (1995) Quantitative extraction using an internally cooled SPME. J. Agric. Food Chem., **67**, 34-43.
- Zhang Z., Pawliszyn J.** (1996) Sampling volatile volatile organic compounds using a modified SPME device. J. High Res. Chromatogr., **19**, 67-80.
- Zuggaramurdi A.** (1976) A model to explain observed behavior on fish salting. J. Food Sci., **45**, 1305-1311.
- Zunft W.** (1993) The biological role of nitric oxide in bacteria. Arch. Microbiol., **160**, 253-264.

ANNEXES

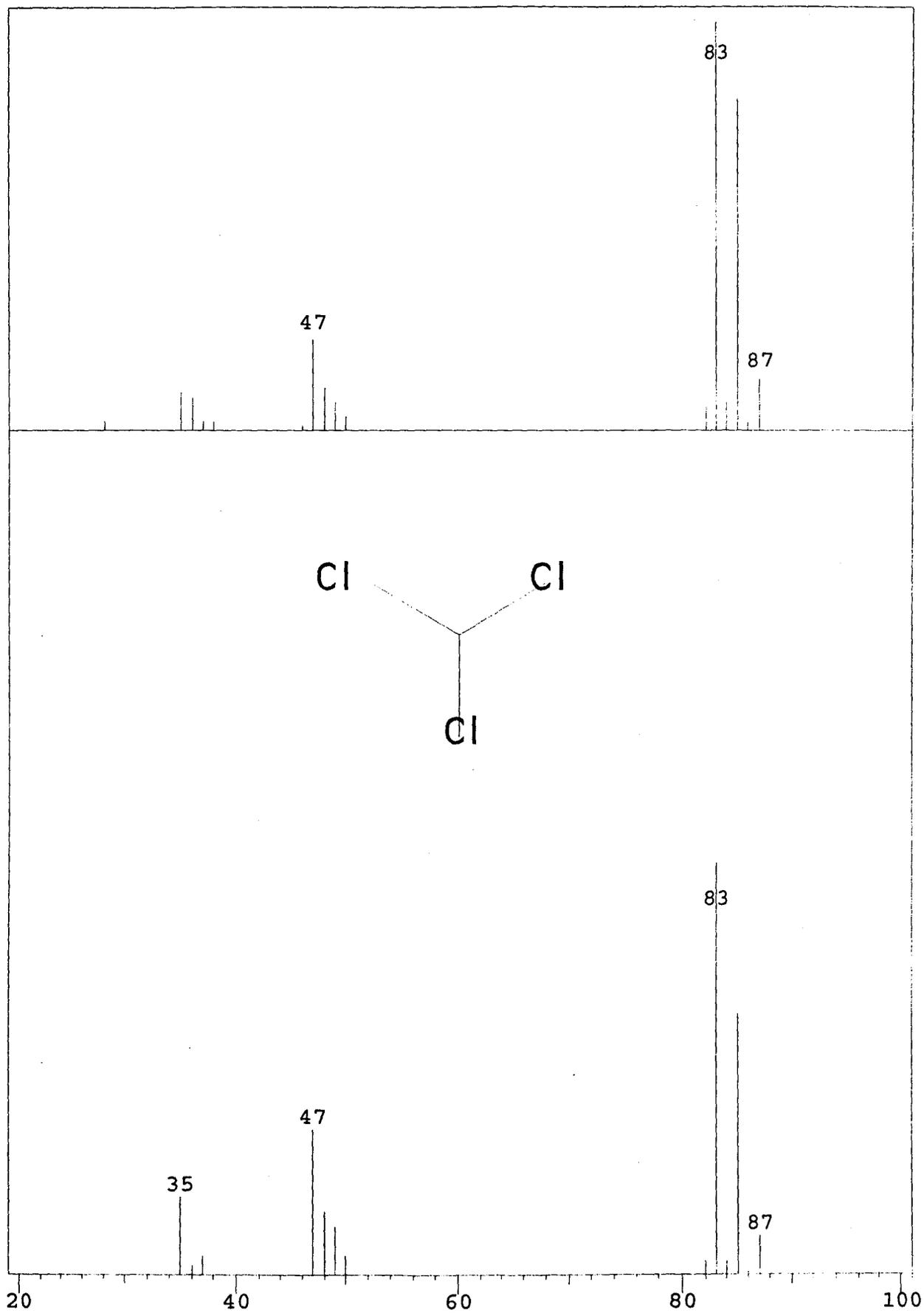
ANNEXE 1: TRIMETHYLAMINE



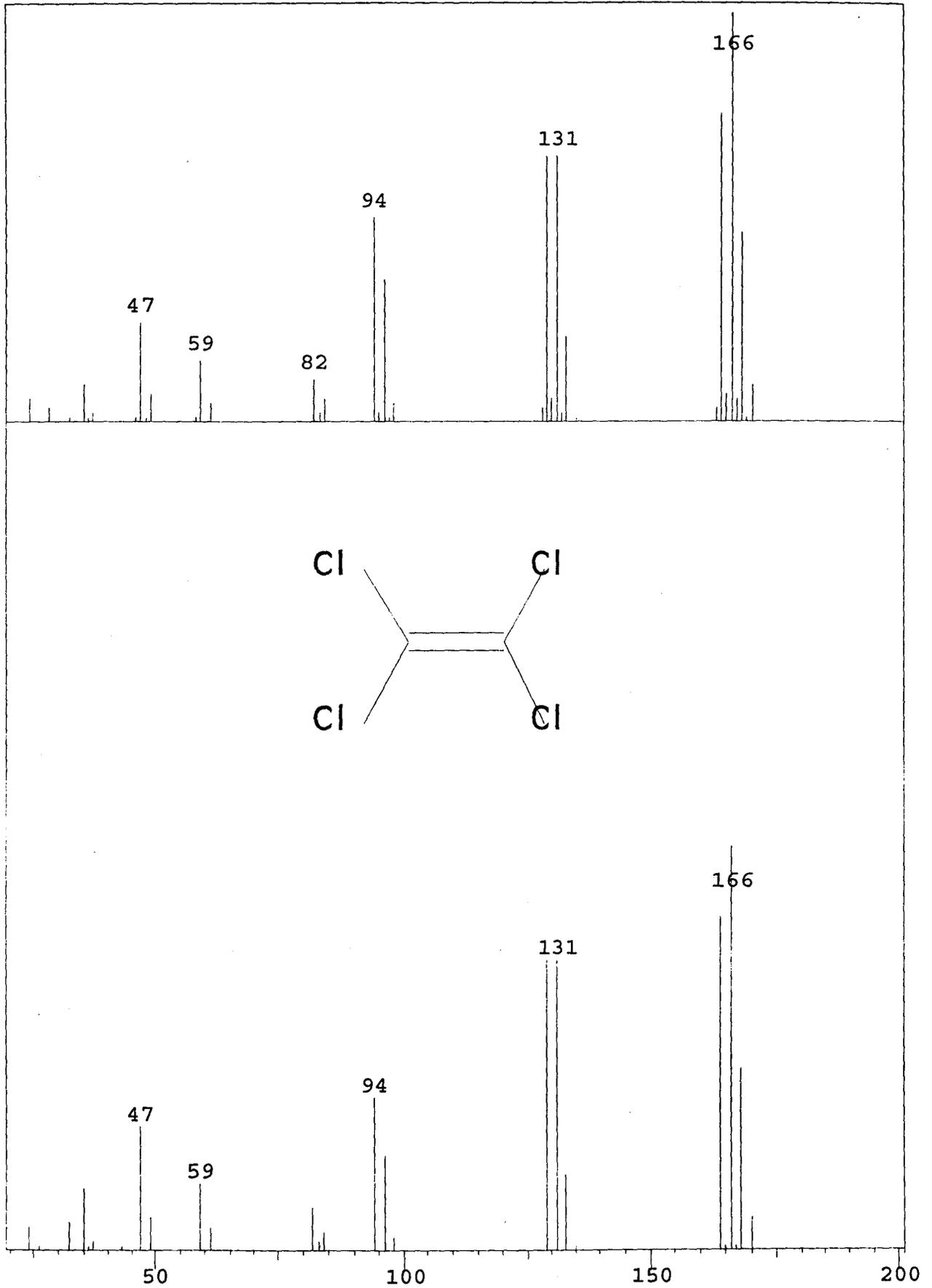
ANNEXE 2 : DIMETHYLSULFIDE



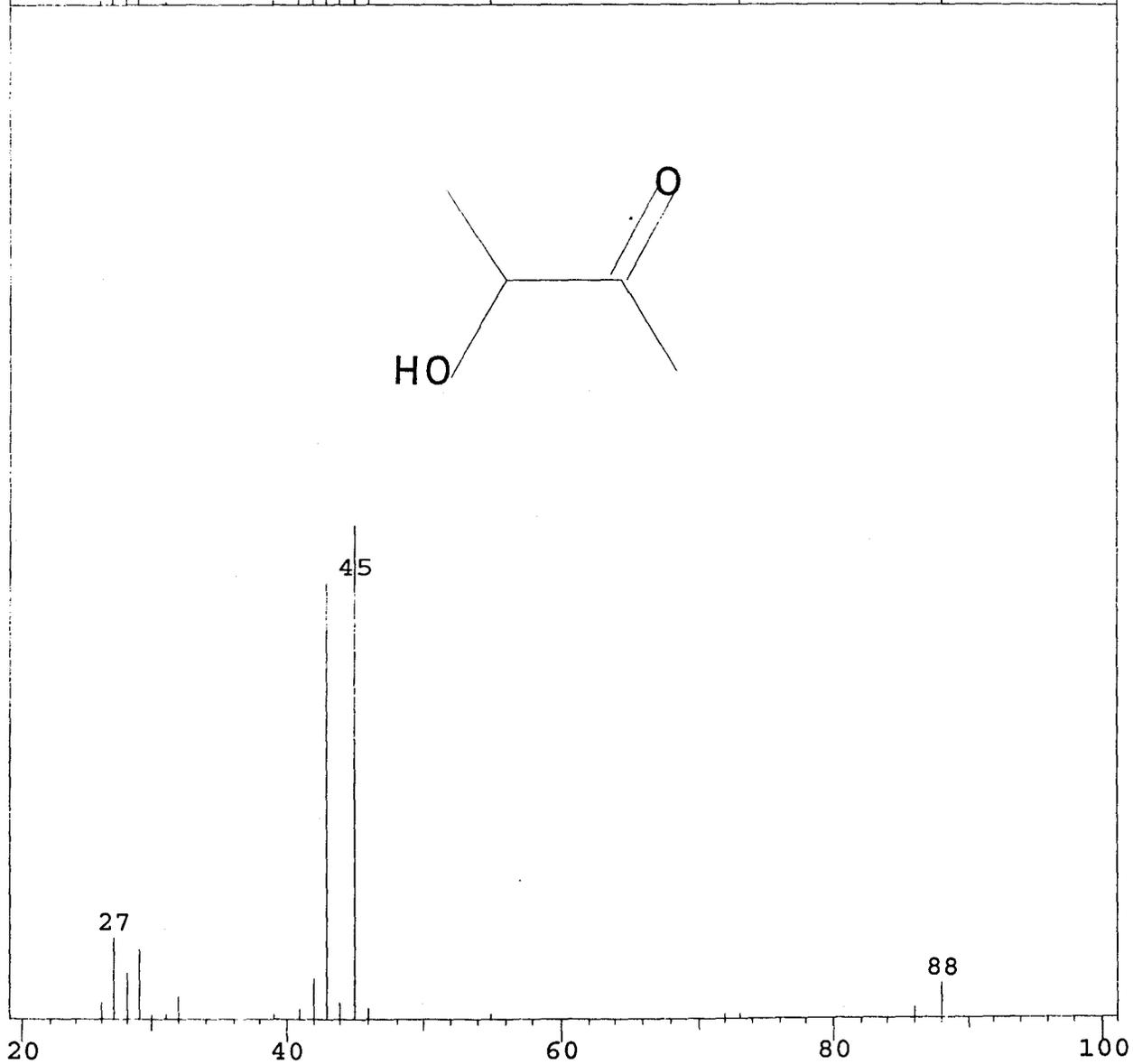
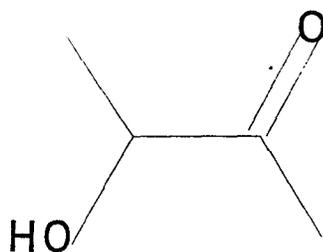
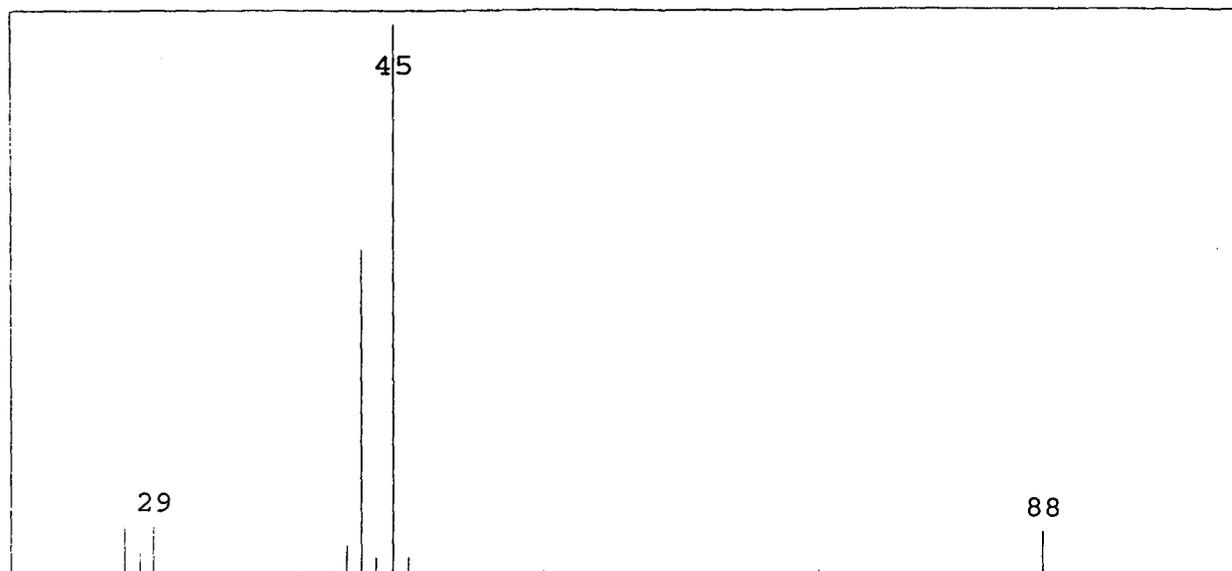
ANNEXE 3 : CHLOROFORME



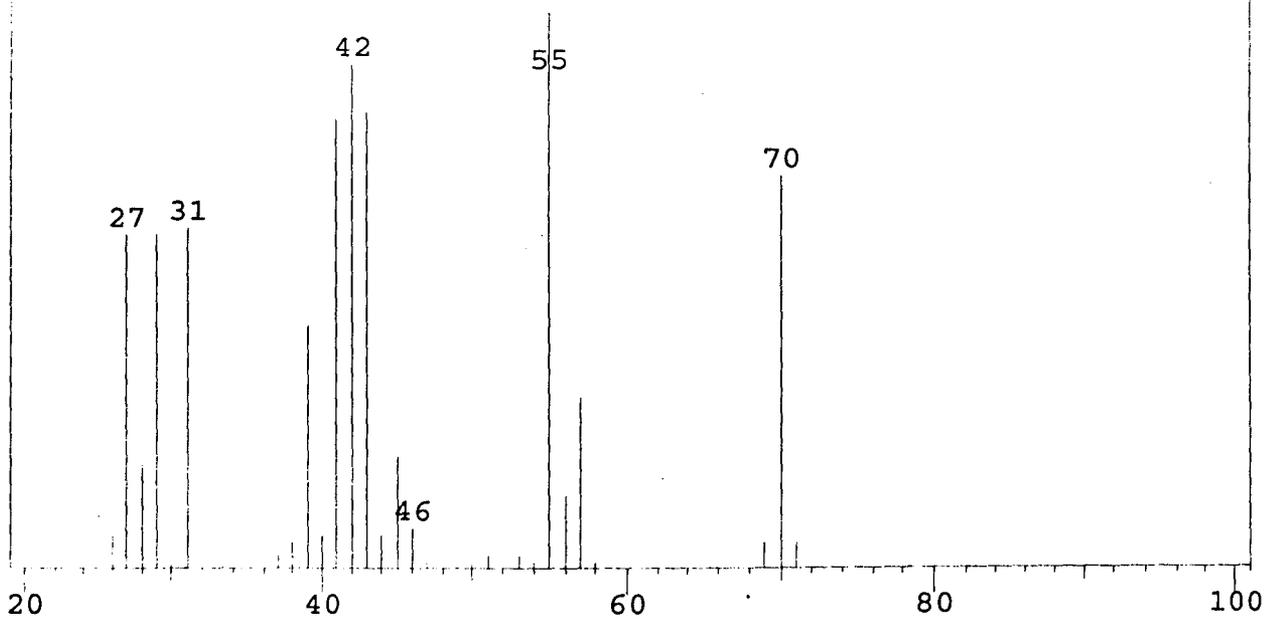
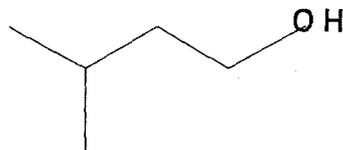
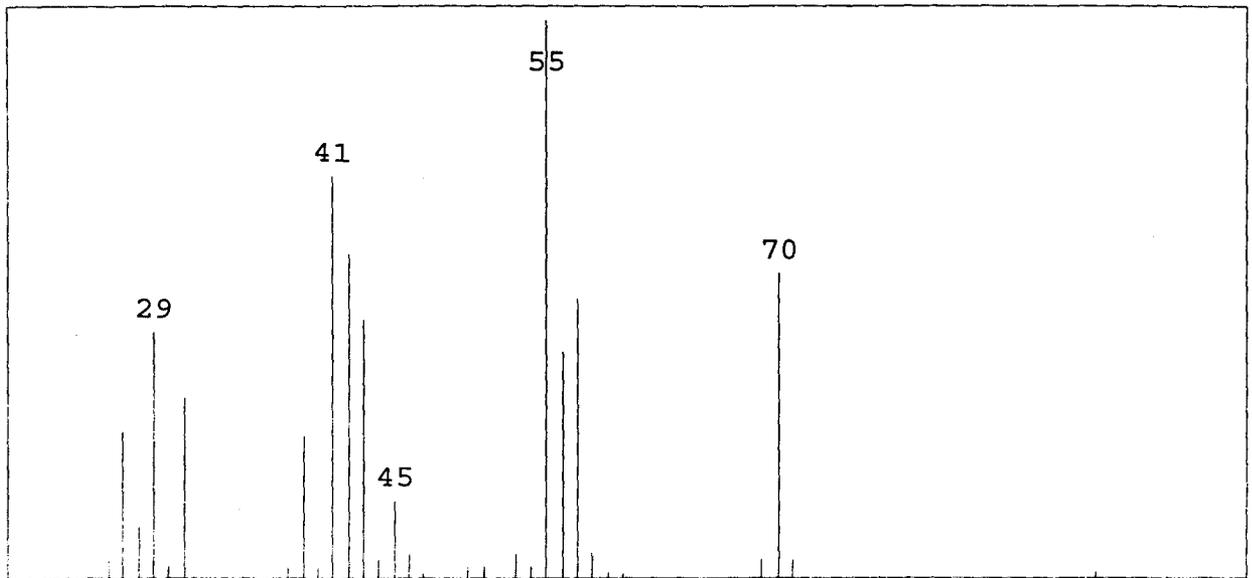
ANNEXE 4: TETRACHOROETHYLENE



