



Thèse de Doctorat de 3^{ème} Cycle
Sur le sujet :

**MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE METHODE SPECTROFLUORIMETRIQUE
DE DETERMINATION DU TAUX D'HISTAMINE DANS LES PRODUITS
HALIEUTIQUES A PARTIR DE LA CINETIQUE DE FORMATION DU
COMPLEXE ORTHOPHTHALALDEHYDE-HISTAMINE EN MILIEU ALCALIN**

Présentée et Soutenue le 17 décembre 2005

par

Monsieur **Stéphy Edgard DOUBALE**

Maître es sciences

Devant le Jury composé de :

Président	M. DIENG	Mor Marème	UCAD-FST
Examineur	M. COLY	Atanasse	UCAD-FST
Examineur	M. DIOP	Abdoulaye	UCAD-FST
Examineur	M. DIOP	Cheikh	UCAD-ISE
Examineur	M. NDIAYE	Sérigne Amadou	UCAD-FST
Examineur	Mme SALL-GNINGUE	Diarétou	UCAD-FST
Directeur	M. TINE	Alphonse	UCAD-FST

Résumé :

Les amines biogènes sont souvent à la base des intoxications alimentaires. L'histamine, en particulier, peut causer des symptômes sévères au delà de sa limite de tolérance (approximativement 0,005% m/m). Pour contrôler la qualité des aliments, plusieurs méthodes ont été établies pour le dosage de l'histamine. Cependant, beaucoup d'insuffisances restent à signaler. Dans le but d'améliorer les techniques officielles (LERKE et BELL, et l'Association Officielle de Chimie Analytique: OAAC), nous avons déterminé les conditions optimales pour la détermination du taux d'histamine. Nos résultats montrent que l'hydroxyde de sodium ou le tampon phosphate pH 11,5 sont de vrais catalyseurs pour la formation du complexe entre l'orthophthalaldéhyde (OPA) et l'histamine. Nos études montrent également que le chauffage entre 50 et 60°C accélère la formation du complexe en milieu basique. Ainsi, nous avons établi des corrélations linéaires entre les intensités de fluorescence correspondant aux maxima de la cinétique du complexe et la concentration de l'histamine. Cette calibration nous permet de déterminer le taux d'histamine avec une grande précision compte tenu du grand domaine de calibration, du bon taux de recouvrement et de la reproductibilité de nos mesures. Ces résultats obtenus montrent que notre méthode est de loin plus fiable que celle de LERKE et BELL ou de l'OAAC dont la mesure se fait en milieu acide. En effet, nos travaux ont montré que l'acide inhibe la fluorescence du complexe OPA-histamine. Nos études ont montré aussi l'existence de deux types de complexes en milieu acide. Ceci explique de mauvais taux de recouvrement obtenus quand le dosage est effectué en milieu acide. Ainsi, l'application de notre méthode dans une solution tampon phosphate pH 11,48 sur la détermination du taux d'histamine provenant des produits halieutiques a montré des résultats très satisfaisants sur la reproductibilité, la fiabilité et la précision.

Mots clés : *Absorption, Analyse, Calibration, Emission, Excitation, Fluorescence, Histamine, orthophthalaldéhyde (OPA), Spectre, Spectrofluorimétrie, Tampon.*



Université Cheikh Anta DIOP
Faculté des Sciences et Techniques
Département de Chimie
Dakar, Sénégal

Année 2005 - 2006

Thèse de Doctorat de 3^{ème} Cycle

Sur le sujet :

**MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE METHODE SPECTROFLUORIMETRIQUE
DE DETERMINATION DU TAUX D'HISTAMINE DANS LES PRODUITS
HALIEUTIQUES A PARTIR DE LA CINETIQUE DE FORMATION DU
COMPLEXE ORTHOPHTHALALDEHYDE-HISTAMINE EN MILIEU ALCALIN**

Spécialité : Chimie-physique Analytique

Présentée et Soutenue par :

Monsieur **Stéphy Edgard DOUABALE**

Maître es sciences

Le 17 décembre 2005

Devant le Jury composé de :

Président	M.	DIENG	Mor Marème	UCAD-FST
Examineur	M.	COLY	Atanasse	UCAD-FST
Examineur	M.	DIOP	Abdoulaye	UCAD-FST
Examineur	M.	DIOP	Cheikh	UCAD-ISE
Examineur	M.	NDIAYE	Sérigne Amadou	UCAD-FST
Examineur	Mme	SALL-GNINGUE	Diarétou	UCAD-FST
Directeur	M.	TINE	Alphonse	UCAD-FST

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à tous les êtres qui me sont chers.

Permettez-moi de ne citer aucun nom, au risque d'en oublier quelques uns.

À mes frères, mes sœurs, mes neveux et mes nièces pour leur indéfectible soutien moral et matériel.

À mes amis, proches et lointains, qui m'ont toujours tendu leurs mains salvatrices.

Enfin, une pensée également à ceux qui sont invisibles mais présents dans nos mémoires. Eux qui ont apporté, en leur temps, une part dans ma construction.

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Photochimie et d'Analyse de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar au Sénégal.

Je remercie Monsieur le Professeur Alphonse TINE, mon Directeur de Thèse, pour avoir placé sa confiance en moi à travers le sujet de ce travail. Je lui exprime ma gratitude pour tout ce dont j'ai bénéficié de sa part, en particulier l'accueil, l'encadrement, les précieux conseils, l'aide, le soutien et les encouragements permanents. Je loue aussi son humilité, son sens du partage et sa tolérance envers les gens d'éducatons et de cultures diverses.

C'est un grand honneur que Monsieur le Professeur Mor Marième DIENG me fait en acceptant de présider ce jury. Je lui adresse mes remerciements. Je n'oublie pas les précieux enseignements que j'ai reçus de lui depuis le second cycle jusqu'au début du troisième cycle universitaire.

A Madame Diarétou SALL-GNINGUE, je dis un grand Merci. C'est la deuxième fois qu'elle participe à un jury concernant mon travail. Je lui rends hommage et la remercie pour sa courtoisie et sa gentillesse.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Abdoulaye DIOP. Il m'avait déjà honoré en acceptant de présider le jury de mon DEA. Je le remercie pour sa gentillesse, sa courtoisie et ses encouragements sans cesse renouvelés.

Je retrouve avec plaisir Monsieur le Professeur Sérigne Amadou NDIAYE dans ce jury qui juge mon travail. J'ai reçu avec intérêt ses enseignements en Maîtrise et en DEA. J'étais ravi de le voir au jury qui a jugé avec objectivité mon travail de DEA. Je le remercie pour cette marque d'intérêt et aussi pour ses encouragements.

Je remercie Monsieur Cheikh DIOP, non seulement pour avoir accepté de faire partie du jury de ce travail, mais aussi pour ses conseils et ses encouragements.

A Monsieur Atanasse COLY, j'exprime ma gratitude et mes remerciements. Il a contribué énormément au façonnement de mes premiers pas en recherche au laboratoire. Tout au long de mes travaux, il s'est montré disponible pour répondre avec humilité aux sollicitations de ma part.

Mes remerciements sont adressés également à Madame Mame Diabou GAYE-SEYE qui n'a pu participer à ce jury pour cause de longue absence de Dakar. Je lui rends hommage et la remercie pour sa gentillesse et sa courtoisie.

Qu'il me soit permis de remercier Messieurs SAKHO et Maurice DIATTA du Département de Biologie Végétale auprès de qui j'ai trouvé des facilités techniques pour la réalisation de mes travaux. J'associe à ces remerciements Monsieur Ibrahima DIOUF, du Département de Chimie, pour la réparation et l'entretien du spectrofluorimètre.

Je remercie également les Secrétaires du Département de Chimie pour leur aide.

Enfin, que mes condisciples et amis du laboratoire trouvent ici un témoignage de ma part, en reconnaissance à la bonne ambiance qu'ils y entretiennent et sans laquelle ce travail aurait été une galère. Je dis donc merci à L. CISSE, D. SARR, M. DIONE, R. ADAMOU, L. ZAMEL, I. SECK, S. SOUVI, H. ISSELMOU, A. MENDY et M. MBAYE.

GLOSSAIRE

[1]: référence bibliographique N° 1

Abs: absorbance

cal.: calibration

émis.: émission

exc.: excitation

fact.: facteur

F.I.A.: flow injection analysis

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point (Système de l'Analyse des Dangers - Maîtrise des Points Critiques)

HPLC: Chromatographie liquide à haute performance

I_F: intensité de fluorescence

nm: nanomètre

OPA: orthophtalaldéhyde ou *ortho*-phthalaldéhyde

PIB : produit intérieur brut

resp.: temps de réponse

uv: ultra violet

volt.: voltage

TABLE DES MATIERES

<i>DÉDICACES</i>	I
<i>REMERCIEMENTS</i>	II
GLOSSAIRE	IV
TABLE DES MATIERES	V
I. INTRODUCTION GENERALE	1
II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'HISTAMINE	8
2. EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LES MICRO-ORGANISMES HISTAMINO-PRODUCTEURS	10
3. MÉCANISME DE FORMATION DE L'HISTAMINE PENDANT LA PÉRIODE POST-MORTEM DU POISSON	13
4. PRODUITS ALIMENTAIRES SUSCEPTIBLES DE CONTENIR UN TAUX ÉLEVÉ D'HISTAMINE	16
5. ACTIONS DE L'HISTAMINE DANS L'ORGANISME.....	19
6. LIMITE DE TOLÉRANCE DE L'HISTAMINE DANS LES ALIMENTS.....	21
7. TRAITEMENT DES PATIENTS VICTIMES D'INTOXICATION À L'HISTAMINE.....	24
8. INTERACTIONS MÉDICAMENTS-ALIMENTS : AGENTS POTENTIALISATEURS DE L'HISTAMINE	26
9. RECOMMANDATIONS	27
10. MÉTHODES D'EXTRACTION D'HISTAMINE	29
11. TRAVAUX SUR LES DÉRIVÉS DE L'HISTAMINE ET SES AGENTS DE DÉRIVATISATION EN FLUORESCENCE.....	31
12. MÉTHODES DE DOSAGE DE L'HISTAMINE	33
a) <i>Méthodes immunologiques et enzymatiques</i>	33
b) <i>Méthodes chromatographiques</i>	34
c) <i>Méthodes électrochimiques</i>	36
d) <i>Méthodes photochimiques</i>	37
III. ETUDE EXPERIMENTALE	41
1. PRODUITS UTILISÉS.....	41
2. INSTRUMENTATION.....	41
3. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES	42
a) <i>Préparation des solutions</i>	42
b) <i>Préparation des échantillons</i>	42
c) <i>Mesure de la fluorescence</i>	43
IV. RESULTATS ET DISCUSSION	45
1. TRAVAUX PRÉLIMINAIRES	45
a) <i>Travaux préliminaires en absorption électronique uv-visible</i>	45
b) <i>Travaux préliminaires en fluorescence</i>	47
2. OPTIMISATION DU DOSAGE RÉPÉTITIF	52
a) <i>Vérification de l'effet de la concentration NaOH sur la formation du complexe OPA-histamine sans ajouts successifs</i>	52
b) <i>Effet de l'agitation sur la cinétique de formation du complexe OPA-histamine</i>	54
c) <i>Effet de la température sur la cinétique de formation du complexe OPA-histamine</i>	56
d) <i>Effet de la concentration NaCl sur la fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu basique</i>	58
e) <i>Effet du pH sur la fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu basique et en milieu acide</i>	59
a) <i>Effet de HCl sur la fluorescence du complexe</i>	59
β) <i>Effet de NaOH sur la fluorescence du complexe</i>	67
3. OPTIMISATION AVEC LE TAMPON PHOSPHATE	71
a) <i>Préparation de la solution tampon phosphate</i>	71
b) <i>Droite de calibration standard et calcul des limites de détection et de quantification</i>	73
c) <i>Détermination du taux de recouvrement par notre méthode expérimentale</i>	75
4. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL ET APPLICATIONS	76
a) <i>Protocole expérimental</i>	76
a) <i>Préparation de la résine et de la colonne chromatographique</i>	76
β) <i>Conservation et régénération de la résine</i>	76