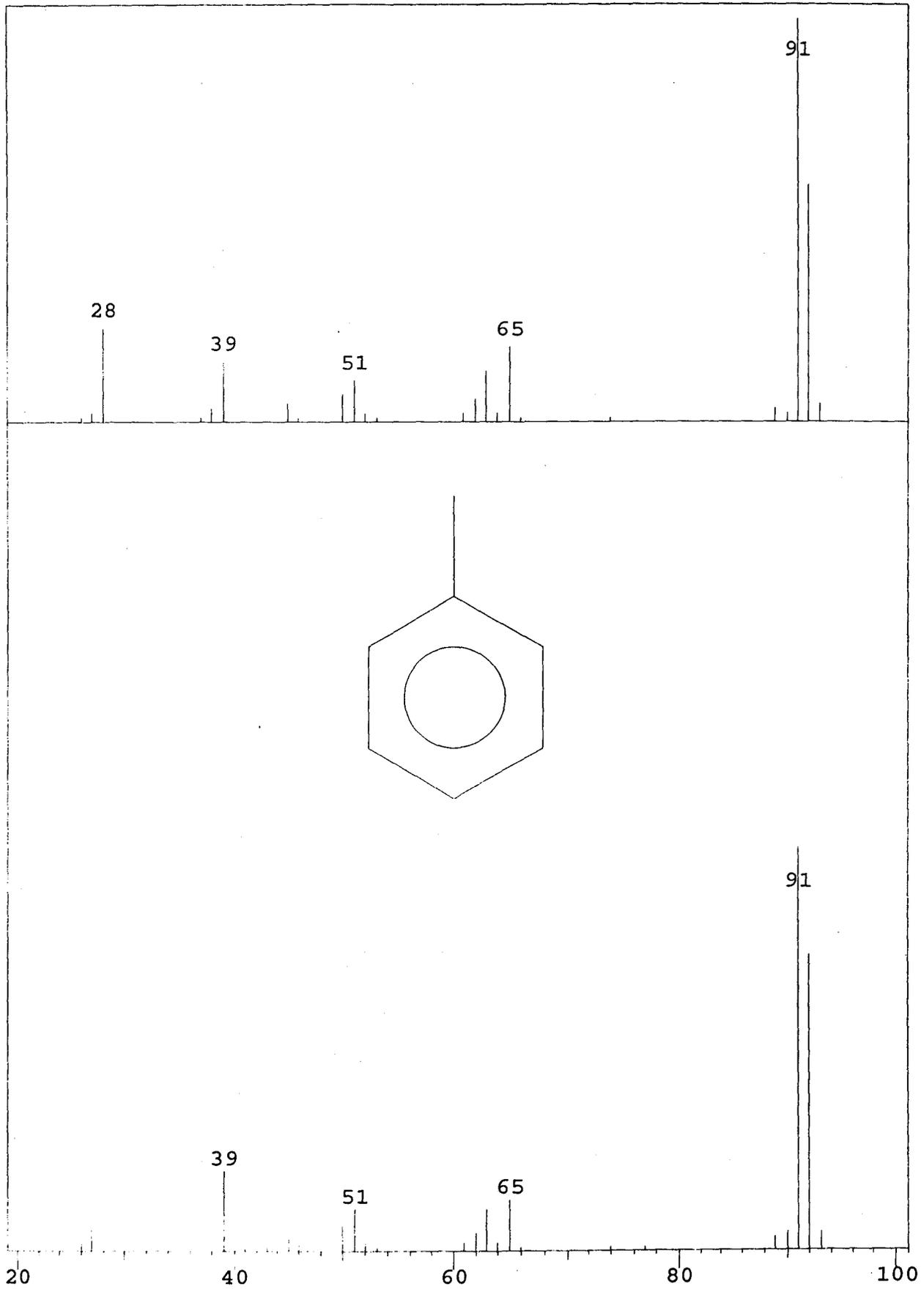
ANNEXE 5 : 3-OH-BUTANONE



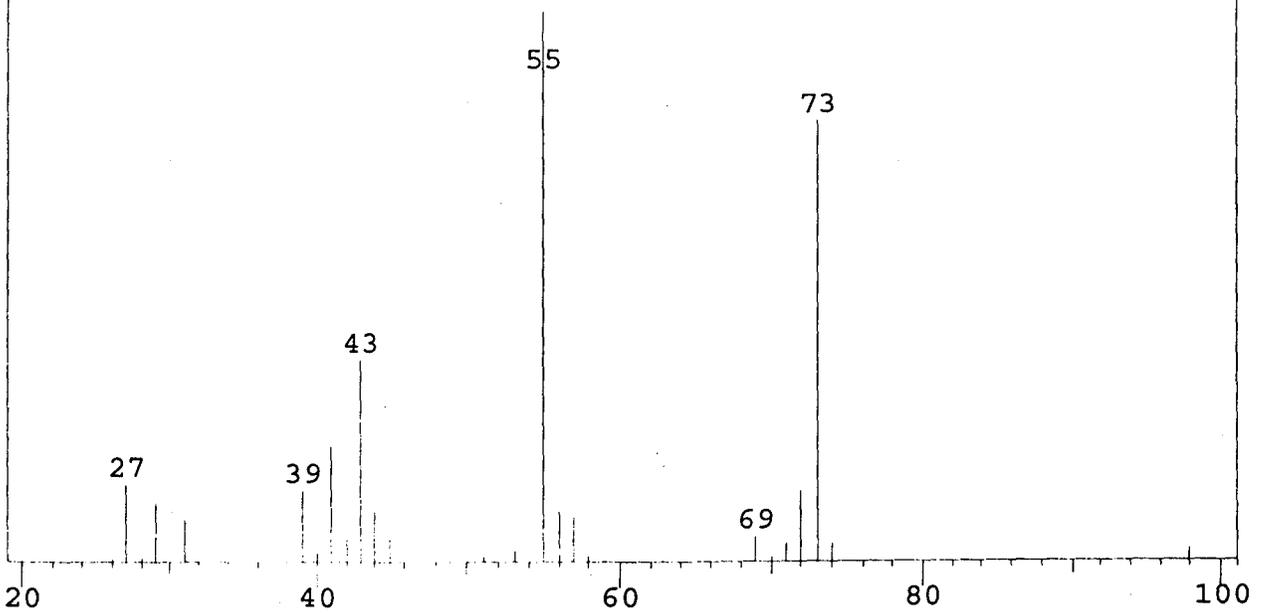
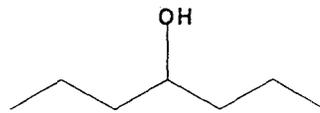
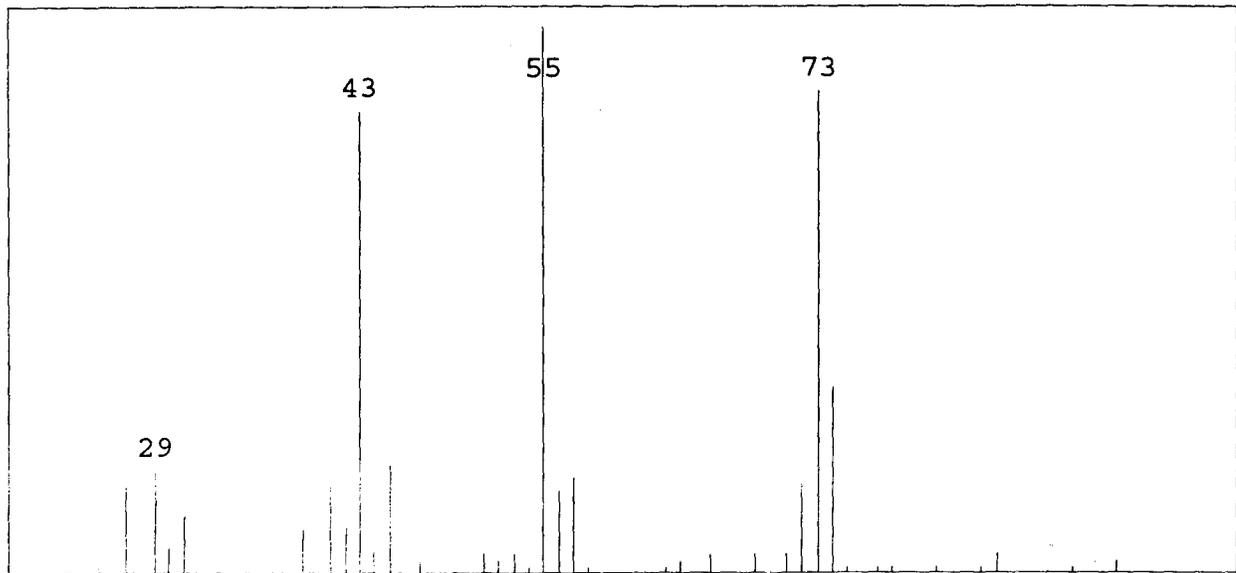
ANNEXE 6 : 3-METHYL-BUTANOL



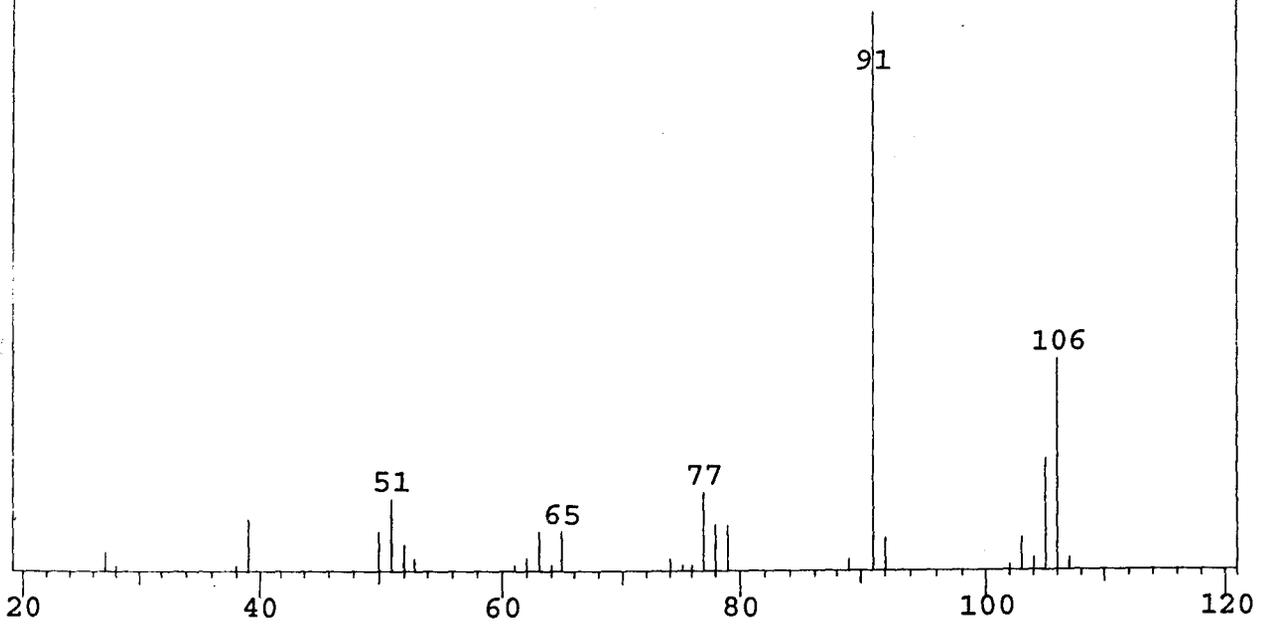
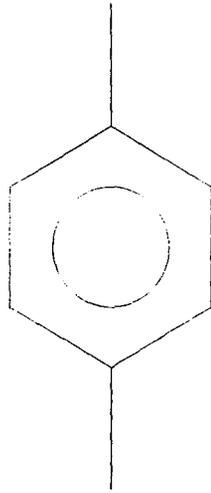
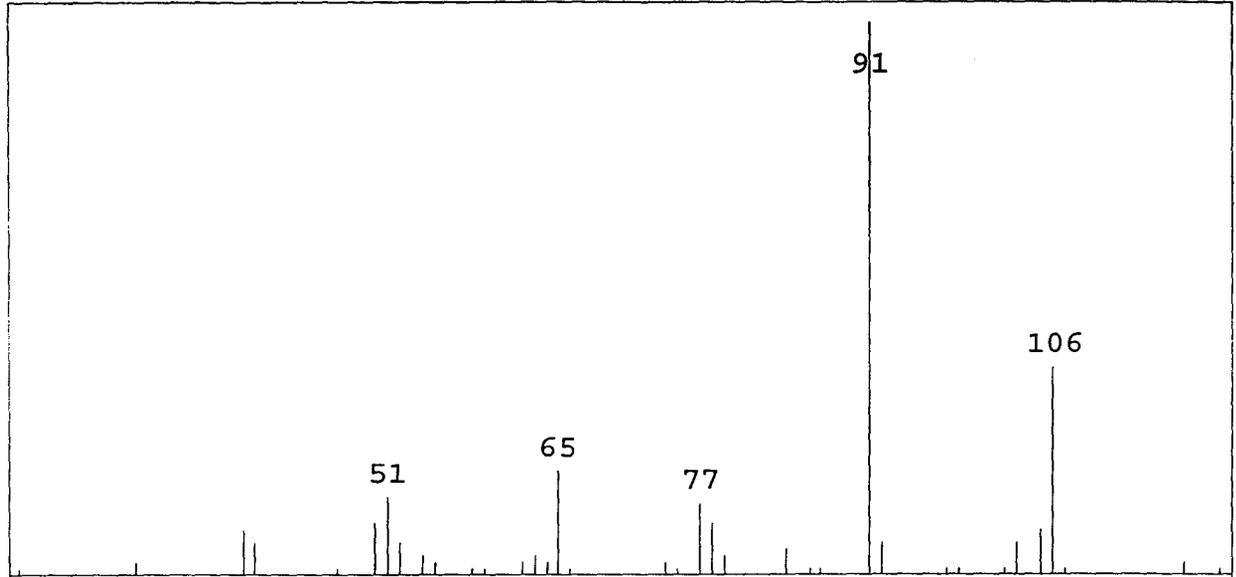
ANNEXE 7: TOLUENE



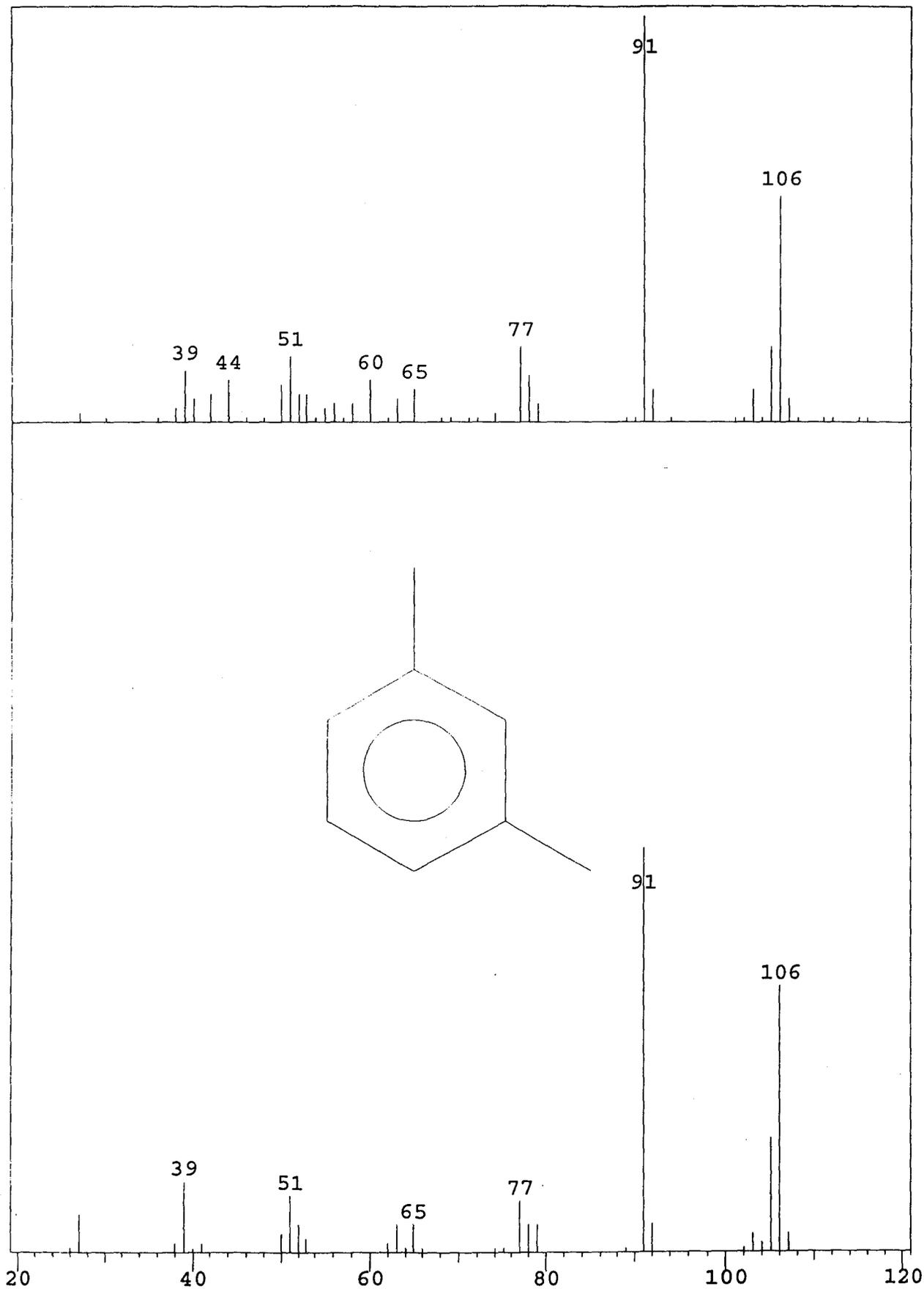
ANNEXE 8 : 4-HEPTANOL



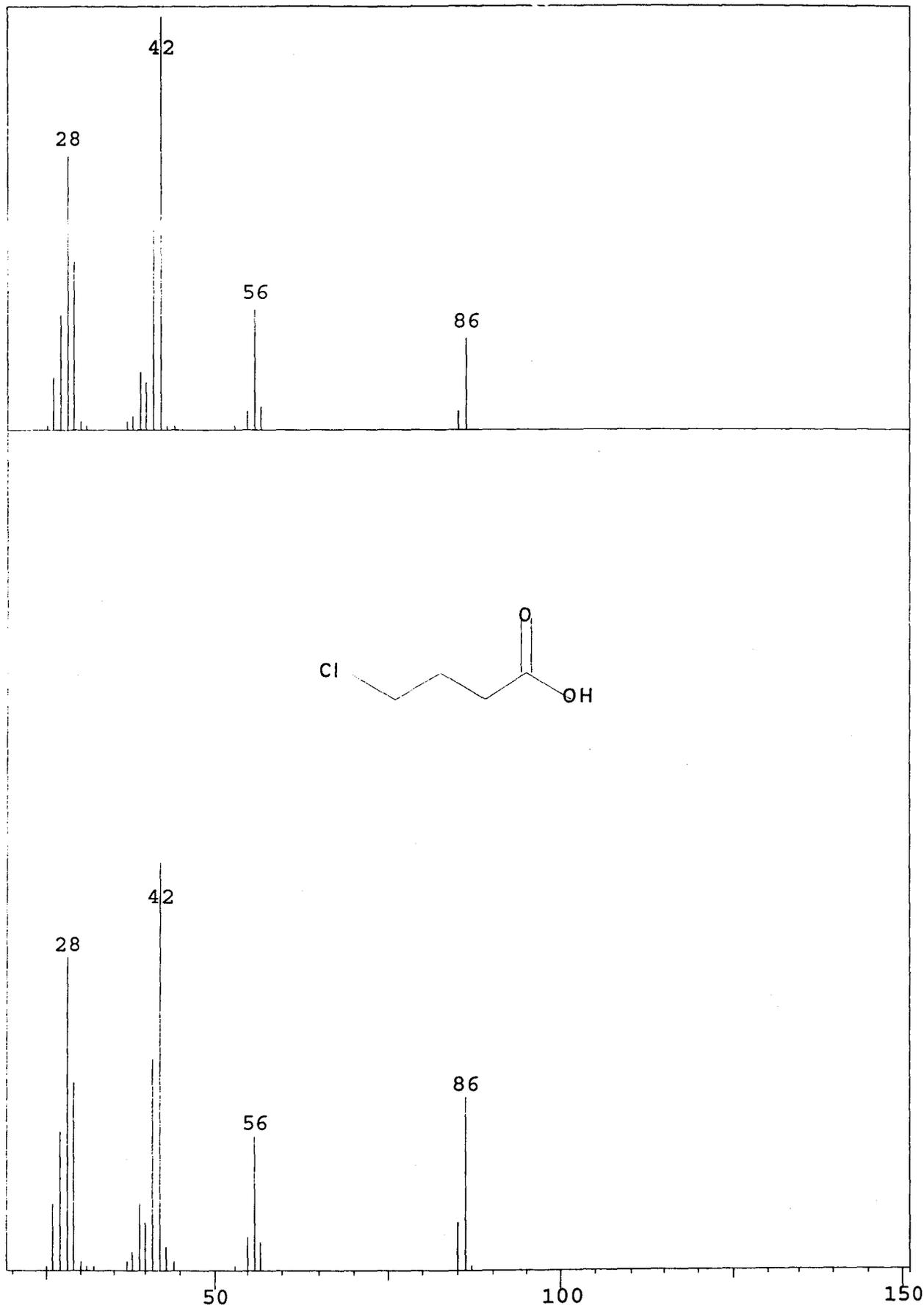
ANNEXE 9: P-XYLENE



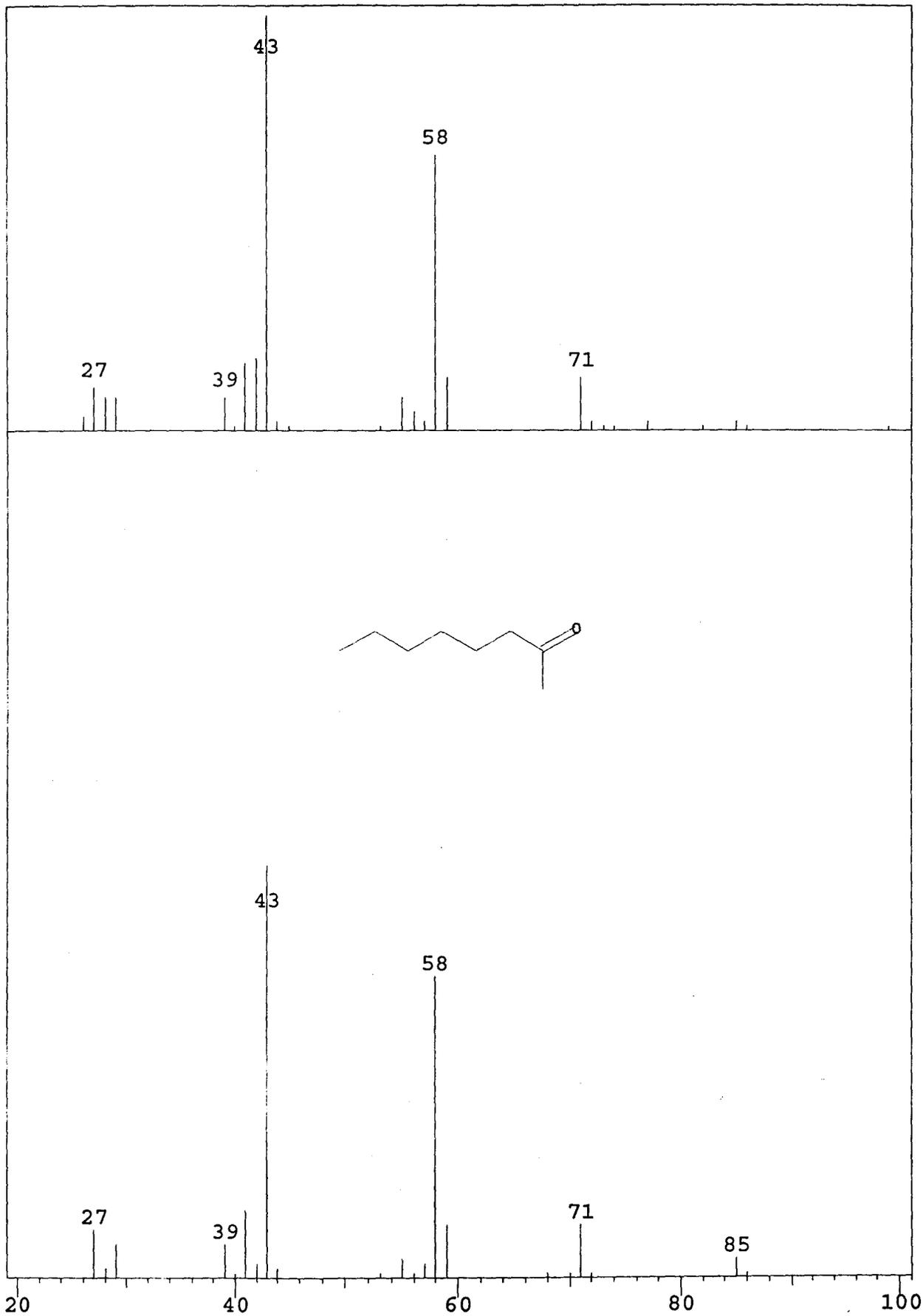
ANNEXE 10 : 1,3-DIMETHYLBENZENE



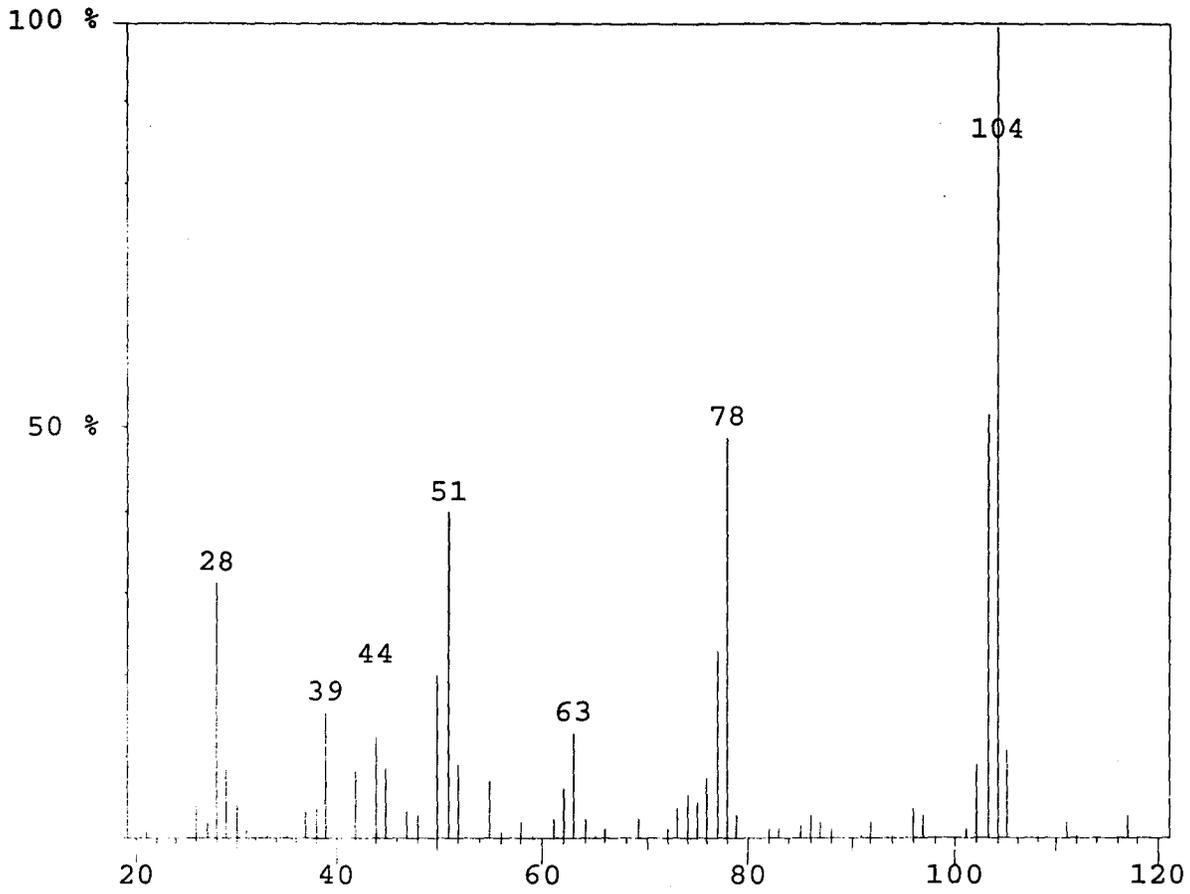
ANNEXE 11 : ACIDE 4-CHLORO-BUTANOÏQUE



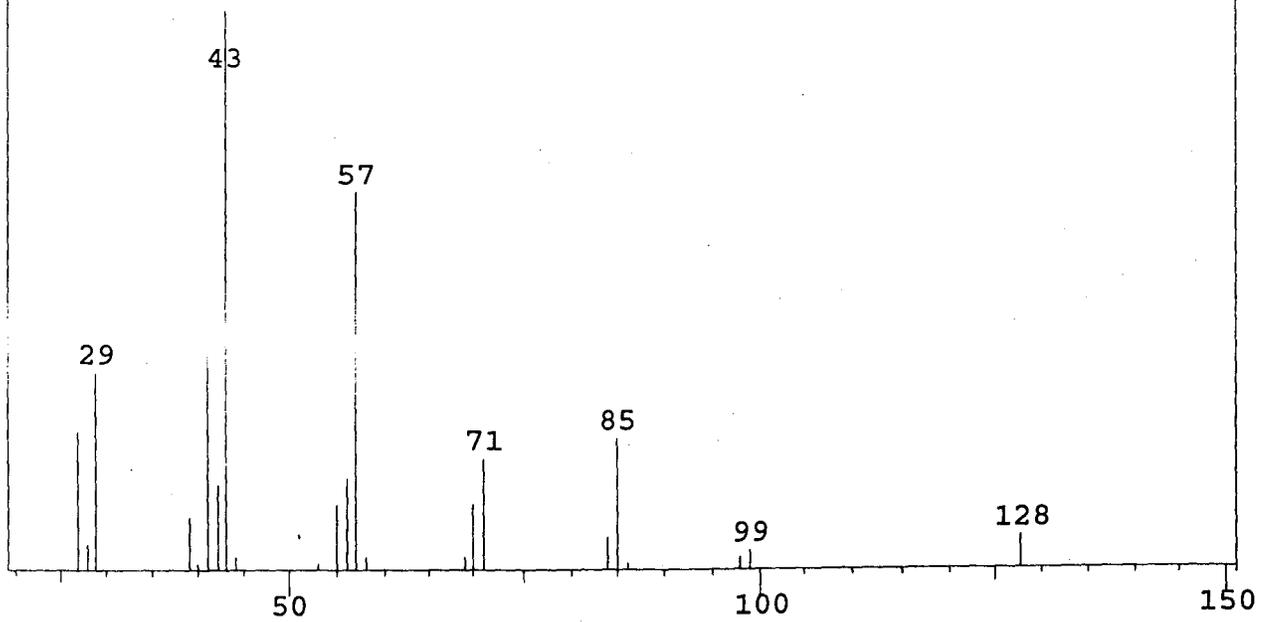
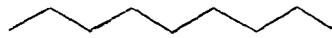
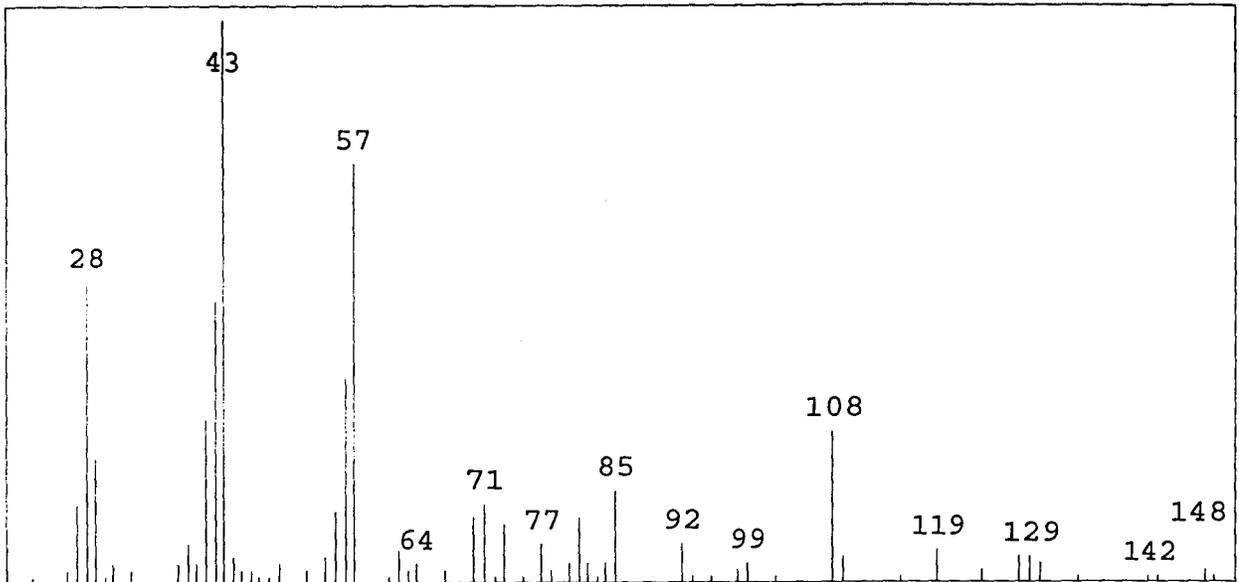
ANNEXE 12 : 2-OCTANONE