γ)	<i>Préparation de la solution d'acide trichloracétique (TCA) 10%</i>	77
δ)	<i>Préparation du tampon acétate pH 4,62 (0,2M)</i>	77
ε)	<i>Préparation du tampon phosphate pH 11,5 (1M)*</i>	77
θ)	<i>Préparation de la solution d'OPA*</i>	77
ι)	<i>Préparation de la solution d'histamine standard</i>	78
κ)	<i>Préparation de l'échantillon</i>	78
λ)	<i>Extraction de l'histamine</i>	78
μ)	<i>Réaction de condensation avec l'OPA*</i>	79
ν)	<i>Mesure de fluorescence du complexe*</i>	79
ξ)	<i>Calcul du taux d'histamine dans l'échantillon*</i>	80
b)	<i>Applications : détermination du taux d'histamine dans le poisson</i>	82
α)	<i>Détermination du taux d'histamine dans l'échantillon 1</i>	82
β)	<i>Détermination du taux d'histamine dans l'échantillon 2</i>	83
V.	CONCLUSION GENERALE	85
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87

I. INTRODUCTION GENERALE

En ce début de 21^{ème} siècle, la population mondiale a atteint six (6) milliards d'individus et les ressources alimentaires ne sont pas uniformément disponibles en qualité et en quantité sur le globe terrestre. Cependant, pour une alimentation équilibrée, la nourriture doit être diversifiée avec un minimum de nutriments. Les travaux des nutritionnistes, indiquent que le poisson, la viande, et certains végétaux tels que le soja sont les principales sources de protéines alimentaires. L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) conseille une alimentation riche en protéines, sachant que celles-ci tiennent une part importante sur la constitution et le fonctionnement de l'organisme humain [1]. En outre, les pourcentages en acides aminés essentiels nous permettent d'affirmer que le poisson est une source privilégiée de protéines alimentaires [1].

Le Sénégal, à l'image de beaucoup d'autres pays côtiers, est un important producteur de produits halieutiques. En effet, grâce à ses 718 Km de côtes et des courants marins favorables, les eaux maritimes sénégalaises sont riches en produits de pêche. Sa population a également acquis une riche culture historique de la pêche artisanale. A cela s'ajoute une pêche industrielle suite aux accords, régulièrement renouvelés, avec l'union européenne. Le dernier accord signé en juin 2002, au prix de 42 milliards de francs CFA autorise plus d'une centaine de bâtiments de pêche européens à sillonner les côtes sénégalaises jusqu'en juillet 2006 [2].

L'activité de la pêche et l'industrie de transformation de ses produits mobilisent en permanence plus d'un demi-million de personnes, pour une production annuelle de 400 mille tonnes de poisson. Si la pêche artisanale

représente 85% des activités, les exportations des produits de pêche génèrent plus de 200 milliards de francs CFA, représentant 30% des exportations totales du Sénégal [2, 3]. La pêche constitue donc la première source de devises pour le Sénégal et contribue à 2,5% du PIB [3]. En dehors des profits tirés de l'exportation, le poisson est le principal ingrédient dans la cuisine sénégalaise, en particulier dans le plat national : le « tiébou-djën » ou riz au poisson.

Cependant, par son caractère de ressource mondiale recherchée, la qualité du poisson fait l'objet de normes et réglementations de la part des différents Etats, des communautés régionales et aussi de l'OMS [1]. L'objectif est de protéger les consommateurs. En effet, le poisson mal conservé peut causer des problèmes de santé publique. Une mauvaise conservation de produits halieutiques entraîne leur altération, par conséquent, il peut en résulter des conséquences sanitaires graves chez les consommateurs. Nous citerons en exemple le cas de l'intoxication au sandwich de thon (tuna-burger) en Caroline du Nord [4]. Certaines intoxications peuvent être spectaculaires avec beaucoup de personnes touchées. Ce fut le cas au Japon, en 1973, où la consommation du maquereau (*Trachurus japonicus*) avait causé l'intoxication de 2656 personnes [5]. Ce genre d'intoxication est dû en général au fort taux d'amines biogènes, en particulier l'histamine [6, 7]. L'histamine est pourtant nécessaire dans l'organisme grâce à son rôle de médiateur chimique dans le système nerveux [8, 9]. Cependant elle devient toxique à des concentrations relativement élevées. Une forte accumulation de l'histamine rend toxique le poisson. La limite de tolérance de l'histamine dans les produits alimentaires varie, selon les pays, entre 0,005 et 0,01% en masse [10-12]. L'histamine résulte de la décarboxylation de l'histidine, acide aminé naturel. Cette transformation est catalysée par l'histidine décarboxylase, enzyme présent dans certains microorganismes tels que *Klebsiella oxycota*, *Klebsiella pneumonia*, *Morganella morganii* [13-16]. Notons que plusieurs familles de poisson sont hôtes

de ces microorganismes. Parmi ceux-ci nous citerons les espèces telles que les Scombridés et des Scombérosocidés (le thon, la bonite, le maquereau), les Clupéidés (sardines, hareng) et les Coryphénidés (mahi-mahi) qui sont de grands vecteurs d'intoxication par l'histamine [11, 13, 14]. Pire, les espèces halieutiques des autres familles de poissons sains peuvent être contaminées par les microorganismes précédents à cause de mauvaises manipulations : les produits d'abord sans risque deviennent ainsi le siège d'une forte concentration d'histamine. C'est pourquoi il est recommandé d'observer des règles d'hygiène strictes lors de la manipulation des denrées halieutiques [12].

Bien que le taux d'histamine dans le poisson in vivo reste très bas grâce à une autorégulation interne [5], celui-ci se voit accéléré pendant la période post-mortem et en dehors de toute congélation [12, 13, 17]. Des mesures d'hygiène s'imposent donc. Ainsi, dans l'espace européen, tous les produits halieutiques doivent satisfaire aux directives N° 95/76/EC et N° 91/493 de l'Union Européenne qui stipulent : *sur 9 échantillons de poissons prélevés dans un container, (1) le taux moyen d'histamine ne doit pas excéder 100 ppm ; (2) pas plus de deux échantillons ne doivent avoir un taux supérieur à 100 ppm ; (3) aucun échantillon ne doit dépasser 200 ppm* [18]. Auparavant, TAYLOR [5] et SHALABY [19], chacun en ce qui le concerne, avaient donné le taux maximal d'histamine à consommer. Dans certains pays, la limite de tolérance en histamine est inférieure à 50 ppm par rapport au produit consommé. Le contrôle du taux d'histamine dans les produits alimentaires demeure donc un important test de qualité, d'autant plus que d'autres produits tels que le fromage, la viande et certaines boissons contiennent un fort taux d'histamine [6, 7, 10, 20, 21].

Toutes les relations commerciales internationales s'appuient sur ces réglementations pour préserver la santé des populations. Dès lors, il faut des laboratoires accrédités appliquant des méthodes de dosage approuvées pour

contrôler la teneur en histamine, particulièrement dans les produits de pêche. A ce jour, plusieurs procédés de détermination qualitative et quantitative de l’histamine ont été élaborés. On distingue des méthodes enzymatiques, radio-enzymatiques, électrochimiques, chromatographiques, photométriques et fluorimétriques en particulier [22-30]. Le choix d’une bonne méthode associe plusieurs critères parmi lesquels on peut énumérer la sécurité, la spécificité, le coût, la rapidité, la fiabilité, la limite de détection... [31]. Malheureusement, parmi les méthodes actuelles, beaucoup d’insuffisances sont à signaler. Selon la méthode utilisée, les difficultés rencontrées sont de plusieurs ordres. Pour cette raison, dans une étude menée par ROGERS et STARUSZKIEWICZ sur les différentes méthodes de dosage, des insuffisances importantes sur chacune d’elles ont été montrées [32] :

- La chromatographie sur couche mince présente une limite de détection trop élevée (20-50 ppm). On la qualifie alors de méthode semi-quantitative.
- Les méthodes biologiques sont également peu quantitatives. Elles utilisent par exemple la contraction des fibres musculaires d’un animal très peu sensible à l’histamine. En plus, elles nécessitent des animaux cobayes.
- Les méthodes radioenzymatiques emploient des radio-isotopes dont la manipulation doit être très minutieuse.
- Les méthodes enzymatiques sont très longues à cause des durées d’incubation et des extractions multiples, d’autant plus que les enzymes sont peu disponibles et leur purification fastidieuse.
- Les méthodes immunologiques nécessitent des anticorps et des enzymes avec des temps d’incubation très longs.
- La spectrophotométrie par mesure de densité optique (absorption électronique) est peu quantitative. Elle comporte des risques de résultats erronés à cause de son faible domaine de calibration.
- Les méthodes électrochimiques nécessitent des électrodes sophistiquées à sonde d’oxygène, avec usage d’un enzyme qui n’est pas commercialement disponible.

- La chromatographie liquide à haute performance pose un problème de quantification lorsque la dérivation est réalisée en pré-colonne, pendant qu'une dérivation post-colonne génère d'importantes variations d'absorbance ou d'intensité de fluorescence.

- La méthode fluorimétrique est de loin la plus performante. L'histamine n'étant pas fluorescente, la fluorescence provient de son complexe formé avec l'orthophthalaldéhyde (OPA). Cette méthode semble plus précise que les autres. En effet, pour qu'il ait interférence entre deux composés, il faudrait qu'ils présentent une même longueur d'onde d'absorption, une même longueur d'onde d'excitation et une même longueur d'onde d'émission. Un autre avantage de la méthode fluorimétrique est sa sensibilité qui permet d'obtenir des limites de détection très basses. Ainsi, par rapport aux autres méthodes existantes, le dosage par voie fluorimétrique est de loin la méthode la plus utilisée car plus sensible. Cependant, des inconvénients majeurs liés à cette méthode sont à signaler :

- Les bases de mesure ont été effectuées par un fluorimètre mais non par un spectrofluorimètre.
- La cinétique de la formation du complexe histamine-OPA en milieu basique ne peut être obtenue par un fluorimètre.
- Le milieu acide dans lequel la fluorescence est mesurée s'est révélé comme un inhibiteur de l'intensité de fluorescence du complexe à certaines valeurs de pH. Cela a pour conséquence la réduction du domaine de calibration. Les résultats obtenus deviennent ainsi moins fiables, d'autant plus que la différence entre deux concentrations distinctes est moins nette.
- Le milieu réactionnel n'est pas optimisé en fonction des concentrations d'OPA et du pH.
- La température réactionnelle n'est pas optimisée.