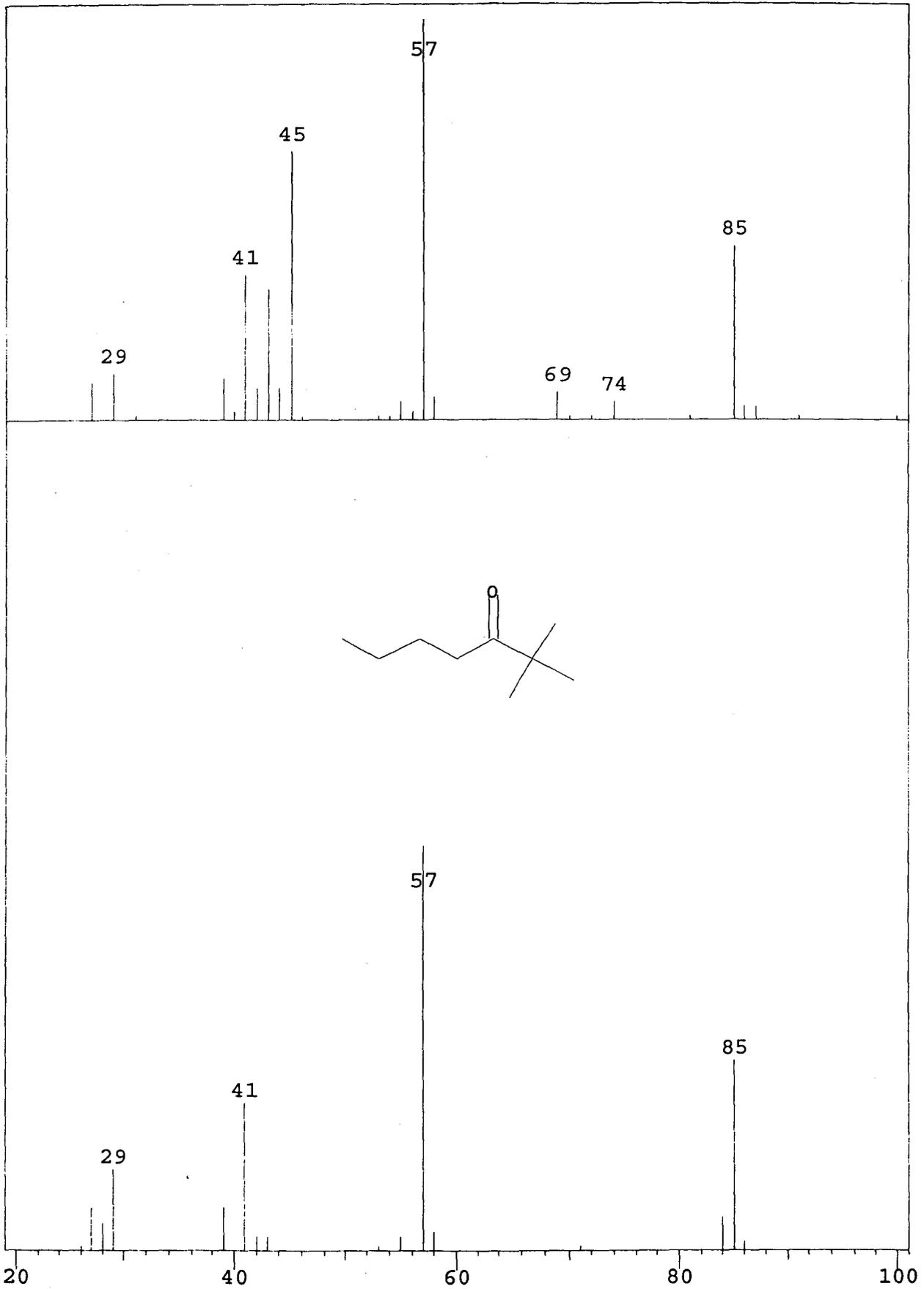
ANNEXE 13 : pic 10



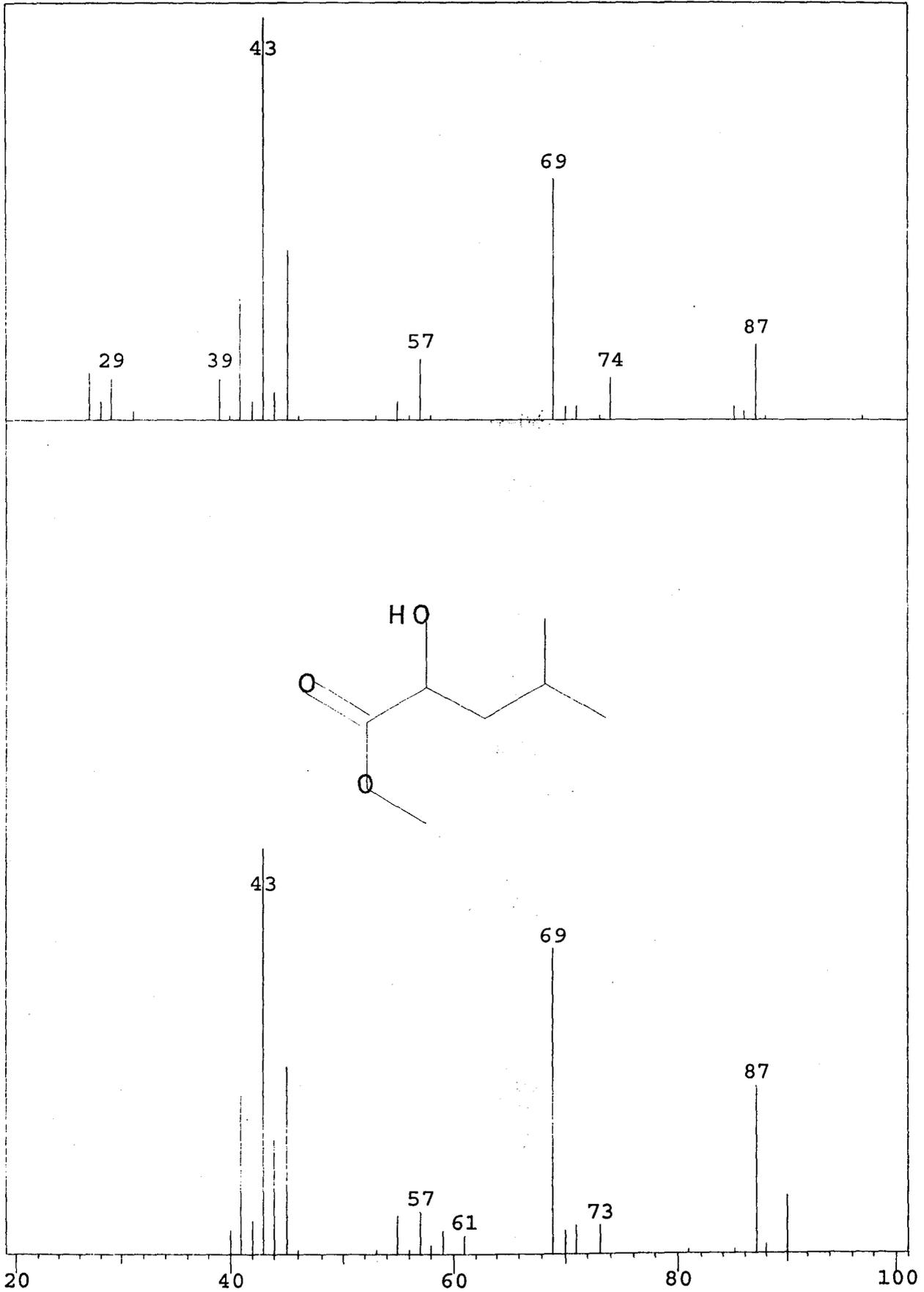
ANNEXE 14: NONANE



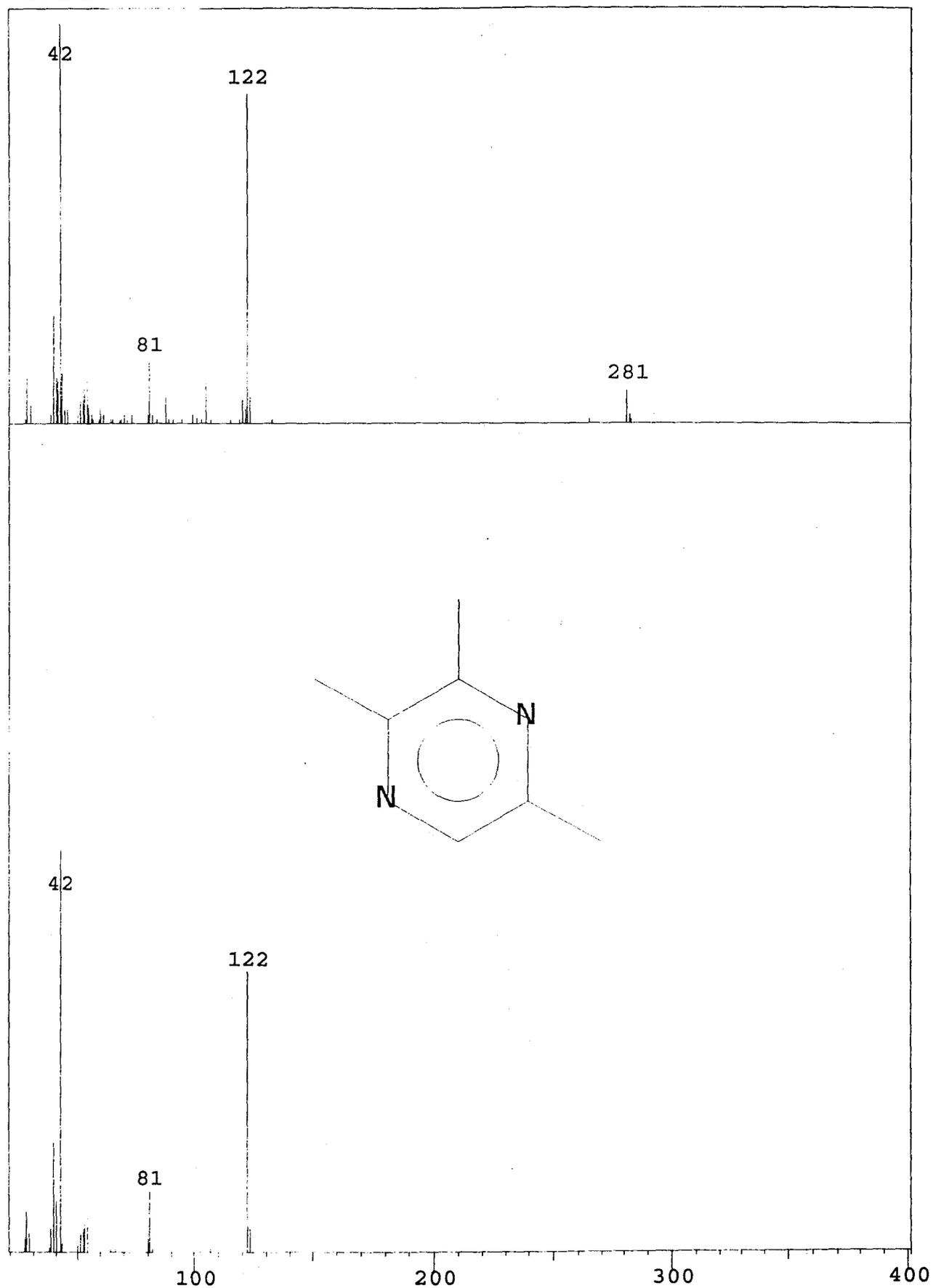
ANNEXE 15 : 2,2-DIMETHYLHEPTANONE



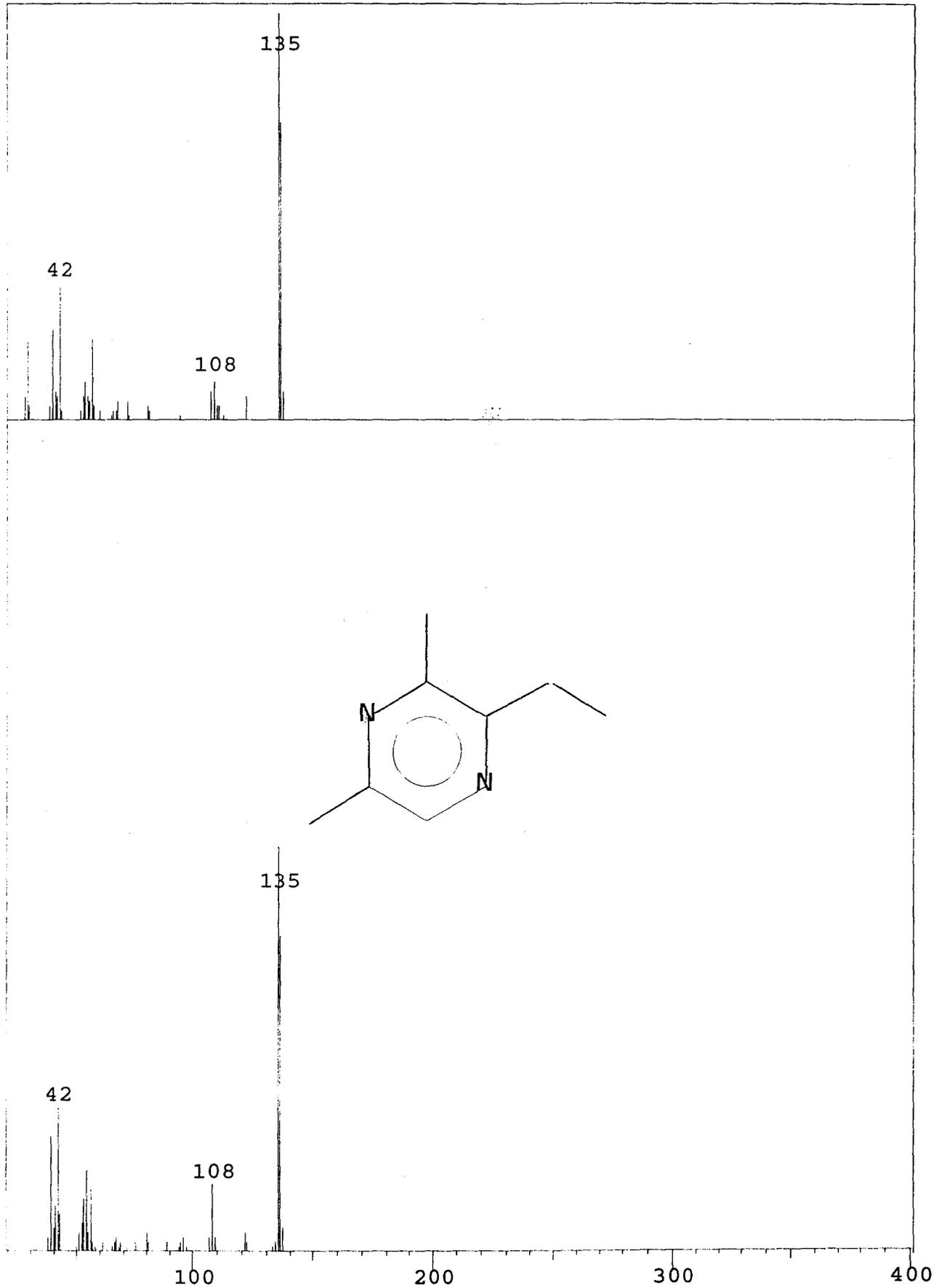
ANNEXE 16 : ACIDE PENTANOÏQUE METHYLESTER



ANNEXE 17 : TRIMETHYLPYRAZINE



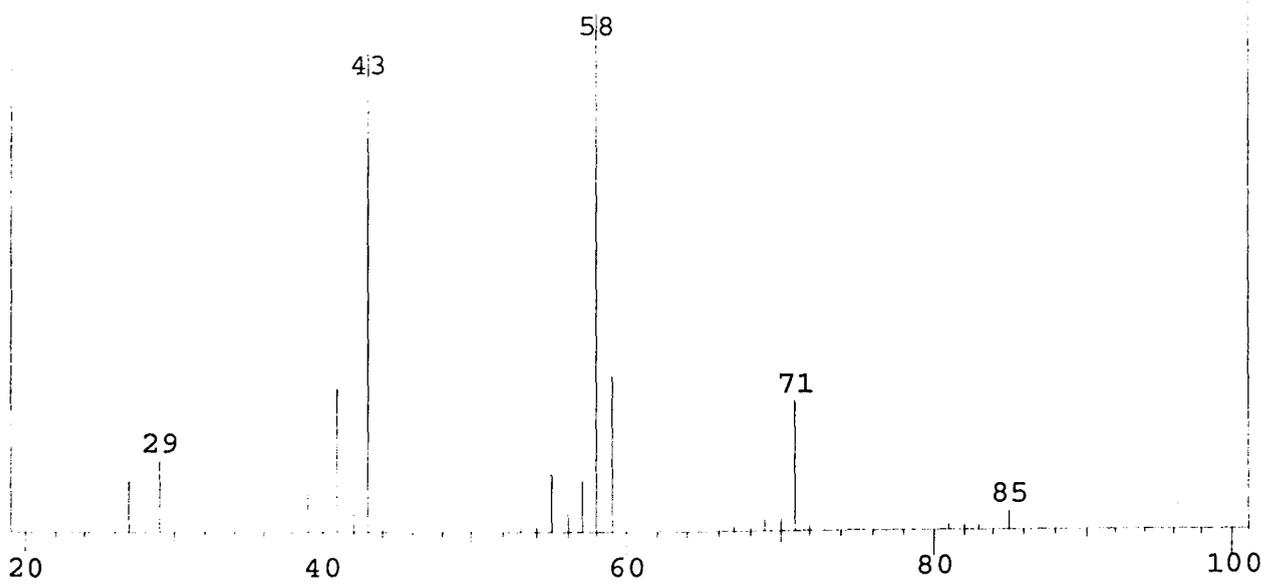
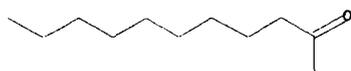
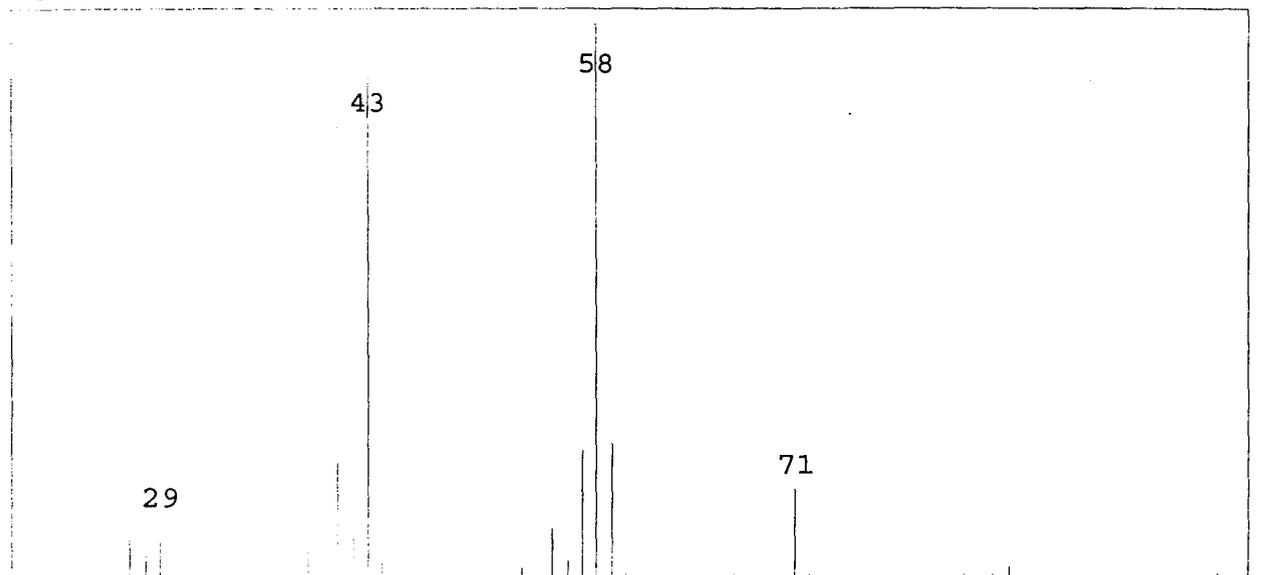
ANNEXE 18 : 2-ETHYL-3,5-DIMETHYLPYRAZINE



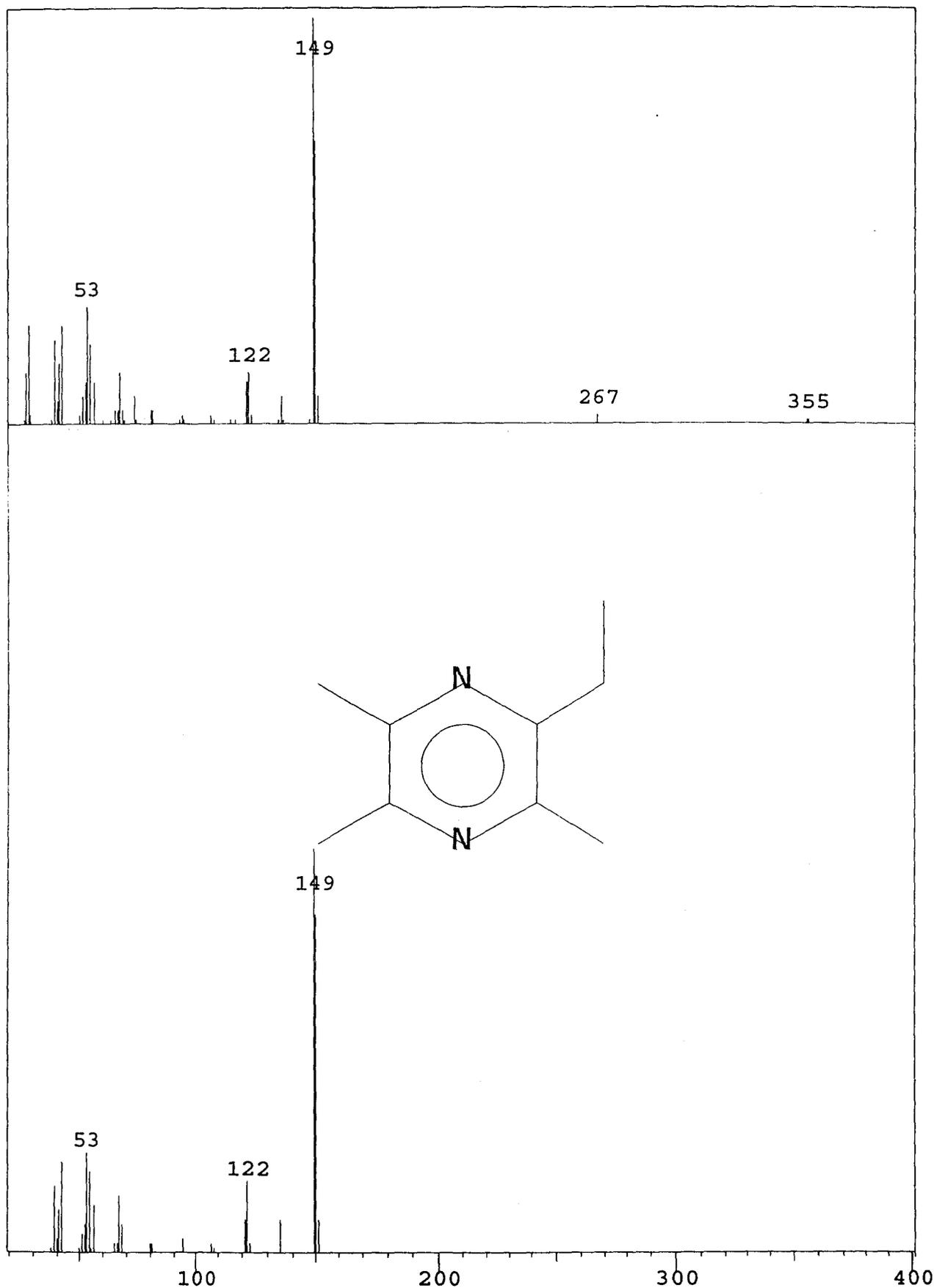
ANNEXE 19 : TETRAMETHYLPYRAZINE



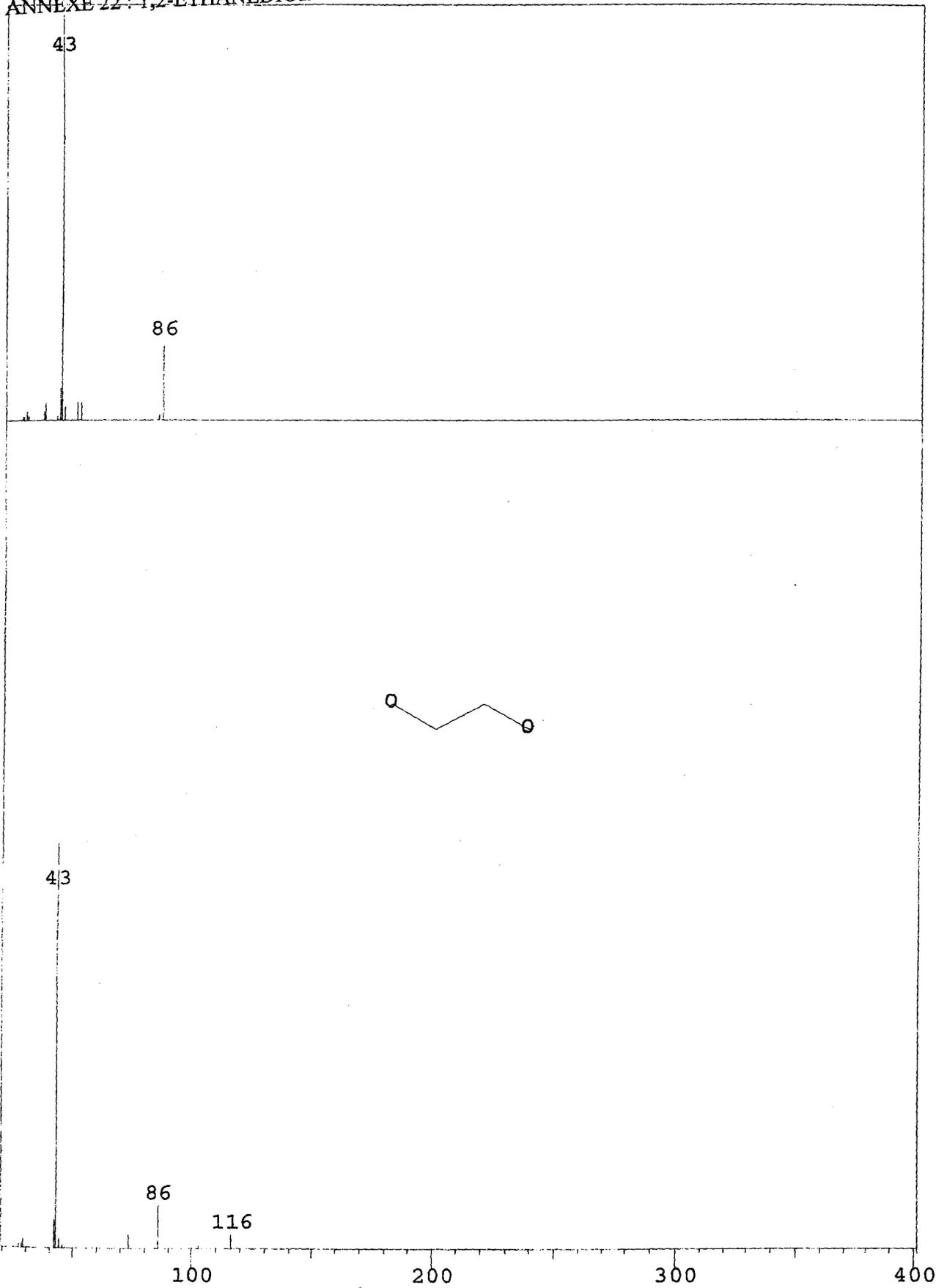
ANNEXE 20 : 2-UNDECANONE



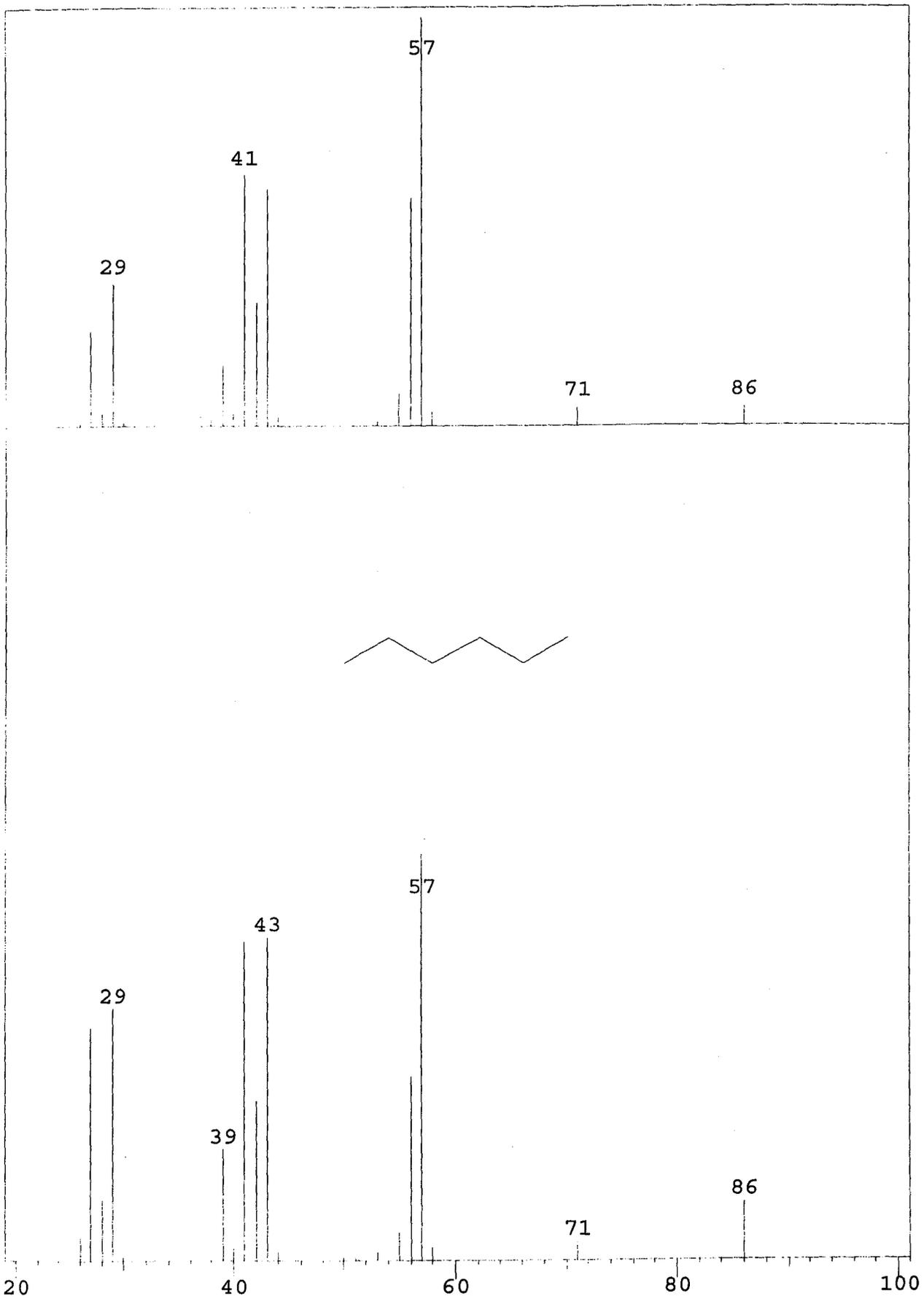
ANNEXE 21 : TRIMETHYL-6-ETHYLPYRAZINE



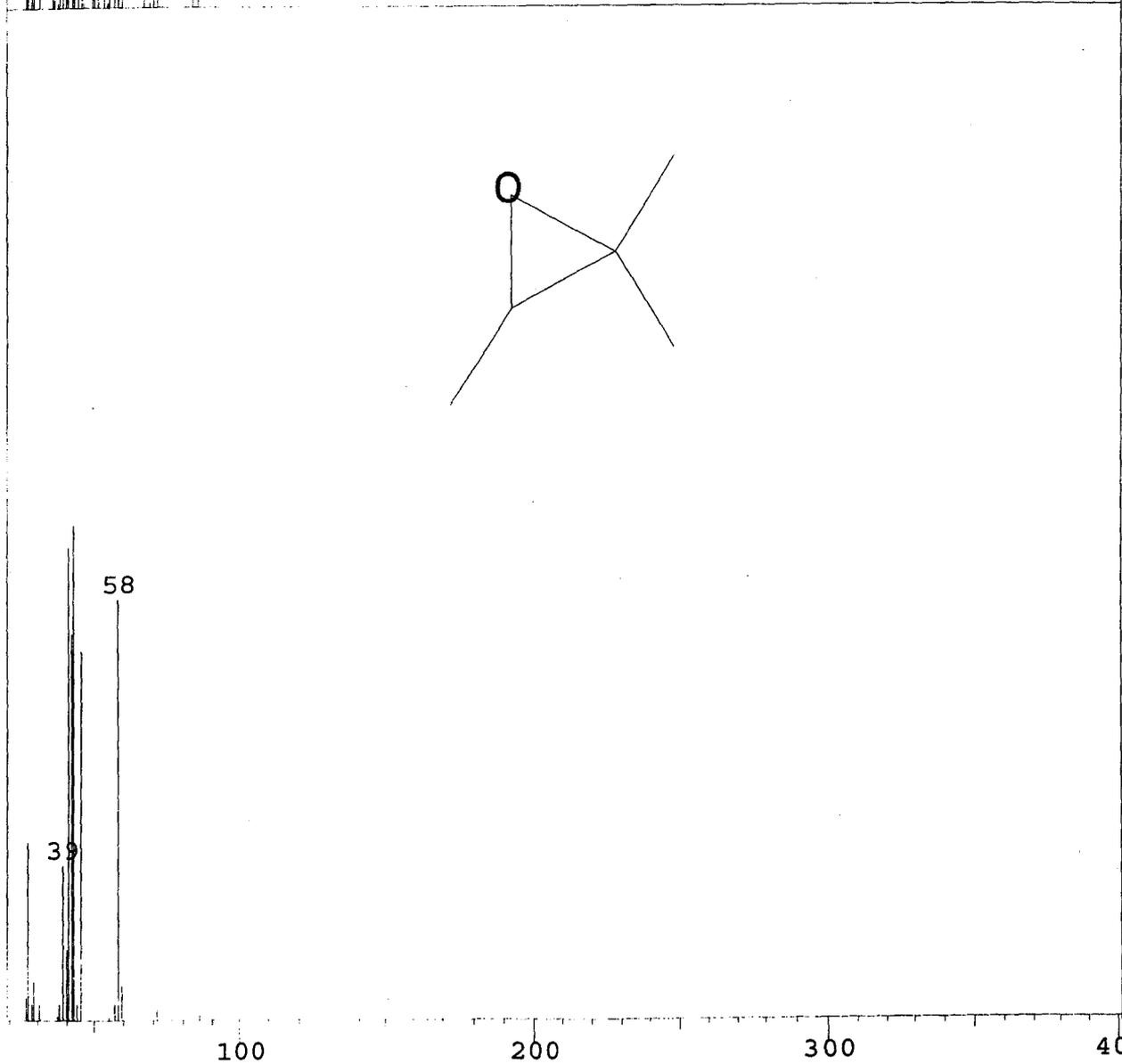
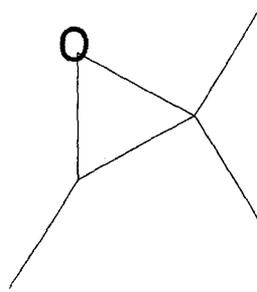
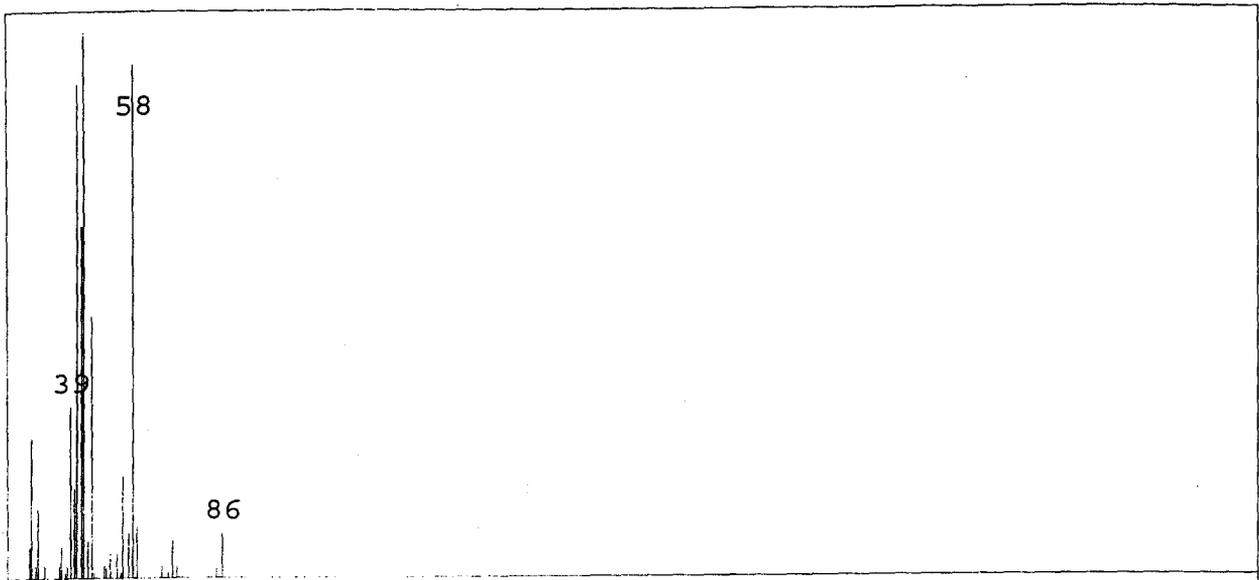
ANNEXE 22 : 1,2-ETHANEDIOL