- Les résultats statistiques (limites de détection et taux de recouvrement) sont peu probants en milieu acide.
- Ces méthodes ne sont pas pratiques pour la détermination de l’histamine dans le milieu médical (sur l’homme) où le taux est généralement faible.

Dans un monde où l’environnement va en se dégradant et où les ressources sont limitées, les problèmes de sécurité et le rapport efficacité-prix deviennent de plus en plus importants en recherche fondamentale. En raison de ce qui précède, ces considérations deviennent les critères indispensables à l’adoption ou au rejet d’une nouvelle ou ancienne méthodologie [31].

Dans ce présent travail, pour appuyer et justifier notre choix, nous commencerons par une étude bibliographique indiquant l’état actuel de la recherche sur l’histamine.

Nous-nous proposons donc de mettre au point une nouvelle méthode fluorimétrique sur la base de la cinétique de formation du complexe OPA-histamine en milieu basique où nous obtenons des intensités de fluorescence beaucoup plus importantes et le domaine de calibration beaucoup plus large. Pour cela, nous étudierons les effets du pH (NaOH et HCl), de NaCl, de l’OPA sur la fluorescence du complexe, de même que l’effet de la température sur la stabilisation du complexe OPA-histamine en milieu basique.

Nous comparerons nos résultats avec ceux obtenus par la méthode de LERKE et BELL et nous proposerons un nouveau protocole de détermination du taux d’histamine à partir du poisson suivi d’une application.

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La molécule d'histamine n'a été identifiée qu'au début du vingtième siècle. En 1916, GUGGENHEIM et LÖFFLER étaient parmi les premiers à avoir isolé cette molécule dans la nature [33]. Pourtant les intoxications qui lui sont attribuées remontent beaucoup plus loin dans le temps. En effet, le cas le plus lointain d'intoxication histaminique est rapporté par HENDERSON en 1828 [34]. L'incident était survenu à bord d'un navire britannique (*Triton of Leith*) à la suite de la consommation de la bonite (*Scomber pelamis*). Bien que l'histamine ne fût pas connue à l'époque, le poisson incriminé ne laisse aucun doute sur la nature de l'intoxication par l'histamine. L'histamine constitue donc l'une des premières causes d'intoxication alimentaire due au poisson dans la majorité des pays. Aux Etats Unis, elle vient en deuxième position juste après la ciguatera [35].

La plus grande intoxication histaminique est celle produite au Japon en 1973 avec 2656 cas, à la suite de la consommation du maquereau (*Trachus japonicus*) [5].

Le très grand nombre de travaux réalisés à ce jour sur l'histamine montre l'importance de cette molécule dans plusieurs domaines d'études qui sont aussi vastes que variés : Toxicologie, Neurologie, Pharmacologie, Gastroentérologie, Ophtalmologie, Biochimie, Chimie analytique...

Malgré l'abondance des résultats, la recherche des méthodes de dosage de l'histamine se poursuit encore, car leur coût et la précision qui s'imposent ne sont pas encore satisfaisants. Nous discuterons dans ce chapitre des avancées importantes sur la détermination du taux d'histamine et de ses effets.

1. Caractéristiques physico-chimiques de l'histamine

L'histamine est une amine dont la formule brute est $C_5H_9N_3$ avec une masse molaire de **111,15g/mol**. Elle présente une fonction amine primaire et un noyau imidazole. TORREGGIANI et al. ont prouvé en spectroscopie Raman, l'existence d'un équilibre tautomérique engageant deux formes de l'histamine [36]. En effet, le noyau imidazole subit un réarrangement grâce aux déplacements simultanés du doublet π liant le carbone à l'azote et aussi de l'atome d'hydrogène (schéma 1). Le **tautomère I** est la forme prépondérante (75%) à pH 9. Les travaux de MANDATY et al. ont montré également l'existence de la tautomérie déterminée théoriquement sur le noyau imidazole par calcul des surfaces d'énergie potentielle (PES) et la méthode restreinte de HARTREE-FOCK (RHF/3-21G) [37].

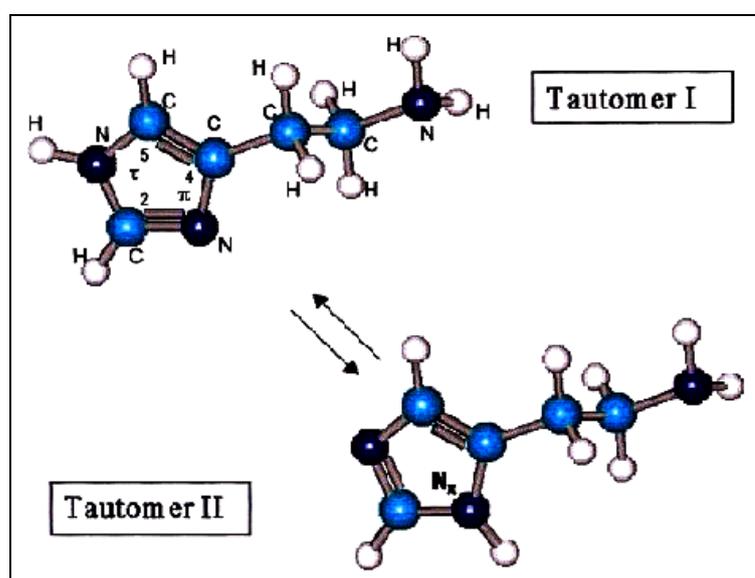


Schéma 1 : Formes tautomériques de l'histamine optimisées par la méthode d'Austin I (AMI) [36].

La présence du groupe amine offre ainsi à l’histamine des possibilités de réactions avec les aldéhydes, l’acide nitreux, les acides carboxyliques...[38, 39]. Ces diverses réactions sont résumées sous forme de schéma (schéma 2). Cette réactivité chimique permet donc d’avoir plusieurs dérivatisations aboutissant à l’analyse qualitative et quantitative de l’histamine.

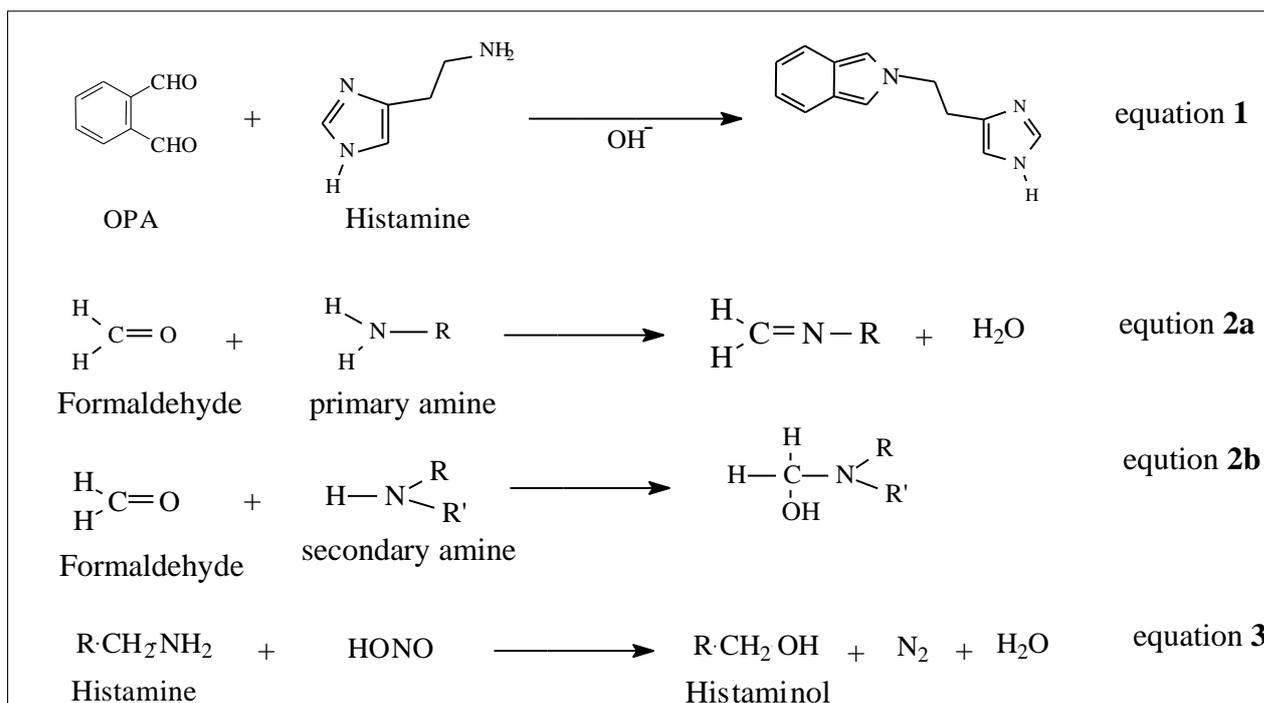


Schéma 2 : *Quelques réactions des amines primaires* [38, 39].

L’histamine purifiée est hygroscopique et existe sous forme de cristaux jaunâtres. Lorsqu’elle est conservée sous forme de chlorhydrate d’histamine, les cristaux sont blancs. Les valeurs des ses pK_A sont 6,04 et 9,75. Son pH isoélectrique est donc de 7,9. En conséquence, dans un milieu acide, l’histamine se trouve sous forme cationique. Cette propriété est utilisée lors de son extraction en colonne chromatographique échangeuse d’ions.

2. Effet de la température sur les micro-organismes histamino-producteurs

Les microorganismes jouent un rôle essentiel dans la formation de l'histamine dans des produits en décomposition. L'*histidine décarboxylase* (*HDC*), enzyme qui catalyse la transformation de l'histidine en histamine est produite par ces microorganismes.