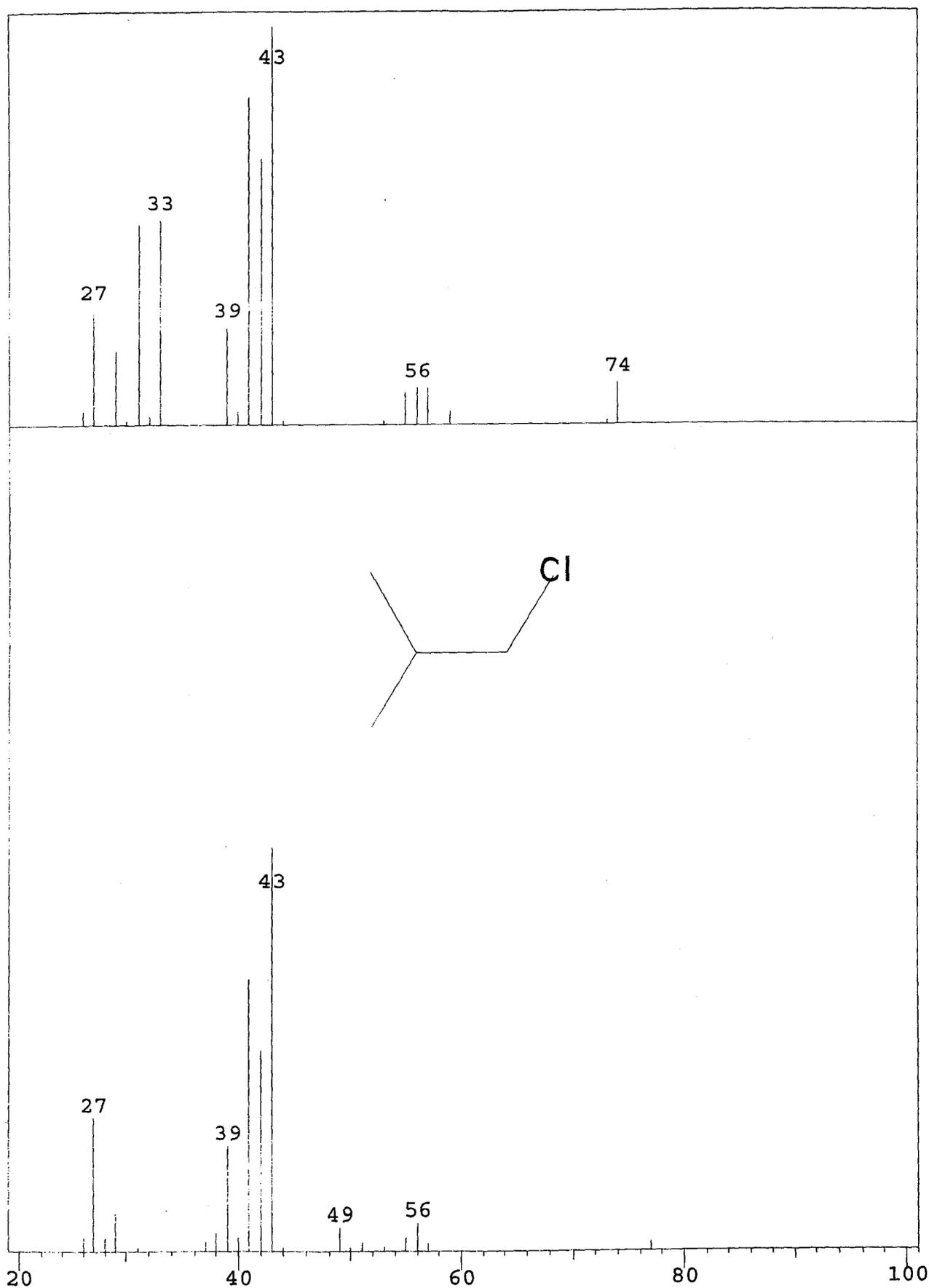
ANNEXE 23 : HEXANE



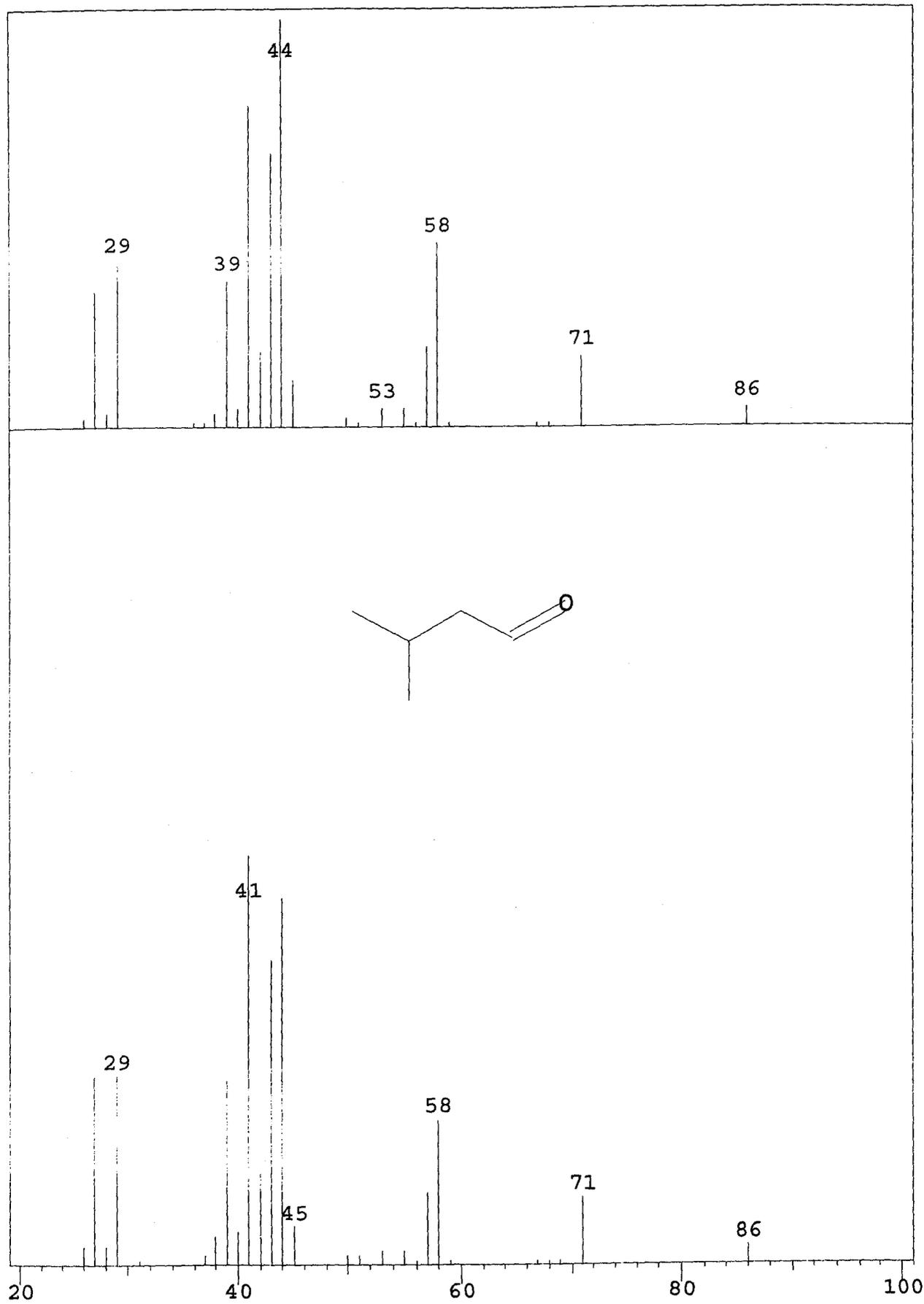
ANNEXE 24 : TRIMETHYLOXIRANE



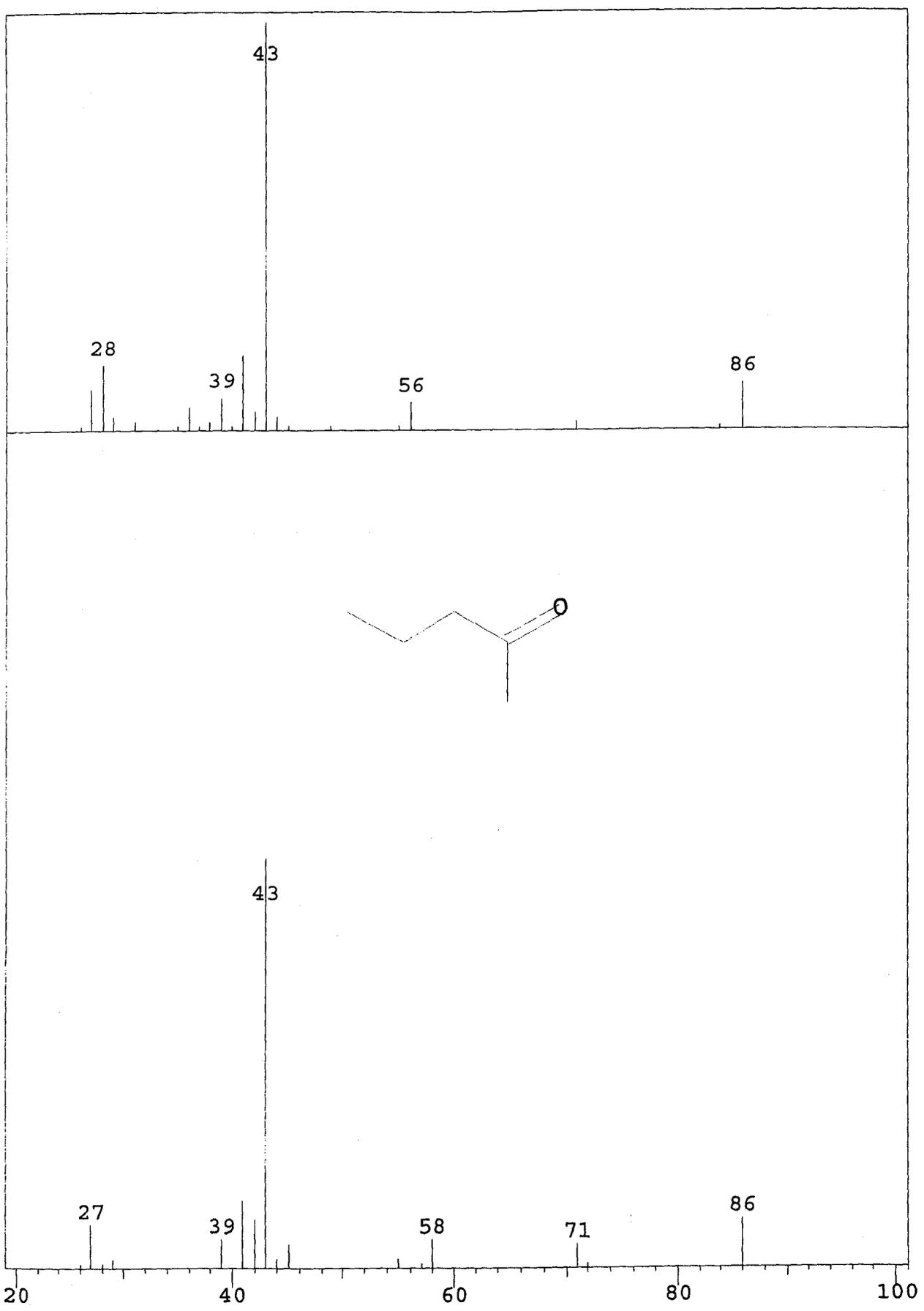
ANNEXE 25 : 1-CHLORO-2-METHYLPROPANE



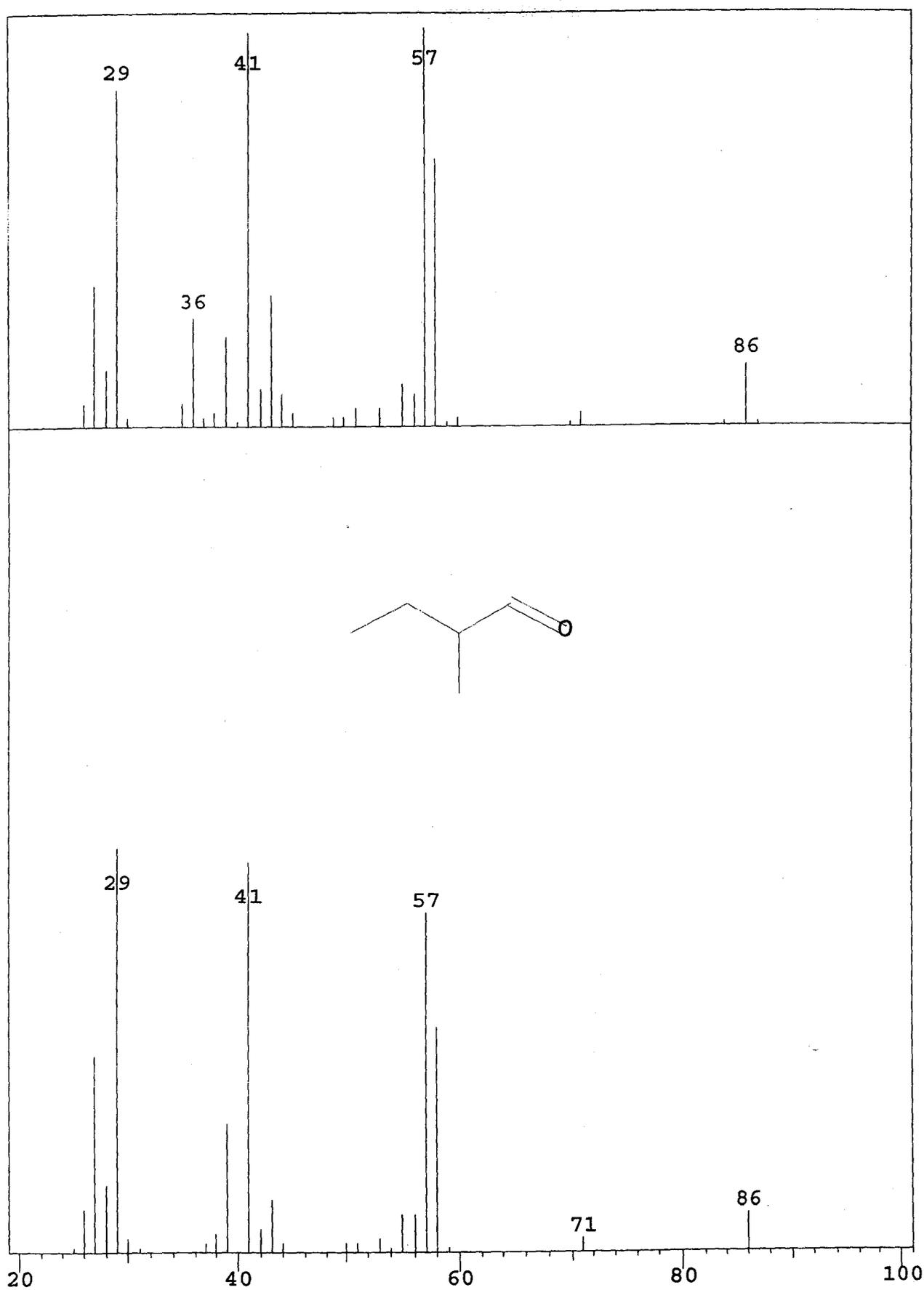
ANNEXE 26 : 3-METHYLBUTANAL



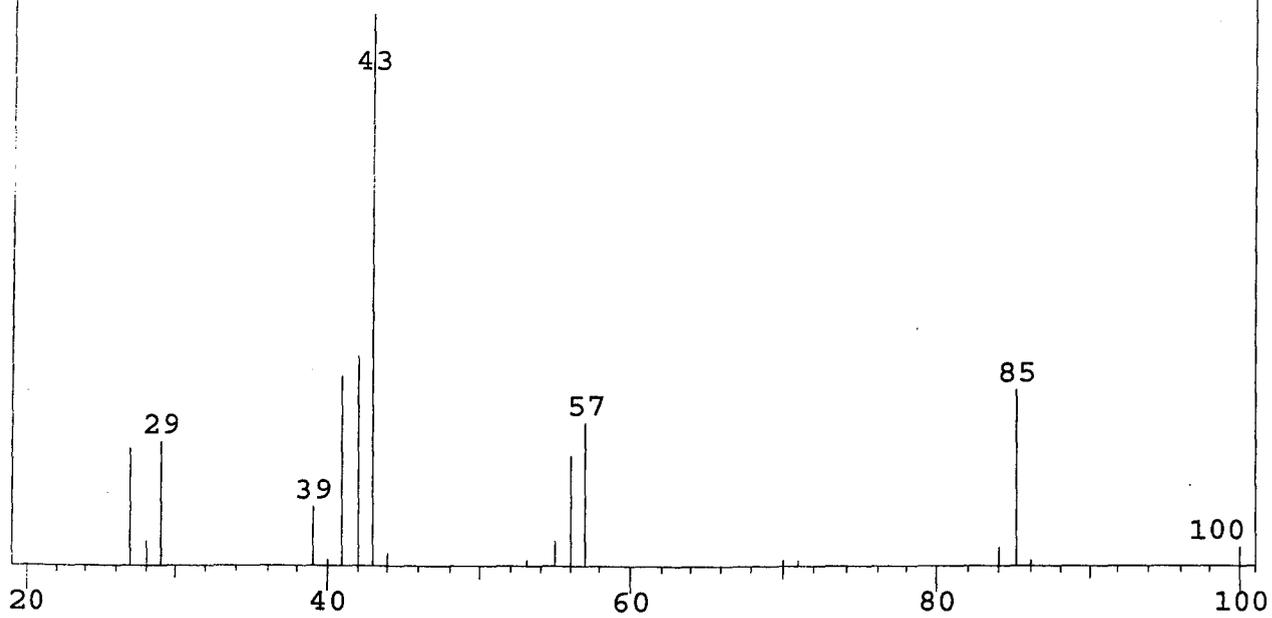
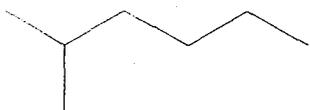
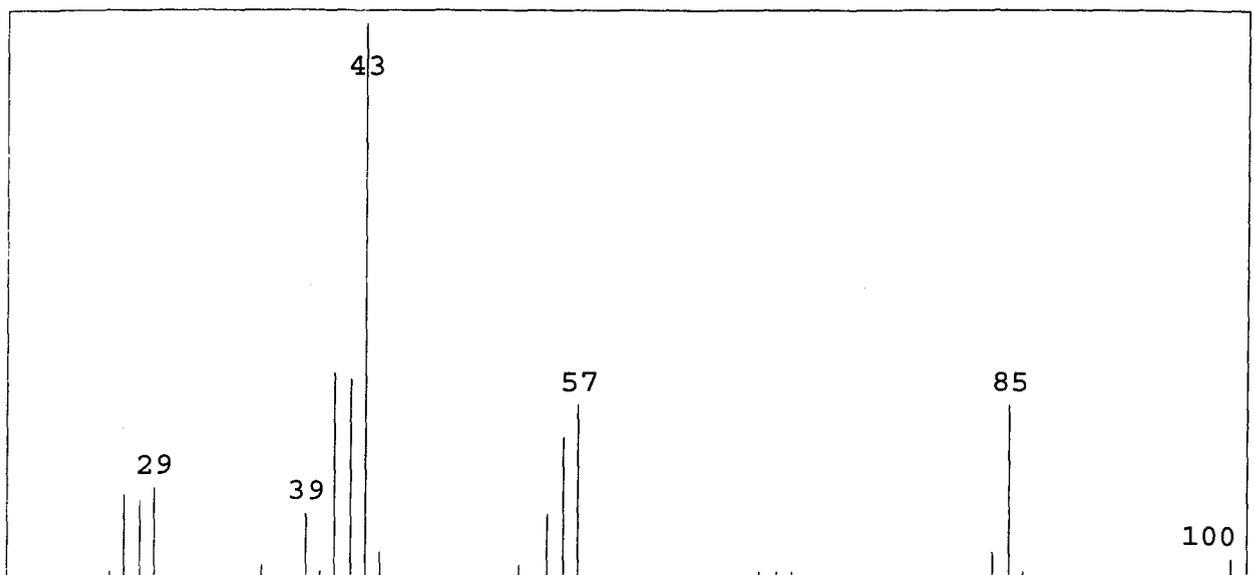
ANNEXE 27 : 2-PENTANONE