Mc MEEKIN et al. ont proposé une classification thermique des bactéries histamino-productrices [40]. Ces auteurs rejettent ainsi la classification traditionnelle en termes de psychrophiles, mésophiles, psychrotrophes et thermophiles. Les bactéries sont alors classées en quatre groupes : le groupe A appartenant à la famille du *Phosphobacterium phosphoreum* (ayant l'activité maximale à 10°C), le groupe B à la famille des *Vibrio* (25°C), le groupe C aux familles des *Klebsiella p.*, *M. morganii* et *Hafnia alvei* (40°C); et enfin d'autres espèces appartiennent au groupe D (50°C). Ces résultats ont été confirmés par LOPEZ-SABATER et al. en étudiant les effets des bactéries histamino-formatrices sur le thon, la bonite et le maquereau [41]. Ils ont montré que les échantillons frais venant du marché, ne présentant pas de grande quantité détectable d'histamine, formaient en 18 heures d'incubation à la température de 27°C, 1415 à 2765 ppm d'histamine à cause de l'activité de certaines bactéries du groupe C. Ces résultats avaient déjà été trouvés par TAYLOR et al. quelques années avant [42]. Plus tard, KIM et al. ont montré que les bactéries *Morganella morganii* et *Proteus vulgaris* étaient les principales responsables de la production de l'histamine lors de la conservation du maquereau du Pacifique à 25°C [43]. Ils ont montré aussi que l'activité histamino-productrice diminuait au fur et à mesure que l'on abaissait la température. Ainsi, pendant qu'il se formait 2830 ppm en 2 jours à la température de 25°C, ils ne trouvaient plus que 575 ppm en 14 jours à la température de 4°C. A 0°C, l'activité bactérienne était totalement inhibée. Dans le

même ordre d'idée, KANKI et al. ont mis en évidence le rôle histamino-producteur du *Phosphobacterium phosphoreum* à la suite d'une intoxication à l'histamine [44]. Pour cela, un homogénat de sardine étant contaminé avec ces germes et gardé pendant 12 heures à 20°C, ils ont constaté une élévation de 546 ppm à la fin de l'expérience. En comparant l'activité de *P. phosphoreum* à celle de *M. morganii* en fonction de la température, il est ressorti qu'entre 20 et 27°C, la bactérie *M. morganii* produisait plus d'histamine que *P. phosphoreum*. Cette tendance était inversée quand on abaissait la température de 12 à 4°C. Les bactéries n'ont donc pas les mêmes températures d'activité maximale. Ces chercheurs ont prouvé également que le taux d'histamine dépendait de la concentration des bactéries dans l'échantillon. Ces résultats ont été confirmés par BERMEJO et al. lors de la caractérisation des bactéries histamino-formatrices sur le maquereau (*Trachurus symmetricus*) [45]. De même, les travaux de SUMNER, ROCHE et TAYLOR sur le fromage suisse ont montré que la bactérie *Lactobacillus buchneri* était un important producteur d'histamine, et la quantité d'histamine produite était proportionnelle à sa concentration [46]. Cette bactérie présentait d'ailleurs la particularité d'être stable au chauffage jusqu'à 49°C. En revanche, les études de LOPEZ-SABATER et al. ont montré que *Plesimonas shigelloïdes* était l'une des rares bactéries associées à l'environnement marin [41]. Ils expliquent donc la multitude de bactéries histamino-productrices pendant la période post-mortem par une contamination ultérieure du poisson. Cette contamination est favorisée par une mauvaise tenue ou manipulation des produits. Ces études ont été justifiées par les travaux de FRANK et YOSHINAGA [47] suivis de ceux de SUBBURAJ et al. [48] estimant que les bactéries histamino-productrices n'occupent que 1% de la surface de la microflore du poisson frais. Effectivement, ces chercheurs ont trouvé plusieurs germes de bactéries histamino-productrices dans les paniers à poisson, les glaces, le plancher du marché et les eaux utilisées pour rafraîchir le poisson.

HARDY et SMITH ont constaté que le taux d’histamine était 10 fois plus élevé dans le maquereau non éviscéré et conservé à la température ambiante [49]. Aussi, conseillent-ils d’éviscérer les gros poissons avant leur congélation. En effet, l’intérieur de la grande masse de poisson entretient longtemps une température élevée, permettant aux bactéries contenues dans les viscères de produire de l’histamine. Ces résultats ont été confirmés par les travaux d’AHMED et al. montrant que la croissance bactérienne des principaux agents producteurs de l’histamine ne cesse qu’à des températures très basses [50]. De même, KIM et al. indiquent que l’activité de la plupart des bactéries n’est inhibée qu’en dessous de 0°C [43]. Par ailleurs, FLETCHER et al. ont montré que, contrairement aux températures très basses qui provoquent l’hibernation des bactéries, les températures élevées (au dessus de 70°C) détruisent les bactéries [51]. Ces chercheurs ont en effet constaté une réduction considérable du nombre de bactéries lors du fumage du poisson.

En dehors des produits halieutiques, des investigations ont été menées sur la conservation d’autres types de produits dont le fromage, le vin et les produits sanguins. Citons par exemple les travaux de LEHTONEN qui montraient que le vin rouge contenait plus d’amines que le vin blanc [52]. Cependant, plus tard, JIMENEZ et al. prouvaient que l’accumulation d’amines biogènes ne dépendait pas de la turbidité du vin et que l’histamine était dégradée à la fin du vieillissement alors que la cadavérine et la putrescine ne l’étaient pas [53]. Néanmoins, la concentration d’histamine lors du vieillissement dépassant 8 ppm pourrait exhiber l’effet de potentialisation de la cadavérine et la putrescine et causer des malaises chez certaines personnes.

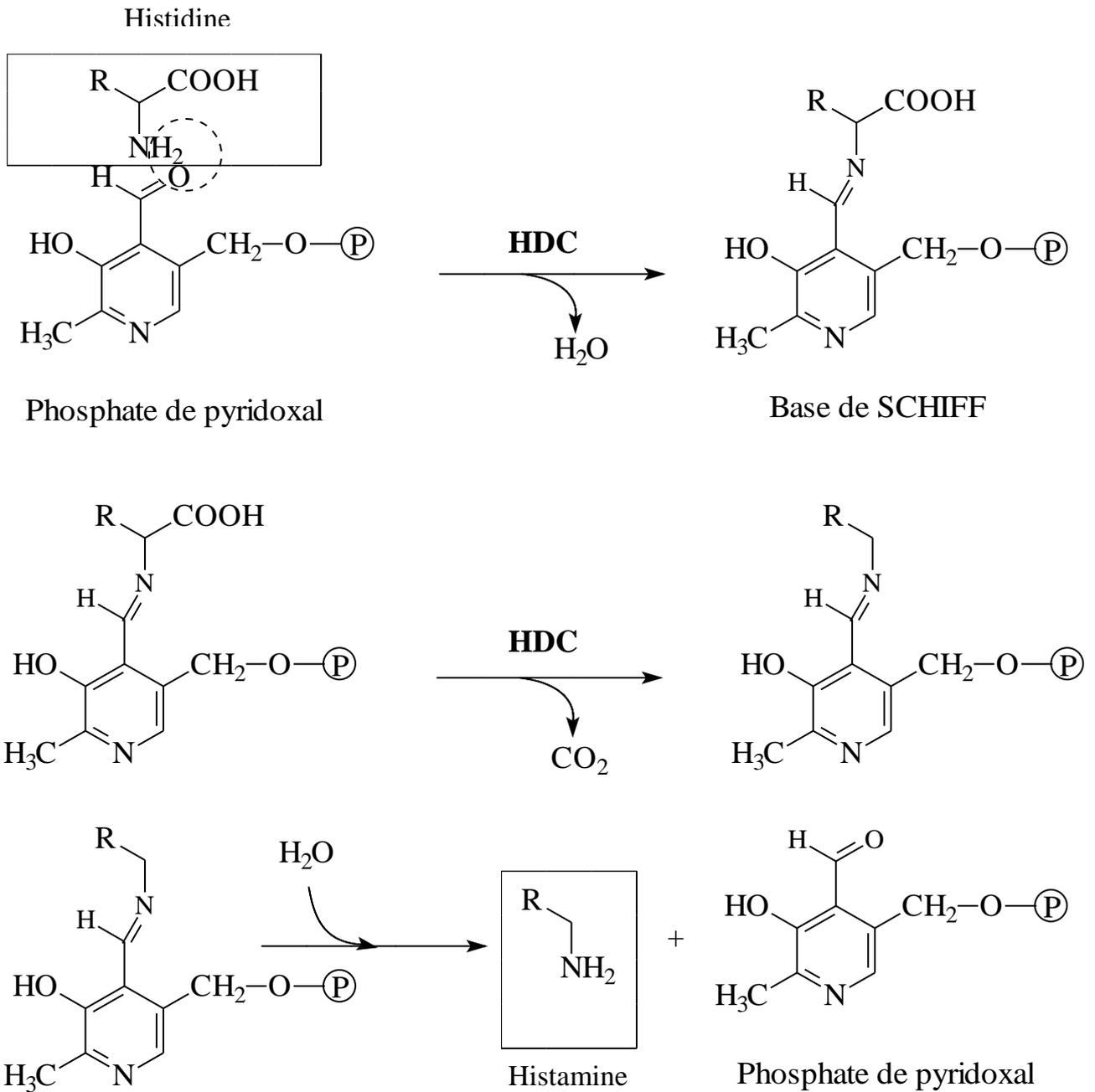
Dans le domaine hospitalier, NIELSEN et al. ont trouvé que le taux d’histamine devenait 20 fois plus important dans le sang lorsque celui-ci était

conservé à 4°C durant 35 jours [54]. Ainsi, certains malaises de la transfusion sanguine trouvent leur explication dans l'accumulation de l'histamine au cours de la conservation des produits sanguins. Puisqu'il n'est pas envisageable de conserver ces produits aux températures plus basses (inférieures à 4°C), il serait donc préférable de transférer aux malades à risque (asthmatiques, cardiaques...) des produits relativement frais pour éviter des effets secondaires.

3. Mécanisme de formation de l'histamine pendant la période post-mortem du poisson

L'histamine est une amine biogène. En effet, elle dérive de la décarboxylation d'un acide aminé naturel dénommée histidine (**voir schéma 3**). Il existe un mécanisme enzymatique de transformation des α -aminoacides naturels en amines correspondantes par décarboxylation. Les enzymes responsables de cette réaction sont les *décarboxylases*. Elles bénéficient toutes, de l'assistance du même coenzyme: le phosphate de pyridoxal. En plus, la base de SCHIFF résultant de la condensation entre l'acide aminé et le phosphate de pyridoxal constitue le premier intermédiaire réactionnel. Ce dernier donne un deuxième intermédiaire réactionnel suite au dégagement d'une molécule de dioxyde de carbone. La réaction se termine alors par l'hydrolyse qui régénère le coenzyme en libérant l'amine (**schéma 3**). Certaines de ces amines ont un rôle physiologique ou pharmacologique important. C'est pourquoi, on leur attribue le nom d'amines biogènes. C'est ainsi que la sérine conduit selon ce mécanisme à l'éthanolamine, composante des phosphatides. La 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) fournit la dopamine, précurseur de l'adrénaline. L'histidine, sous l'action de l'enzyme appelé *histidine décarboxylase* (HDC), donne naissance à l'histamine dont l'action hypotensive a été prouvée, ainsi que les rôles importants dans le système

immunitaire et le cycle de l'éveil-sommeil [55]. L'*histidine décarboxylase* est présente dans les tissus d'animaux et surtout dans les micro-organismes. C'est pourquoi les bactéries telles que *Morganella morganii*, *Klebsiella oxycota*, *Klebsiella pneumonia* [13] ont été identifiées pour leur activité histamino-productrice dans le thon (*Thunnus thynnus*). Ces bactéries ne vivant que dans les températures bien déterminées, la présence de l'histamine dans le tissu du poisson dépend donc de la teneur en histidine et de la température de conservation [56]. De tels poissons, lorsqu'ils sont mal conservés, peuvent être le siège d'une augmentation rapide du taux d'histamine les premiers jours. Cependant, les travaux de ROLLAN et al. ont prouvé qu'à partir d'un certain taux, la quantité importante d'histamine joue un rôle inhibiteur sur l'effet catalytique de l'*histidine décarboxylase* [57]. Ceci explique la teneur élevée mais presque constante de l'histamine dans le poisson mal conservé.



Avec $R = C_4H_5N_2$; $(P) = H_2PO_3$ et **HDC** = *histidine décarboxylase*

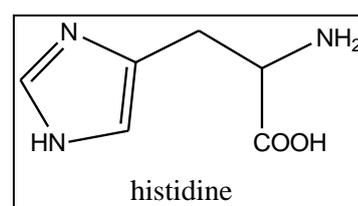
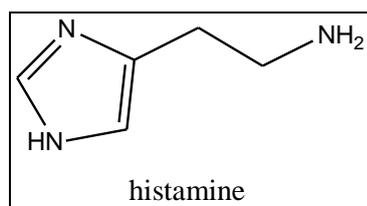


Schéma 3 : Formation d'une amine à partir de l'acide aminé correspondant sous l'action de la décarboxylase [55].

4. Produits alimentaires susceptibles de contenir un taux élevé d’histamine

I)

Connaissant le mécanisme de formation de l’histamine et des autres amines biogènes, il est normal de penser que tous les aliments riches en protéines peuvent présenter un taux élevé d’histamine. En effet, des teneurs importantes d’histamine ont été déterminées dans pratiquement tous les genres de produits alimentaires : tomate, fromage, vin, bière, viande, poisson de mer et d’eau douce...[46, 52, 53, 58-62]. Cependant, comme nous l’avons vu en introduction, la plupart des intoxications répertoriées sont liés à la consommation de certaines espèces de poisson appartenant aux familles suivantes : Scombridés (thon, bonite, maquereau), Scombérésocidés (saurel), Clupéidés (hareng, sardine), Coryphénidés (mahi-mahi), Pomatomidés (tassergal), Carangidés (chinchard), Engaulidés (anchois), Xiphiidés (espadon), Istiophoridés (voilier, marlin) [4, 18, 34, 35, 41-45, 56, 63-65], (voir le **tableau 1**). Ainsi, les poissons nobles contiennent peu d’histidine et pas de bactéries histamino-productrices.

A partir de ces informations, les pays adoptent des réglementations et des recommandations pour assurer aux consommateurs la bonne qualité de produits, sur la base des critères HACCP (Hazard Analysis Control Critical Points). On peut citer en exemple le Canada dont le programme de gestion de la qualité (P.G.Q.) comprend un ensemble de règles applicables aussi bien par les producteurs locaux que les importateurs de produits alimentaires. L’Agence Canadienne d’Inspection des Aliments (A.C.I.A.) intervient régulièrement et inopinément pour veiller au respect accordé au P.G.Q. [66].

Tableau 1 : Principales espèces de poisson à fort taux d’histamine [65].

Familles de poissons	Noms scientifiques	Noms usuels
Scombridés	<i>Thunnus albacores</i>	Albacore
	<i>Thunnus atlanticus</i>	Thon noir de l’Atlantique
	<i>Thunnus maccoyii</i>	Thon rouge du sud
	<i>Thunnus obesus</i> ou <i>Parathunnus mebachi</i>	Thon obèse, Patudo
	<i>T. thynnus thynnus</i>	Thon rouge de l’Atlantique
	<i>T. thynnus orientalis</i>	Thon rouge du Pacifique
	<i>Thunnus tongool</i>	Thon mignon
	<i>Thunnus alalunga</i>	Thon blanc, Germon
	<i>Euthynnus pelamis</i> ou <i>Katsuwonus pelamis</i>	Bonite à ventre rayé, Listao
	<i>Euthynnus affinus</i>	Thonine orientale
	<i>Euthynnus alletteratus</i>	Thonine commune
	<i>Euthynnus lineatus</i>	Thonine noire
	<i>Allothunnus fallai</i>	Thon élégant
	<i>Auxis rochei</i>	Bonitou, Melva
	<i>Auxis thazard</i>	Bonitou, Auxide
	<i>Sarda sarda</i>	Bonite à dos rayé
	<i>Sarda orientalis</i>	Bonite orientale
	<i>Sarda chiliensis</i>	Bonite du Pacifique est
	<i>Sarda australis</i>	Bonite bagnard
	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau
	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol
<i>Scomberomorus cavalla</i>	Thazard serra	
<i>Scomberomorus maculatus</i>	Thazard de l’Atlantique	
<i>Scomberomorus regalis</i>	Thazard franc, Th. sauteur	
<i>Scomberomorus sierra</i>	Thazard du Pacifique	
Scomberesocidés	<i>Scomberesox saurus</i>	Saurel, Balaou de l’Atlantique
	<i>Cololabis saira</i>	Scombérésocé
Pomatomidés	<i>Pomatomus saltatrix</i>	Tassergal
Coryphenidés	<i>Coryphaena hippurus</i>	Grande coryphène
	<i>Coryphaena sexalatus</i>	Petite coryphène

Tableau 1 suite: Principales espèces de poisson à fort taux d’histamine [65].

Carangidés	Trachurus trachurus ou Trachurus japonicus	Chinchard commun, Saurel moyen
	Trachurus symmetricus	
	Seriola rivoliani ou S. colburni	Sériole limon
	Seriola dorsalis ou Seriola grandis	Sériole chicard
	Seriola dumerili	Sériole couronnée
Clupéidés	Clupea harengus	Hareng de l’Atlantique
	Clupea pallasii	
	Clupea sprattus	Sprat
	Sardinops sagax	Sardine du Pacifique
	Sardinops melanostictus	
	Sardina pilchardus	Sardine commune, Pilchard
	Sardinella aurita	Allache, Sardinelle
Sardinella anchovia	Allache, Sardinelle	
Engraulidés	Engraulis encrasicolus	Anchois commun
	Engraulis mordax	
	Centengraulis mysticetus	
Xiphiidés	Xiphias gladius	Espadon
Istiophoridés	Istiophorus sp.	Voilier
	Makaira sp.	Makaire, Marlin

5. Actions de l'histamine dans l'organisme

L'histamine est obtenue dans l'organisme soit par synthèse dans les mastocytes (histamine endogène), soit à partir de l'alimentation (histamine exogène). Grâce à la circulation sanguine, l'organisme réagira à la présence de l'histamine quand celle-ci rencontrera les récepteurs synaptiques.

Beaucoup de travaux ont montré qu'à faible dose, l'histamine joue un rôle bénéfique dans le système nerveux en qualité de neurotransmetteur. En effet, elle est liée à une variété de fonctions neurologiques telles que le contrôle de l'éveil, l'attention, la connaissance, le processus sensoriel et la sécrétion de certaines hormones pour le contrôle de l'appétit [67]. MIN CHU et al. [68] ont étudié la libération in vivo de l'histamine dans le cortex frontal des rats en semi-liberté. Leur étude a montré que pendant l'éveil, le taux d'histamine libéré est 3,8 fois plus important que pendant le sommeil. Les résultats de MIN CHU et al. en rapport avec l'intervention de l'histamine dans le cycle éveil-sommeil ont été confirmés par les travaux de RAMESH et al. [69] qui ont prouvé également l'influence de l'histamine sur l'éveil des rats maintenus en liberté de mouvement. Pendant que FURITANI et al. ont montré que l'histamine intervient dans la sécrétion de l'acide gastrique, l'étude menée par HUNG et WANG sur les rats estime que l'histamine joue un rôle important dans la modulation de la perméabilité microvasculaire gastrique [70, 71]. Egalement, l'effet de l'histamine sur la contraction des éléments pulmonaires des veaux en croissance a été étudié. Il s'avère que l'histamine provoque une dilatation plus importante que l'effet de la meta-choline ou du chlorure de potassium. C'est pourquoi JOLLY et al. [72] ont proposé l'utilisation de l'histamine pour le traitement de l'œdème pulmonaire chez les veaux. De la même façon, PIETRINI et al [73] ont montré que l'histamine, à faible dose, pourrait être utilisée dans le traitement des migraines.

Ces quelques effets apparemment bénéfiques de l'histamine ne suffisent pas à masquer son caractère toxique. En effet, à la suite d'une allergie ou de l'ingestion d'une forte concentration de l'histamine, celle-ci se fixe sur ses récepteurs (H1, H2 ou H3) [9, 67]. Les travaux de CHOICH et al. [74] ont montré que l'absorption d'une forte dose d'histamine provoque chez les mammifères des désagréments, en augmentant la dilatation et la perméabilité vasculaire. Certains symptômes apparents tels que les palpitations, les picotements de la peau, l'enflure du visage, l'étourdissement, la nausée, les vomissements, la diarrhée, la sensation de brûlure dans la gorge, les douleurs abdominales interviennent immédiatement ou quelques heures après l'intoxication. Ces symptômes peuvent durer quelques heures, voire quelques jours [75, 76]. Dans les cas extrêmes, une intoxication à l'histamine peut aboutir aux complications respiratoires (bronchospasmes,...) et cardiaques chez les individus présentant les prédispositions [12, 77]. De tels cas peuvent alors devenir fatals.

Notons qu'un taux élevé d'histamine peut être observé dans le sang à la suite d'une vaccination et d'une déficience en vitamine C. En effet, l'injection des protéines étrangères du vaccin peut causer la libération d'histamine endogène, conduisant à la fragilisation des vaisseaux capillaires surtout chez le bébé. Ceci peut avoir pour conséquence le syndrome du bébé agité accompagné de symptômes tels que des hématomes et des hémorragies rétinales sans aucun traumatisme physique majeur. L'administration de la vitamine C pendant la vaccination pourrait prévenir ces effets selon CLEMETSON [78]. Dans le même sens, PREVIATI *et al.* [79] ont établi un lien entre le taux d'histamine dans le sang intestinal (colon) et la présence d'une tumeur primaire cancéreuse. Ils ont montré que le taux d'histamine au niveau du colon était plus élevé chez les individus sains que chez les malades. Aussi, le taux d'histamine pourrait-il servir au dépistage du cancer du colon.