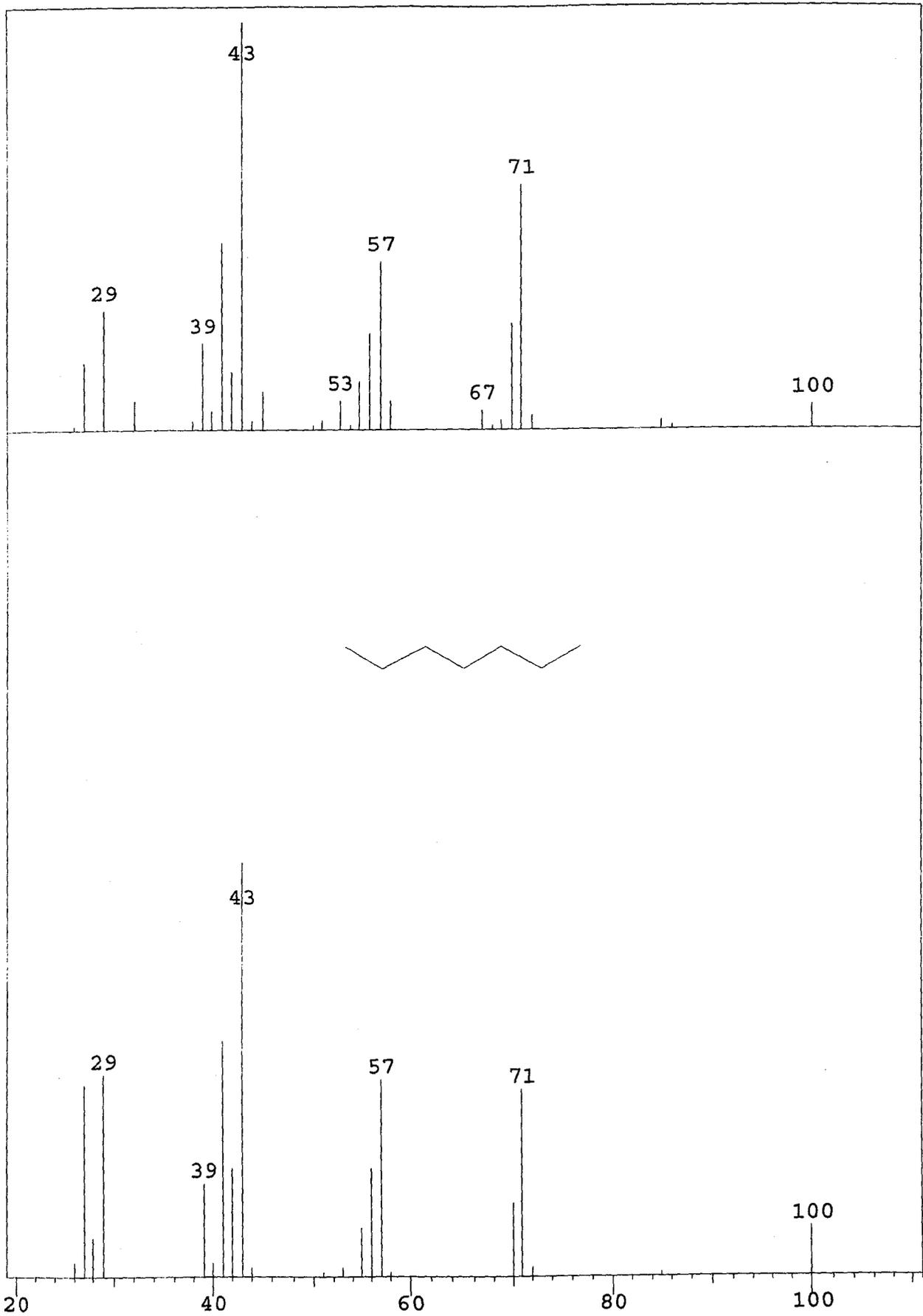
ANNEXE 28 : 2-METHYLBUTANAL



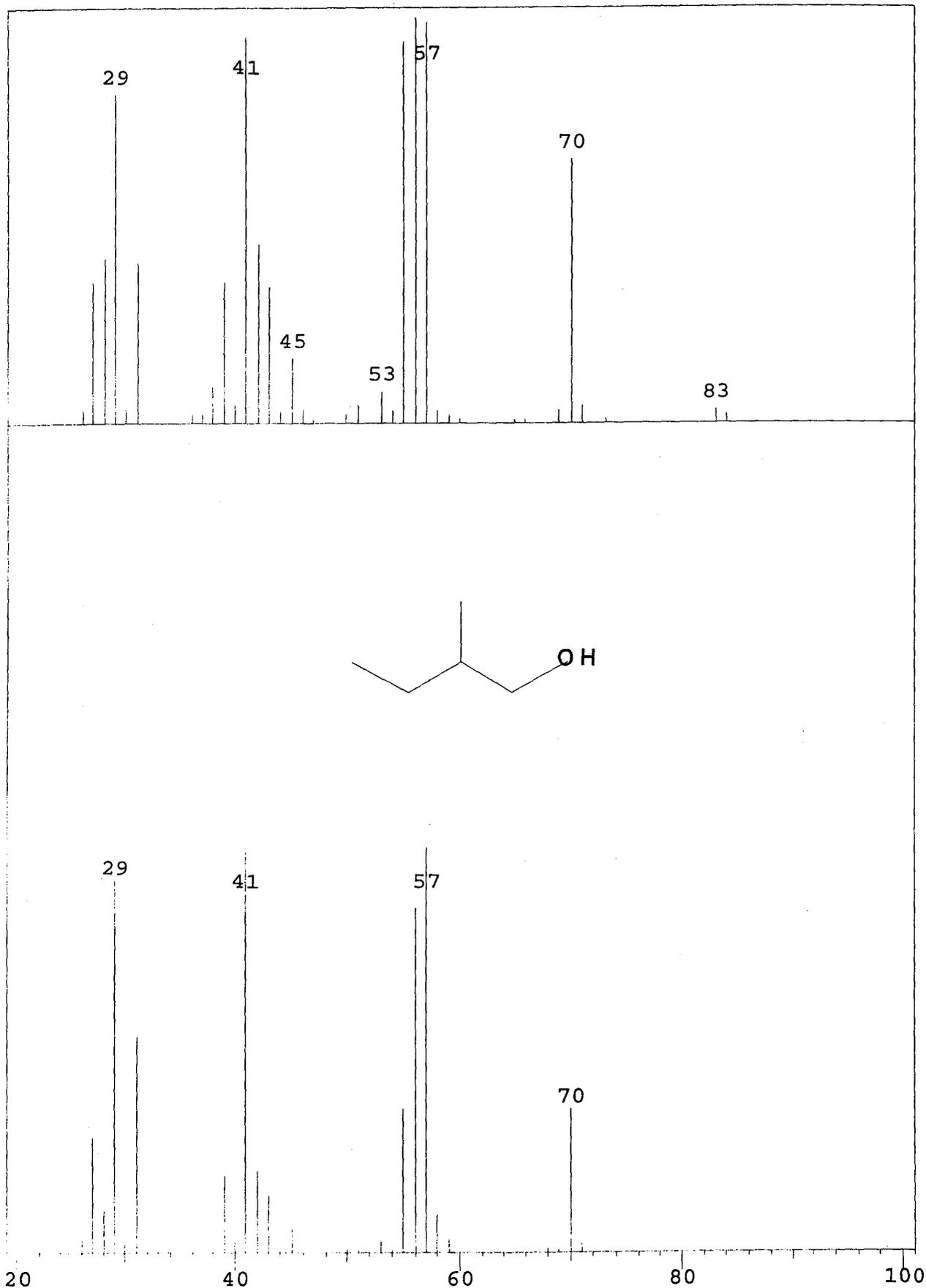
ANNEXE 29 : 2-METHYLHEXANE



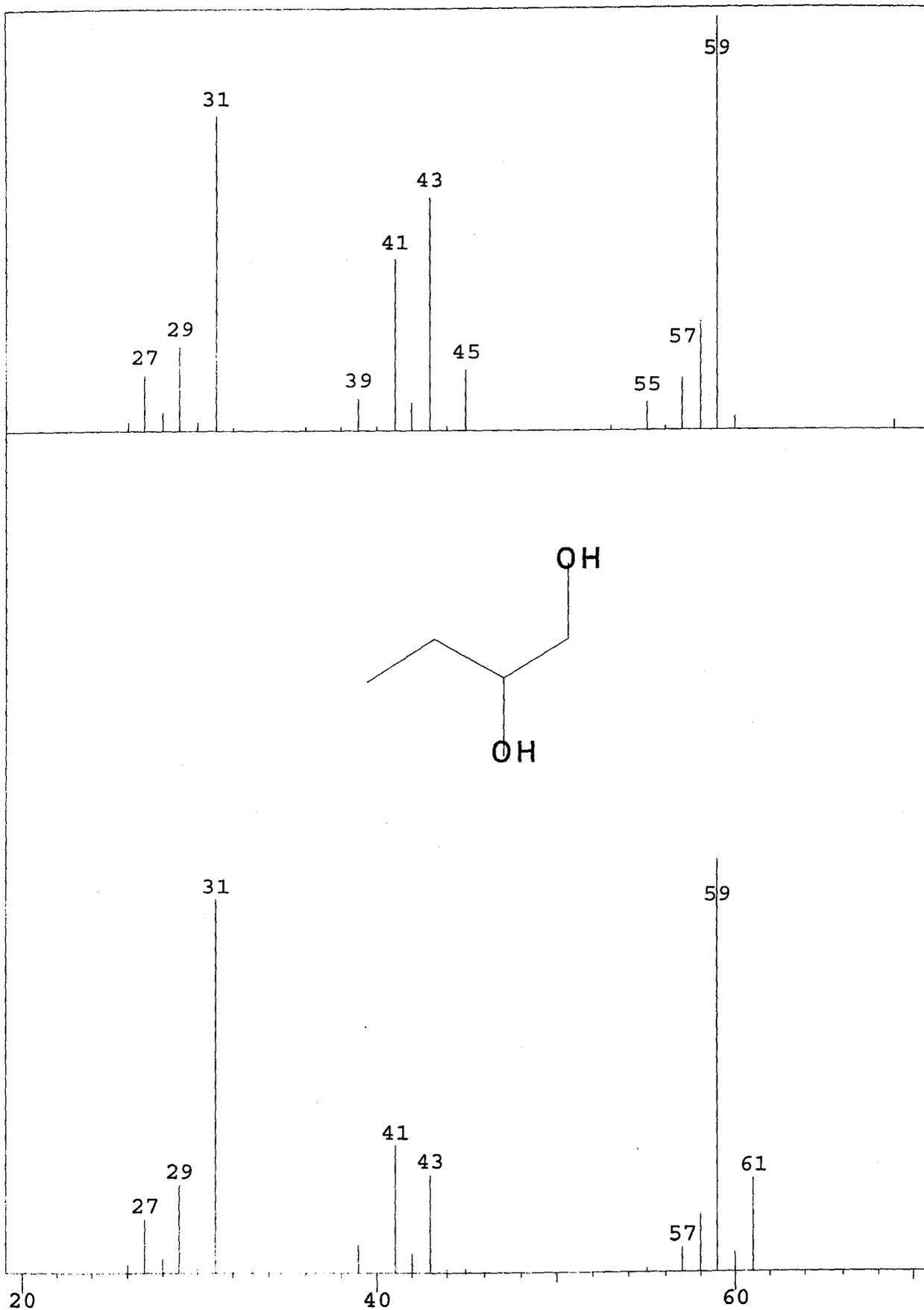
ANNEXE 30 : HEPTANE



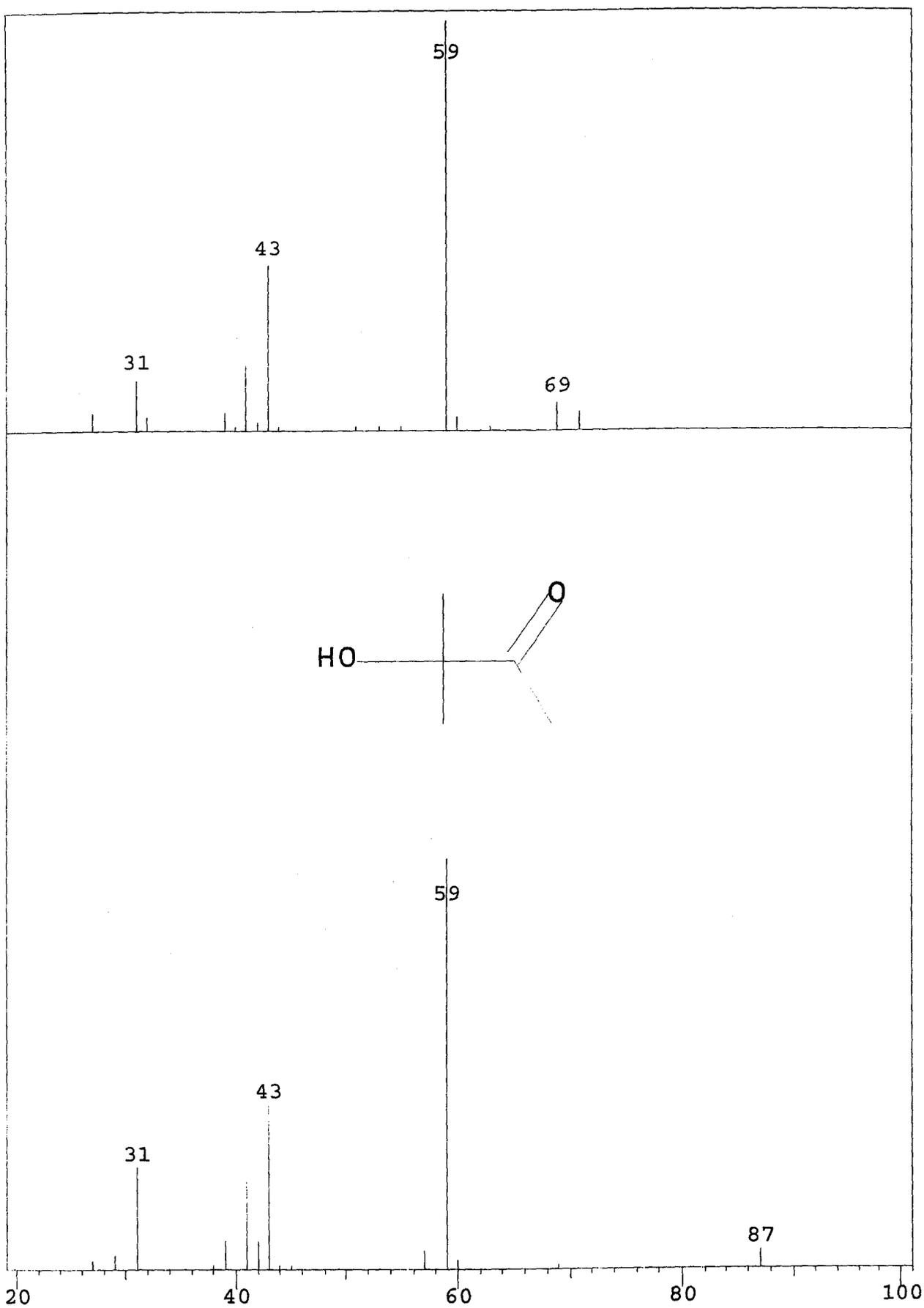
ANNEXE 31 : 2-METHYLBUTANOL



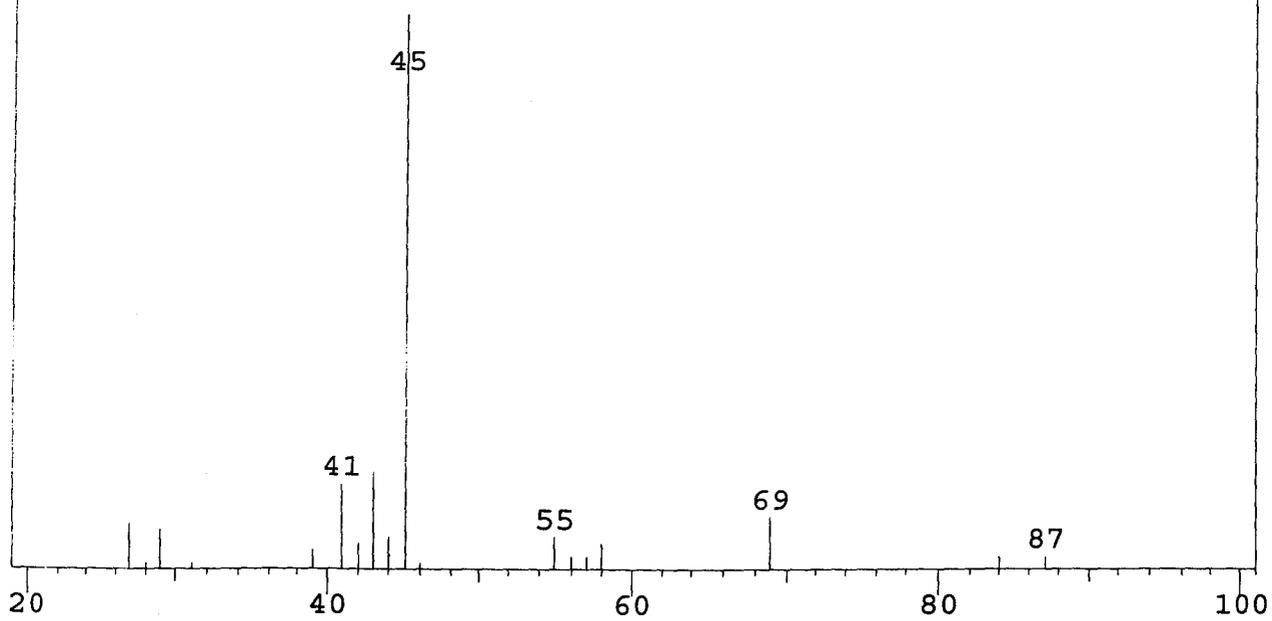
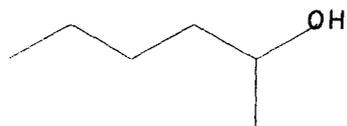
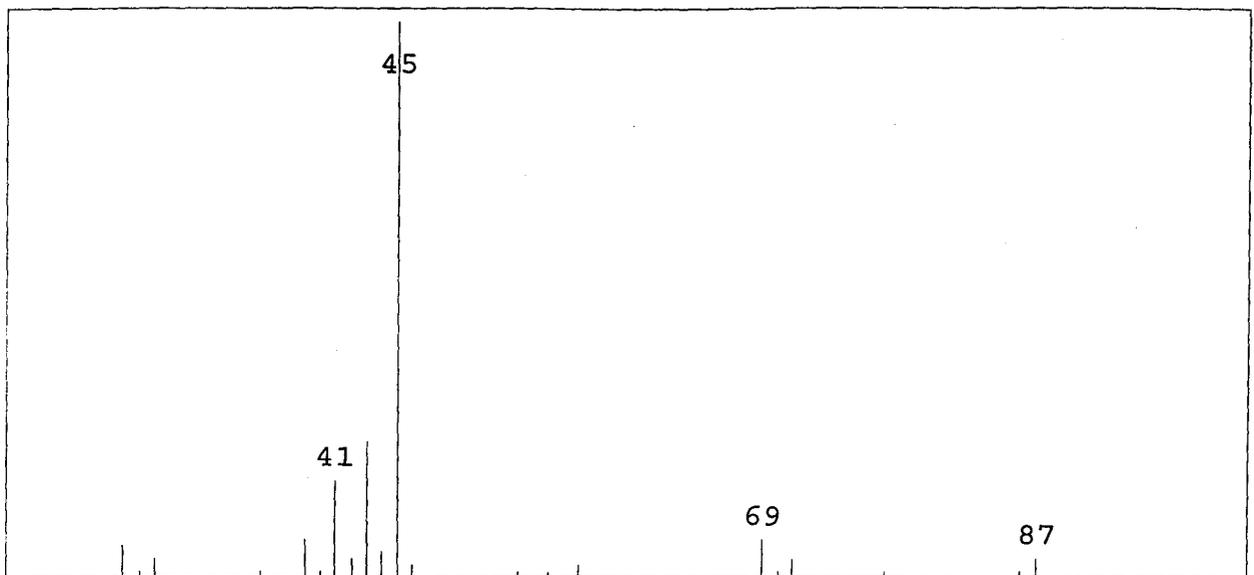
ANNEXE 32 : 1,2-BUTANEDIOL



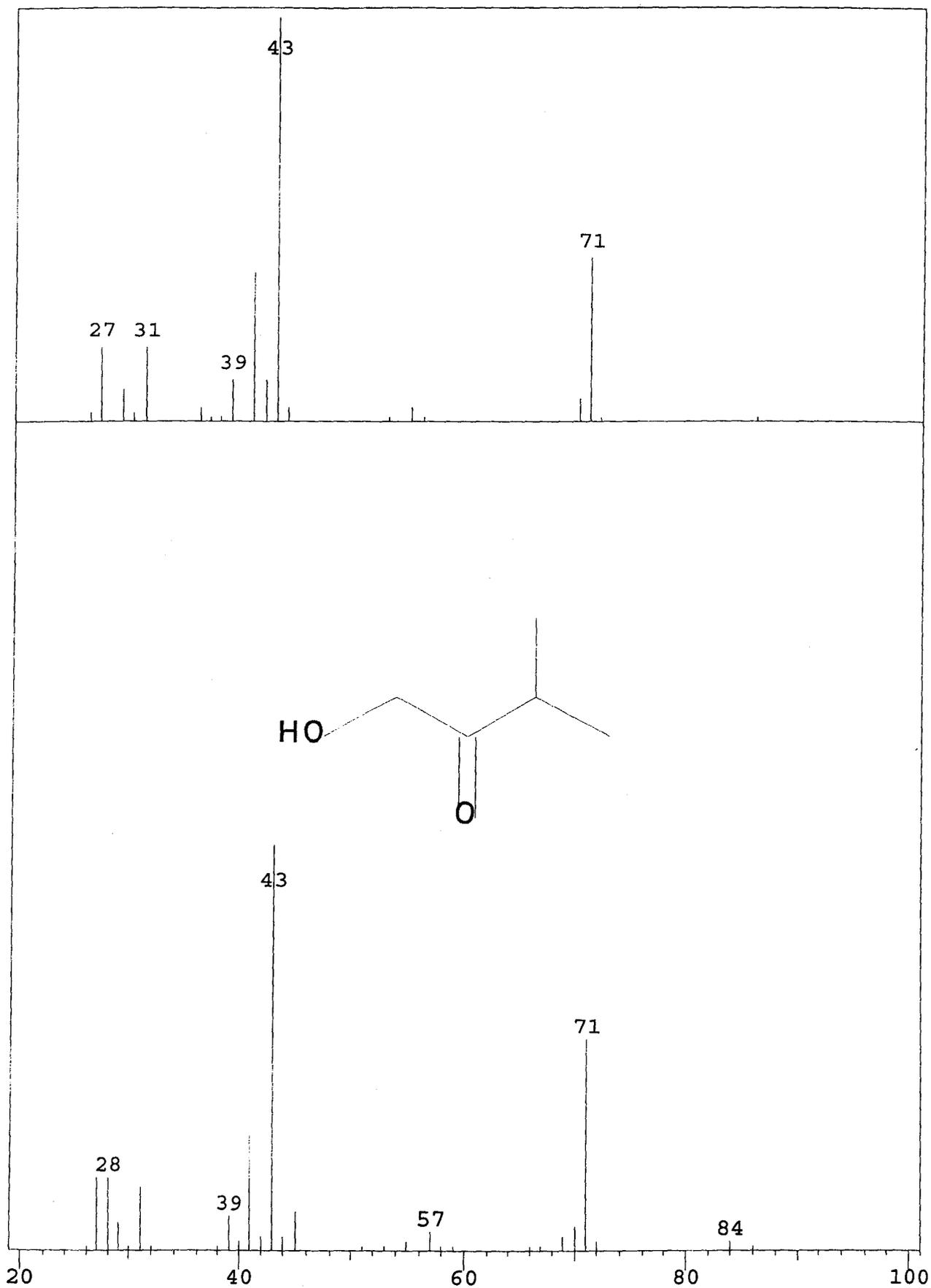
ANNEXE 33 : 3-OH-3-METHYL-2-BUTANONE



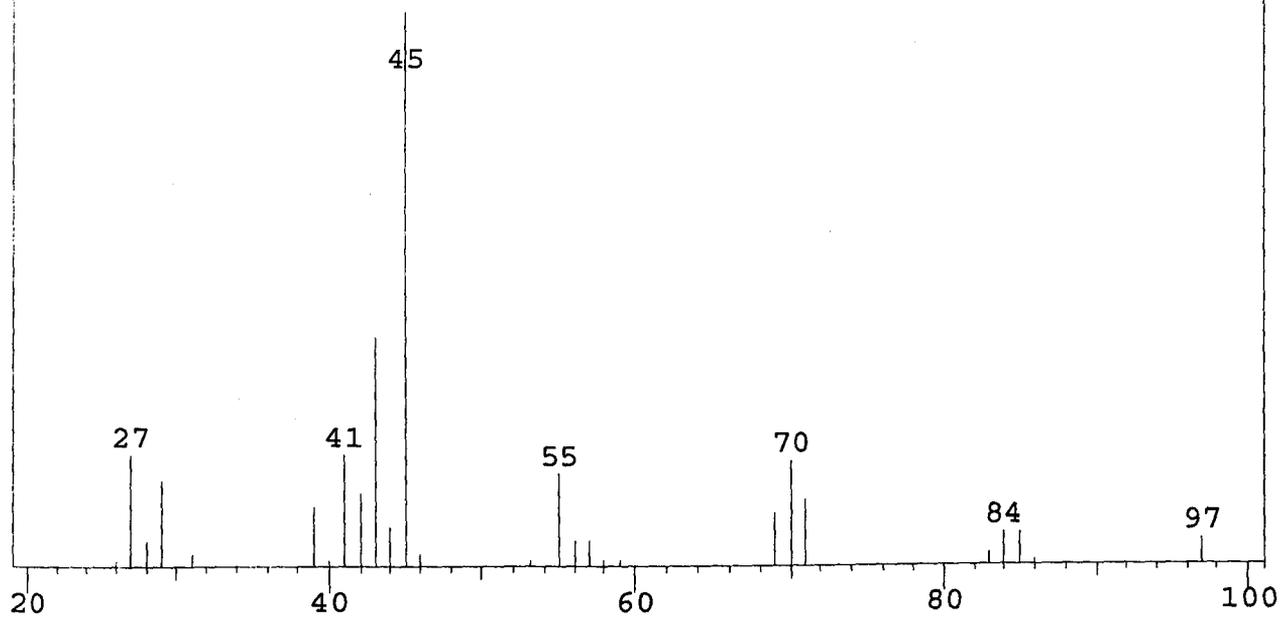
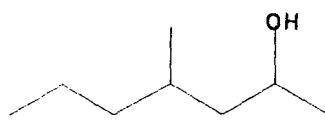
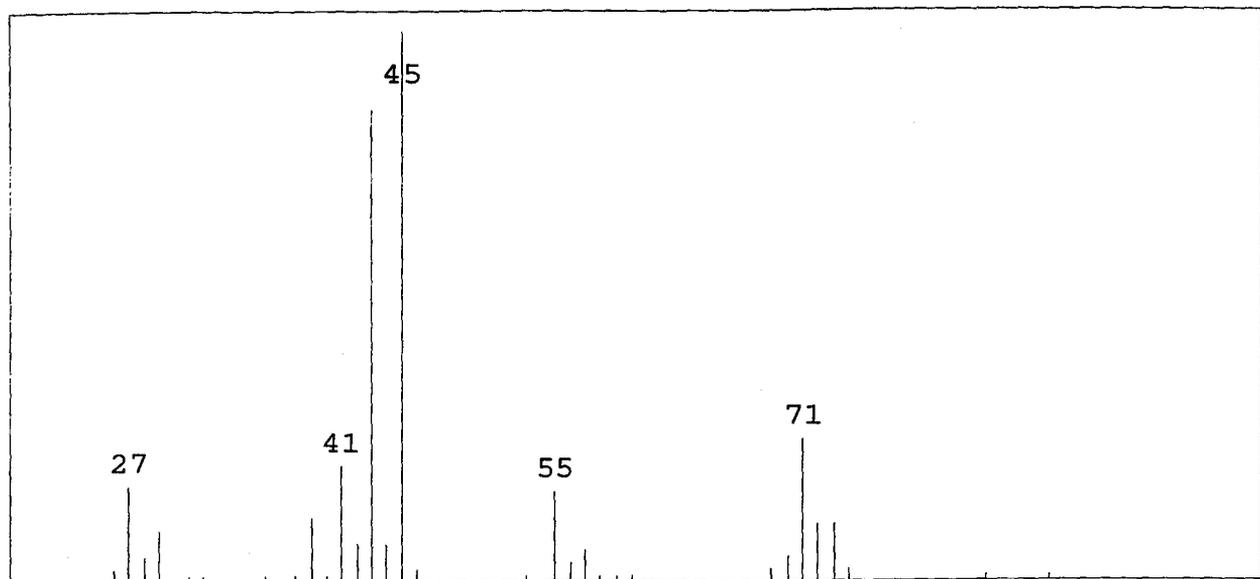
ANNEXE 34 : 2-HEXANOL



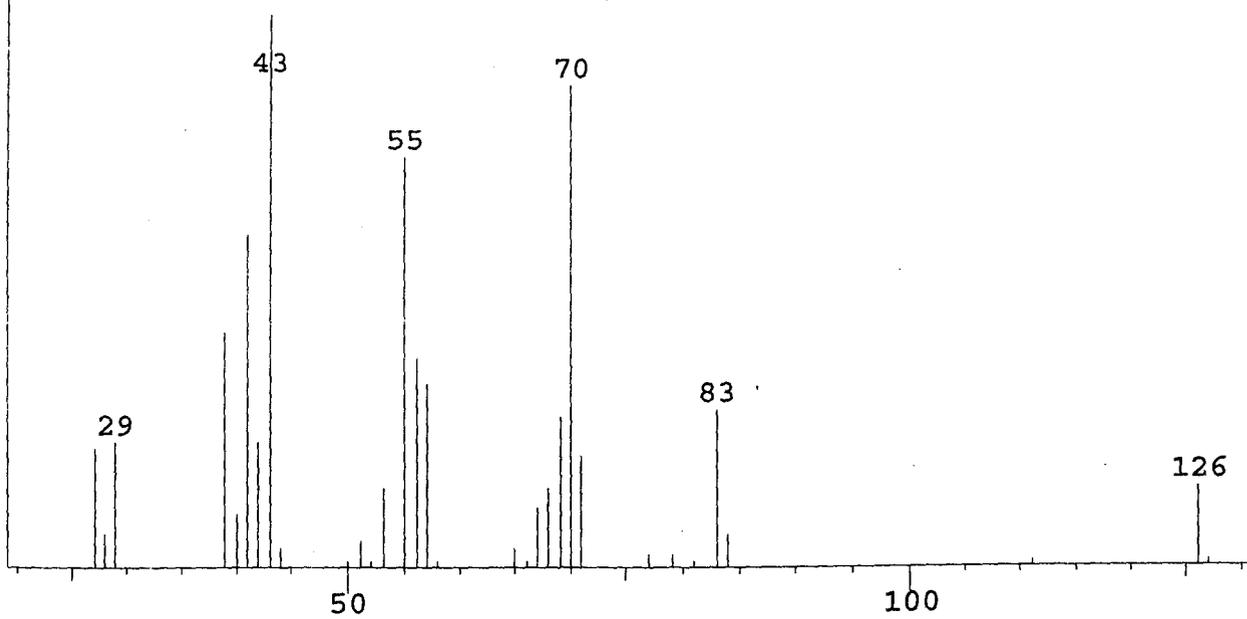
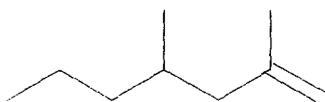
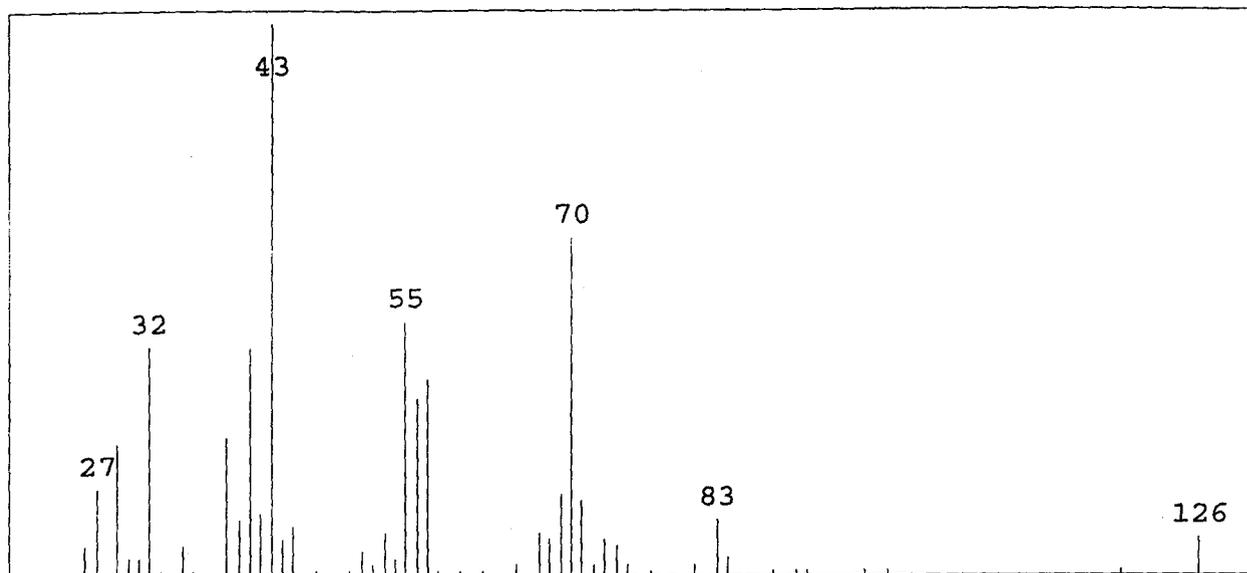
ANNEXE 35 : 1-OH-3-METHYL-2-BUTANONE



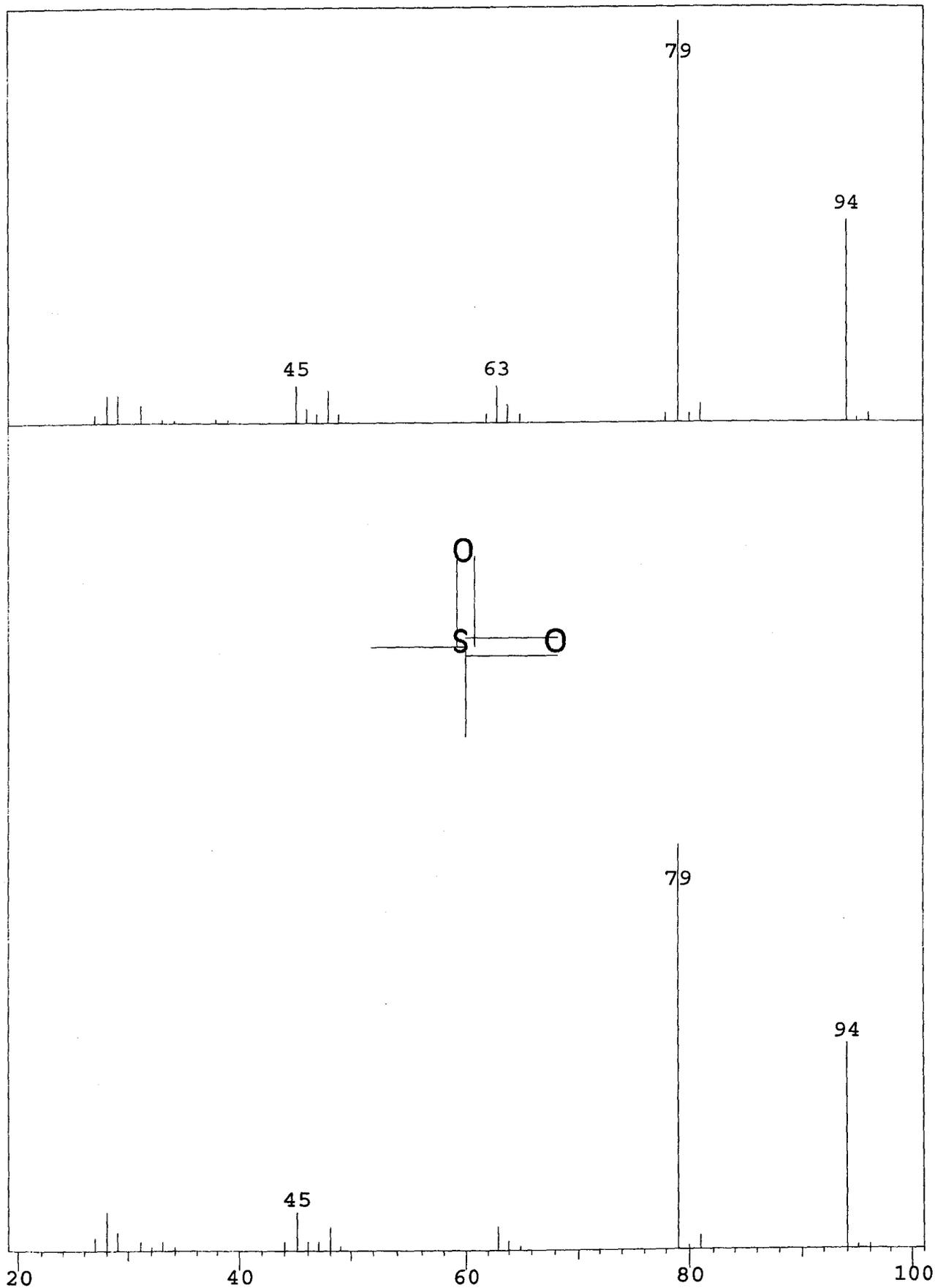
ANNEXE 36 : 4-METHYL-2-HEPTANOL



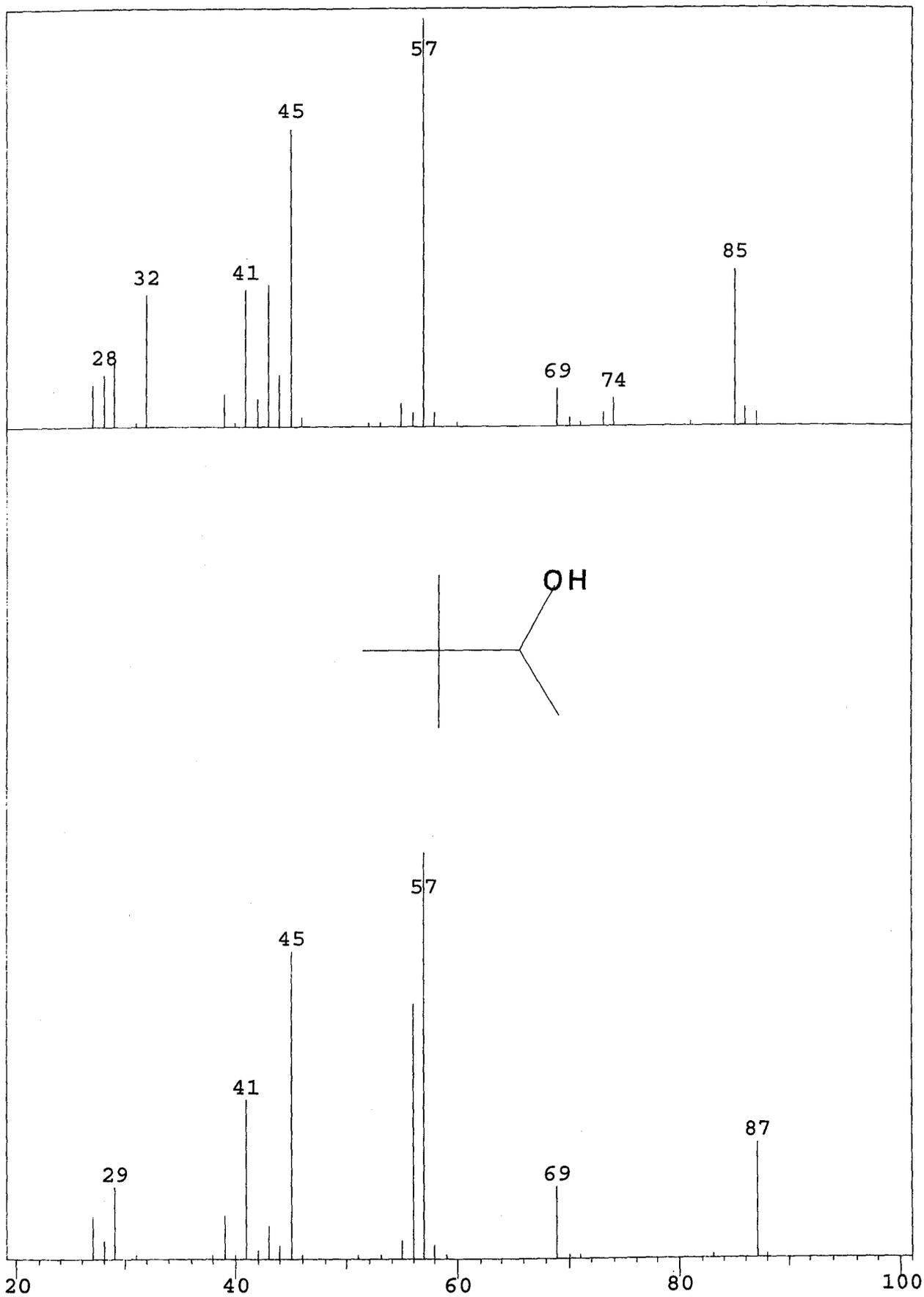
ANNEXE 37 : 2,4-DIMETHYLHEPTENE



ANNEXE 38 : DIMETHYLSULFONE



ANNEXE 39 : 3,3-DIMETHYLBUTANOL



ANNEXE 40 : ACIDE BUTANOÏQUE METHYL ESTER