6. Limite de tolérance de l’histamine dans les aliments

La réponse de l’organisme suite à l’ingestion d’un aliment riche en histamine dépend de l’individu. La limite de tolérance, selon les législations, connaît également des disparités. Elle est particulièrement liée aux habitudes alimentaires adoptées depuis des siècles par les populations. Les travaux de WAHLQVIST *et al.* ont montré que les populations du Pacifique Sud (Nouvelle Zélande, Australie), ainsi que celles du Sud Est asiatique (Thaïlande, Vietnam, Philippines, Malaisie, Chine...) présentent une grande tolérance à l’histamine [80]. La consommation de produits riches en histamine (au dessus de 500 ppm) est courante dans ces régions. Ces auteurs ont déterminé des taux d’histamine dans plusieurs produits dérivés du poisson venant des détaillants asiatiques. La plupart des produits analysés avaient un taux d’histamine supérieur à la limite imposée qui est de 100 ppm. Ces taux variaient entre 180 et 320 ppm. Il existe donc des risques réels de santé publique lorsque ces produits sont consommés en grande quantité. Ces taux élevés d’histamine s’expliquent par le procédé utilisé pour l’obtention de ces produits. En effet, dans ces régions, le poisson cru est mariné avec du sel sur une très longue durée allant jusqu’à 18 mois. A l’issue de ce processus, des sauces ou des pâtes aromatiques obtenues sont destinées à rehausser la saveur des aliments. Au Vietnam par exemple, la sauce obtenue appelée NUOC-MAM est très prisée. On estime à 250.000 tonnes la production annuelle de ces sauces au Sud-Est asiatique [35]. Ceci explique pourquoi le taux d’histamine dans ces produits est très élevé et la législation moins sévère. L’intoxication non observée malgré le fort taux d’histamine s’explique en partie par les travaux de Taylor *et al.* indiquant que l’excès d’histamine alimentaire est dégradée dans le tube digestif par des enzymes telles que la *diamine oxydase* (DAO) et l’*histamine méthyltransférase* (HMT) [5]. Le **schéma 4** résume les diverses réactions qui transforment l’histamine en acide imidazolacétique et en

acide méthylimidazolacétique qui ne sont pas toxiques. De même, Den Brinker et al. supposent que pour résister à cette forte teneur en histamine, les populations asiatiques ont dû développer leur défense naturelle contre l’histamine en augmentant la production de ces enzymes [35]. Ces chercheurs indiquent également qu’en Australie et en Nouvelle Zélande, le taux d’histamine dans les aliments était limité à 100 ppm. Une proposition récente a été faite pour le rehausser à 200 ppm.

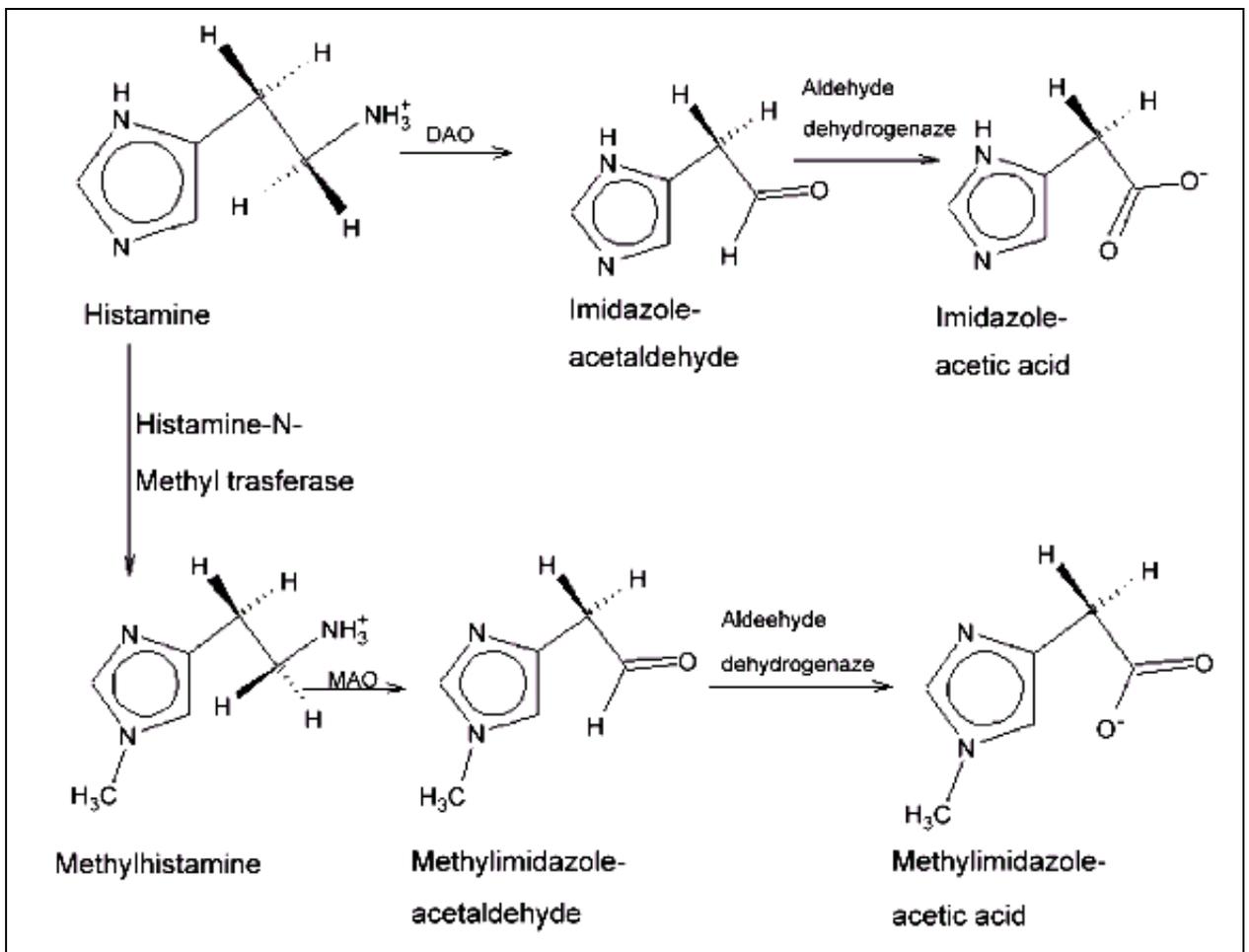


Schéma 4 : Dégradation métabolique de l’histamine par la diamine oxydase (DAO) et l’histamine méthyltransférase (HMT) [5].

Dans tous les cas, les effets néfastes de l’histamine sont observés dès que la capacité protectrice des enzymes (DAO et MAO) est dépassée, provoquant ainsi un excès d’histamine dans le sang. Ainsi, CINQUINA *et al.* notent que l’ingestion de 70 à 1000 mg d’histamine par repas peut provoquer une intoxication. L’Union Européenne stipule que : sur 9 échantillons de poissons prélevés dans un container, le taux moyen d’histamine ne doit pas excéder 100 ppm [18]. C’est le taux accepté dans la plupart des pays. Cependant, c’est aux Etats-Unis que nous rencontrons le taux le plus bas (50 ppm). En effet, l’existence de taux très faibles d’histamine dans certains produits halieutiques peut également présenter des risques pour des personnes sensibles, car la présence de certains potentialisateurs tels que la cadavérine et la putrescine peut rendre toxique une concentration relativement basse d’histamine [35, 81, 82]. C’est pourquoi les études menées par BARTHOLEMEW *et al.* sur les intoxications histaminiques survenues en Grande Bretagne ont montré que 39% de poissons dont le taux d’histamine était inférieur à 50ppm avaient causé des symptômes caractéristiques de l’intoxication en histamine [83].

7. Traitement des patients victimes d'intoxication à l'histamine

Le recours au traitement suite à une intoxication à l'histamine n'est pas toujours nécessaire. En effet, les symptômes légers dus à l'intoxication mineure disparaissent au bout de quelques heures voire quelques jours. Cependant, lorsque le malaise est sévère ou encore lorsque le cas est critique, on utilise des antihistaminiques. Lors du traitement de l'intoxication histaminique, il est nécessaire de ne pas dépasser la dose du médicament mais aussi de ne pas mélanger certains d'entre eux. En effet, les travaux de LLENAS et al. ont montré un possible rapport entre l'histamine, les antihistaminiques et les arythmies cardiaques sévères [84]. Elles sont dues à une libération locale de l'histamine par les antihistaminiques. Le tableau suivant (**tableau 2**) montre les différents antihistaminiques utilisés pour le traitement des symptômes causés par l'excès d'histamine [65].

Tableau 2 : Quelques antihistaminiques utilisés et leurs posologies [65].

Famille chimique	Dénomination commune	Dénomination commerciale	Posologie (mg/jour)	Voies d'administration
Ethanolamine	Diphenhydramine	ALLERGA,	45-250	Orale, rectale
	Carbinoxamine	NAUTAMINE	6-12	Orale
	Doxylamine	ALLERGEFON	13-25	Orale
	Clémastine	MEREPRIME TAVEGYL	1-4	Orale
Ethylènediamines	Mépyramine	PYRILAMINE, NEOANTERGAN		
	Hystapyrodine	DOMISTAN	50-150	Orale
Propylamines	Dexchlorphéniramine	POLARAMINE	6-12	Orale, parentérale
	Bromphéniramine	DIMEGAN	12-32	Orale
	Tripolidine	ACTIDILON	5-10	Orale

Tableau 2 suite : Quelques antihistaminiques utilisés et leurs posologies [65].

Famille chimique	Dénomination commune	Dénomination commerciale	Posologie (mg/jour)	Voies d'administration
Phénothiazines	Prométhazine	PHENERGAN	50-150	Orale, rectale, parentérale
	Oxoméazine	DOXERGAN	10-40	Orale
	Méquitazine	PRIMALAN	5-10	Orale
	Alimémazine	THERALENE	5-40	Orale, parentérale
	Isothipendyl	ANDATOL	12-24	Orale
	Dimétiotiazine	MIGRISTENE	20-80	Orale
Pipérazines	Chlorcyclizine	DIPARALENE	50-100	Orale
	Buclizine	LOGIFENE,	25-100	Orale
	Cinnarizine	APHILAN	20-60	Orale, rectale
	Cyclizine	STUGERON,	50-300	Orale
	Hydroxyzine HCl	MIDRONAL	50-100	Orale, parentérale
	Mécozine	MARZINE ATARAX POSTAFENE		
Pipéridines	Cycloheptadine	PERIACTINE	4-16	Orale
	Azatadine	IDULAN	1-2	Orale
	Cimétidine	TAGAMET	1000	Orale, parentérale
	Ranitidine	RANIPLEX, AZANTAC	150-300	Orale, parentérale
	Mizatidine	NIZAXID	150-300	Orale, parentérale
	Famotidine	PEPDINE	20-80	Orale, parentérale

8. Interactions médicaments-aliments : agents potentialisateurs de l'histamine

Certains travaux ont montré que les amines jouant un rôle potentialisateur telles que la cadaverine (métabolite de la lysine) et la putrescine (métabolite de l'ornithine) accentuent la toxicité de l'histamine. En effet, une forte concentration de l'une de ces amines suffit pour qu'une faible quantité d'histamine devienne toxique : la cadaverine et la putrescine empêchent la dégradation de l'histamine par les enzymes intestinaux. Les travaux de EITENMILLER et al. confirment le rôle de la cadaverine et de la putrescine dans l'inhibition des enzymes DAO et HMT [85]. Cependant, si on sait que la cadaverine et la putrescine augmentent la toxicité de l'histamine, il n'existe pas une relation linéaire entre le taux de l'histamine et ceux de la cadaverine et de la putrescine, car plusieurs processus entrent en compétition dans la formation de ces amines [86]. A titre d'exemple, BARTHOLOMEW et al. ont réalisé en 1987 une étude sur les intoxications à l'histamine survenues en Grande Bretagne [83]. Ils ont travaillé sur 240 échantillons de poissons suspects parmi lesquels 101 présentaient un taux d'histamine supérieur à 50 ppm. Malgré tout, certains poissons dont le taux d'histamine était inférieur à 50 ppm avaient causé des symptômes caractéristiques de l'intoxication à l'histamine : ce fait étant attribué à la présence de potentialisateurs de l'histamine. En dehors de la cadaverine et de la putrescine, il existe beaucoup d'autres potentialisateurs de la toxicité de l'histamine. Pendant que LEHANE et OLLEY [12] indiquent que l'acide urocanique (cis) serait un potentialisateur de l'histamine, STTRATON et al. [87] montrent que les médicaments antipaludéens et antituberculeux exacerbent la toxicité de l'histamine. Ceci est vérifié par les travaux de HUI et TAYLOR qui ont trouvé qu'un mélange de l'histamine et de ces inhibiteurs permettait de retrouver la totalité de l'histamine non métabolisée dans les urines et les matières fécales des rats [82].

Dans le même sens, notons que le citron ou le vinaigre utilisé pour rehausser la saveur du poisson pourraient affecter le pH intestinal, inhiber ainsi les enzymes de dégradation, et donc favoriser l'absorption de l'histamine [12].

9. Recommandations

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la manière dont les produits alimentaires sont manipulés influence beaucoup l'hygiène. En effet, il peut en résulter soit une contamination bactérienne, soit une variation de température conduisant à la production accélérée de l'histamine. Dans le but de minimiser les risques relatifs à l'ingestion d'histamine, nous rappelons ici quelques comportements qu'il est tenu de respecter [1, 88]:

- Mettre les produits de la pêche au froid dès que possible, après la capture, pour éviter la multiplication des bactéries et la contamination.
- Eviscérer les gros poissons avant leur congélation. En effet, les bactéries histaminogènes sont en grande partie dans les viscères et la grande masse du poisson leur assure une température élevée, même après le début de congélation externe.
- Régler la température du réfrigérateur à 4°C et celle du congélateur à -18°C au plus.
- Se laver les mains au savon avant et après préparation des produits de la mer.
- Désinfecter les comptoirs, les planches à couper et les ustensiles avec une solution d'eau de Javel pour tuer les bactéries à la surface.

- Dans l'achat du poisson, faire attention à l'emballage, à toute moisissure, à la décoloration, aux odeurs et textures inhabituelles, car un doute sur la qualité du poisson impose qu'on le jette aux ordures.
- Effectuer le dégel des aliments au réfrigérateur et non à la température ambiante qui occasionne le regain d'activité et par conséquent la multiplication des bactéries. Ainsi, le temps précédant la cuisson doit être relativement court. La même précaution est indispensable pour l'après-cuisson.
- Avoir un temps de cuisson suffisamment long avec une température interne dépassant au moins 70°C afin que la destruction des germes bactériens soit possible.
- Faire attention aux fruits de mer à coquillages bivalves tels que les moules et les huîtres qui ne sont comestibles que lorsqu'ils sont cuits ne demeurant plus fermés (coquillages ouverts).
- Tenir à l'écart les aliments, les uns des autres d'une part et séparer systématiquement ceux qui sont cuits de ceux qui sont crus d'autre part.
- Au moment de l'achat, s'assurer que le poisson conserve toujours les écailles et les yeux brillants, la chair ferme et solidaire au squelette et les écailles solidement fixées à la peau. En effet, l'odeur ne saurait être un critère fiable de sélection car la décomposition peut être largement avancée sans que la perception en soit possible par l'odorat.
- A savoir également que la cuisson n'élimine que les bactéries mais non pas la toxine ou certaines variétés chimiques.

10. Méthodes d'extraction d'histamine

Le dosage de l'histamine nécessite une extraction suivie d'une purification pour éviter les phénomènes d'interférence. Différentes procédures sont employées pour éliminer les autres amines et aminoacides qui ont des propriétés physico-chimiques semblables à celles de l'histamine. Selon la méthode utilisée pour doser l'histamine, les composés suivants peuvent gêner le dosage : l'histidine, le tryptophane, la tyramine, la spermidine, la spermine, ... [89].

Plusieurs solvants ont été utilisés pour extraire l'histamine parmi lesquels nous citons le n-butanol, le méthanol, l'heptane, l'acétonitrile et l'acide trichloroacétique [89].

Lorsque l'extraction de l'histamine est faite dans un mélange de 75% de méthanol dans l'eau, la procédure utilisée est la suivante : 10 g d'échantillon sont homogénéisés pendant 2 minutes avec 60 mL de méthanol à 75%. Le mélange est transféré dans une fiole de 100 mL. Le réservoir du mixeur est rincé avec du méthanol à 75% pour récupérer le reste de l'échantillon qui est ajouté dans la fiole de 100 mL. La fiole est placée dans un bain marie à 60°C pendant 15 minutes. Après le bain marie, la fiole repose à la température ambiante et son volume est complété au trait de jauge avec du méthanol à 75%. Il faut ensuite agiter et filtrer. Dans ces conditions, l'extrait au méthanol obtenu est stable pendant au moins 4 mois lorsqu'il est réfrigéré [86].

Pour traiter l'extrait d'histamine au méthanol à 75%, 10 mL de cet extrait sont pipetés dans une grande fiole. 1 mL d'hexanediamine et 0,5 mL d'acide chlorhydrique (HCl 1N) y sont ajoutés. Une évaporation à sec est effectuée avec un rotavapor entre 50 et 60°C. Après évaporation totale de solvants, ajouter 2 à 3 mL d'eau que l'on fait évaporer à nouveau après agitation. Cela permet d'éliminer l'acide chlorhydrique et assurer le séchage de l'extrait. Cet extrait sec est stable 3 jours durant. Le traitement de l'échantillon se poursuit par l'ajout de 1 mL

d'acétate d'éthyle au résidu sec et 300 μL d'anhydride pentafluoropropionique. Après avoir bouché la fiole contenant le mélange ci-dessus, on agite tout en chauffant à 50°C au bain-marie, et le mélange tourne généralement au jaune. En effet, un mélange clair indique la présence de traces d'eau. Dans ce cas, il faut procéder de nouveau à l'évaporation puis à la purification du mélange réactionnel dans les deux heures qui suivent la sortie du dernier bain marie [86].

D'autres méthodes d'extraction débutent par la phase de déprotéinisation grâce à un acide. Dans ce cas les tissus ou liquides biologiques sont homogénéisés dans 9 à 10 volumes d'acide. C'est l'étape de déprotéinisation. L'acide le plus couramment utilisé est l'acide perchlorique. Les acides phosphorique, chlorhydrique et trichloracétique peuvent être également employés. La suspension ainsi obtenue est décantée avant d'être centrifugée. Le surnageat est récupéré, filtré si nécessaire et transféré dans un récipient contenant le solvant d'extraction de nature organique, parfois mélangé à la soude et/ou au chlorure de sodium [90]. Un lavage supplémentaire par de la soude saturée au chlorure de sodium permet d'éliminer de l'histidine présumée [91]. L'acidification de l'extrait permet ainsi de récupérer l'histamine dans la phase aqueuse.

La purification peut être poussée grâce à l'emploi d'une colonne chromatographique équipée d'une résine adéquate échangeuse d'ions selon le pH tampon choisi. C'est le cas des résines IRC-50, Amberline GC-50, DOWEX-1, Cellex-P, Cellulose-phosphatée... Les solutions tampons sont préparées à base de phosphates, acétates, borates etc [10].

11. Travaux sur les dérivés de l'histamine et ses agents de dérivatisation en fluorescence

Beaucoup d'agents fluorogènes sont utilisés pour la dérivatisation de l'histamine. Parmi lesquels nous avons : l'orthophthalaldéhyde (OPA), la fluoresceine, la fluoescamine, le chlorure de dansyl, le chlorure de 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD), etc. L'histamine est une molécule qui contient des fonctions amines primaire et secondaire. Beaucoup de travaux ont montré que ces fluorogènes réagissent sur les amines primaires et/ou secondaires. Les travaux de BENSON et HARE indiquent que les fluorophores formés entre les amines primaires et l'OPA exhibent une fluorescence 5 à 10 fois plus intense que ceux formés avec la fluoescamine [92]. En plus, tous ces fluorophores auraient leurs maxima de fluorescence dans l'intervalle de pH compris entre 9 et 11. Cependant, ni l'OPA, ni la fluoescamine ne forment des fluorophores avec les amines secondaires. La cinétique de réaction de la fluoescamine avec les amines primaires ainsi que son hydrolyse ont été étudiées [93]. Ces travaux ont montré que l'hydrolyse de la fluoescamine était d'ordre 1, et dépendait également du pH et du rapport des solvants (organique/eau). C'est en particulier cette hydrolyse de la fluoescamine dans l'eau qui rend difficile son emploi comme agent de dérivatisation.

Egalement, CSAMPAI *et al.* ont étudié la stœchiométrie, la stabilité et le mécanisme de formation des dérivés formés par l'orthophthalaldéhyde (OPA) et l'histidine [94]. Leurs travaux ont montré que l'histidine donne plusieurs dérivés avec l'OPA. A partir du dérivé initialement formé de type isoindolique, il se produit la fixation d'une seconde molécule d'OPA quand on élève la température jusqu'à 50°C. L'action de l'OPA sur l'histidine donne lieu alors à une structure classique isoindolique et une autre structure englobant deux molécules d'OPA. Le rapport entre la quantité du dérivé initialement formé et de la seconde structure

dépend de la température. Cela serait dû au fait qu'à la température élevée, il se produirait un réarrangement intramoléculaire semblable à la tautomérie. Plus la température est élevée, plus la seconde espèce est importante. Les études ont montré que la stœchiométrie de la seconde espèce est de deux molécules d'OPA pour une molécule d'histidine. La stœchiométrie du second complexe est donc de type 2:1, ceci étant confirmé par le spectre de masse.

De même, le rôle de l'OPA en qualité de désinfectant a été étudié d'une part par SIMOES *et al.* [95] et d'autre part par WALSH *et al.* [96]. Les deux groupes ont tous montré que certains microorganismes résistant au glutaraldéhyde tels que les mycobactéries *Bacillus subtilis* sont traités avec succès par l'orthophthalaldéhyde. En plus, en étudiant le mécanisme de l'action antibactérienne de l'OPA, WALSH *et al.* ont confirmé que l'OPA réagissait fortement avec les groupes amines (surtout primaires) des membranes cellulaires périphériques. Ils ont montré également que la vitesse de cette réaction est accélérée par l'élévation du pH, traduisant la coloration des produits formés plus intense en milieu basique [97].

Pendant que certains chercheurs ont proposé une méthode de calcul des pKa de l'histamine par la décomposition de l'énergie libre de GIBBS en trois termes : thermique, électronique et de solvation [98], d'autres ont isolé des enzymes spécifiques à l'histamine tels que l'*histamine oxydase*. Cet enzyme aurait la propriété d'être thermostable jusqu'à 65°C [99]. D'autres études récentes sont orientées sur les propriétés spectrales vibrationnelles des complexes formés entre des métaux et l'histamine. Parmi celles-ci, nous notons les travaux de DROZDZEWSKI *et al.* [100] qui ont utilisé comme métal le palladium, et ceux de BIVIAN-CASTRO *et al.* [101] qui ont utilisé le cuivre.

12. Méthodes de dosage de l'histamine

L'histamine étant rangée parmi les composés biologiques, du fait de sa nature, ce sont les méthodes biochimiques qui ont longtemps été employées pour son identification et sa détermination quantitative. Il s'agit en particulier des méthodes immunologiques, enzymatiques et radioenzymatiques.

L'apparition de la première méthode fluorimétrique date de la fin des années cinquante [31]. Elle a été élaborée par SHORE en 1959 [91]. Depuis lors, beaucoup d'autres procédés, portant essentiellement sur l'amélioration des critères tels que la fiabilité, la précision et la rapidité ne cessent d'attirer l'attention et l'intérêt du public.

a) Méthodes immunologiques et enzymatiques

Les méthodes immunologiques reposent sur la réaction mettant en jeu les anticorps et les antigènes. Le rôle d'antigène est tenu par la substance à doser. La réaction donne lieu à un complexe coloré dont l'intensité est en relation simple avec la quantité de substrat.

Les méthodes enzymatiques quant à elles exploitent l'intervention du substrat à doser dans la cinétique d'une réaction engageant un enzyme. Ainsi, pour une quantité d'enzyme fixée, la vitesse initiale de réaction sera proportionnelle à la quantité de substrat.

Par ces techniques, certains auteurs font état de travaux de détermination du taux d'histamine. C'est le cas de BRUCE et TAYLOR qui ont dosé l'histamine dans le sang par la méthode enzymatique [102]. Egalement, des chercheurs et industriels ont mis sur le marché plusieurs tests exploitant ces méthodes de dosage [103].

Cependant, ces méthodes immunologiques et enzymatiques sont difficiles dans leur application :

- L'extraction des anticorps et des enzymes est très difficile ; d'où le problème de leur disponibilité.
- La conservation de ces substances n'est pas non plus facile.
- Les durées d'incubation sont très longues.
- La détermination quantitative des substances à doser n'est pas toujours rigoureuse.

b) Méthodes chromatographiques

En réalité, les techniques de chromatographie ne servent qu'à séparer les substances contenues dans un mélange. Pour la détection et la quantification des analytes, on peut y associer également d'autres techniques dont la spectrométrie de masse, les spectrophotométries d'absorption ou d'émission, l'électrophorèse... On peut donc admettre que les méthodes chromatographiques utilisées actuellement sont mixtes parce qu'impliquant plusieurs principes différents.

α) Méthodes chromatographiques en phase gazeuse (CPG)

Dans ce domaine, on peut parler des travaux de HWANG *et al.* mettant au point une méthode chromatographique en phase gazeuse (CPG) dans laquelle l'histamine est extraite dans le méthanol en milieu alcalin [104]. La détection se fait sans dérivation par spectrographie de masse (CPG/SM). Le nonan-1,9-diol est utilisé comme référence lorsqu'une colonne CP-SIL19CB est adoptée. Ils ont trouvé une limite de détection de 5 ppm. Forts de ces résultats, certains chercheurs ont estimé que le taux d'histamine pouvait être utilisé comme indice de fraîcheur du poisson [105]. L'extraction de l'histamine se fait dans le méthanol légèrement acidifié. Cependant, l'histamine devrait être ionisée dans de telles conditions à

cause de la présence des deux fonctions amines primaire et secondaire que contient celle-ci. Par ailleurs, les molécules chargées sont connues pour être peu volatiles et généralement adsorbées par la paroi de verre de la colonne, donnant ainsi une réponse faible lors de l'analyse directe par chromatographie en phase gazeuse. Ces auteurs ont montré que l'extraction de l'histamine était plus efficace en milieu alcalin.

β) Méthodes chromatographiques en phase liquide à haute performance (HPLC)

Beaucoup de travaux récents font référence à la méthode HPLC pour le dosage de l'histamine, ce qui montre l'intérêt des chercheurs pour cette méthode. Ainsi, BORYCZ *et al.* ont mis en œuvre une méthode d'analyse de l'histamine provenant des drosophiles (mouches) par voie HPLC à détection électrochimique, à la suite d'une dérivatisation de l'histamine par le mélange orthophthalaldéhyde-mercaptoéthanol (OPA-ME) en pré-colonne [8]. Par cette méthode, ils ont mesuré l'histamine contenue dans la tête de ces mouches. En effet, le rôle de l'histamine comme neurotransmetteur a été prouvé au niveau de leurs photorécepteurs. L'étude a montré que le taux moyen de l'histamine des drosophiles était de 20ng/tête. Le choix porté sur ces mouches (*Drosophila melanogaster*) s'explique par la présence du gène mutant JK910 de l'*histidine décarboxylase* (HDC). Ce gène rend l'enzyme incapable de produire l'histamine : l'histamine dosée provient donc du monde extérieur (histamine exogène). Ils ont étudié la stabilité du complexe formé entre l'histamine, l'OPA et le mercaptoéthanol en présence et en absence de la lumière. Il a été prouvé par cette étude que le complexe formé, protégé de l'éclairement direct était stable pendant au moins 60 minutes. En revanche, une exposition à la lumière entraînait une diminution nette du signal (9/10 du signal initial). Auparavant, KURUMA et SAKANO ont réussi à déterminer le taux d'histamine dans les plasmas grâce à la méthode HPLC à

détection de fluorescence post-colonne [27]. En revanche, quelques années après, CHO et al. ont remplacé l'orthophthalaldéhyde (OPA) par le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) comme réactif fluorogène sur d'autres espèces aminés basiques (sphingoïdes) [106]. Le dosage de ce nouveau complexe a permis de déterminer le taux des bases sphingoïdes à partir de l'analyse par HPLC à détection de fluorescence. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient respectivement de 252 et 483 nm. Egalement, TAKAGI et al. [107] ont dosé l'histamine en HPLC à dérivatisation post-colonne par l'OPA suivie d'une détection électrochimique avec des électrodes de platine et d'argent (Ag/AgCl/KCl). En comparant la méthode HPLC et la méthode par « flow injection analysis » (FIA), ils ont trouvé que les résultats des deux méthodes étaient en parfait accord. On peut noter également les travaux de Den BRINKER qui ont permis d'analyser, en plus de l'histamine, la cadaverine et la putrescine en HPLC à phase inversée et à détection UV suite à la dérivatisation par le chlorure de dansyl [35].

Bien que ces méthodes soient globalement satisfaisantes pour la séparation des substances, il reste à résoudre les problèmes de quantification dus aux modes de dérivatisation. En effet, une dérivatisation (complexation) pré-colonne implique des extractions liquide/liquide qui sont un facteur limitant dans la quantification. La dérivatisation post-colonne quant à elle génère la non-reproductibilité des résultats à cause des débits des pompes [86].

c) Méthodes électrochimiques

Dans cette catégorie, on distingue les méthodes électrophorétiques et les méthodes ampérométriques. Par voie ampérométrique, CASELLA *et al.* [25] ont dosé l'histamine suite à une électro-oxydation sur une électrode en fibre de

carbone. Peu d'années après, ZHANG et SUN déterminaient simultanément l'histamine et l'histidine des mastocytes et des échantillons de bière grâce à l'électrophorèse capillaire à détection par fluorescence induite [108].

De même, CINQUINA et al. réalisaient à la même période une étude comparative entre l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide à haute performance pour la détermination de l'histamine. Si les deux méthodes avaient des limites de détection et de quantification identiques, les taux de recouvrement étaient meilleurs pour la méthode en HPLC [18].

Il est à signaler que l'inconvénient majeur des méthodes électrochimiques est la faible précision, sinon la difficulté à élaborer et à entretenir des électrodes sophistiquées.

d) Méthodes photochimiques

Ces méthodes concernent surtout la mesure de la densité optique ou celle de l'intensité de fluorescence. La molécule d'histamine n'étant pas naturellement fluorescente, on la fait réagir avec un fluorogène tel que l'orthophthalaldéhyde (OPA) pour former un dérivé fluorescent selon l'équation du schéma 5 [109].

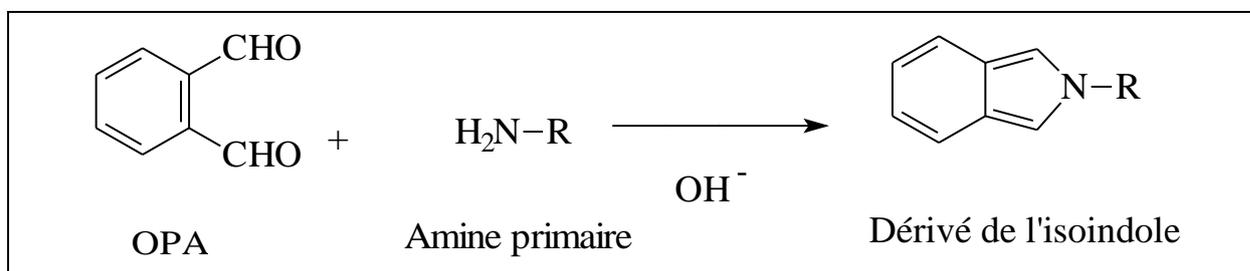


Schéma 5: Réaction de condensation entre une amine primaire et l'OPA.

L'association de l'OPA, de l'amine primaire et du 2-mercaptoéthanol peut conduire également à un second complexe isoindole très fluorescent (**schéma 6**).

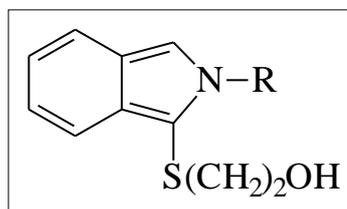


Schéma 6: *Composé obtenu avec l'intervention du 2-mercaptoéthanol.*

Très souvent, dans l'analyse de l'histamine, on n'utilise que l'OPA pour diminuer le nombre de réactifs. On peut noter que l'OPA réagit de la même manière avec d'autres amines primaires, cependant très peu de ces complexes présentent une fluorescence.

Sous l'action de l'OPA sur l'histamine, il se forme donc autant d'isoindole que d'histamine consommée. On peut alors établir une corrélation entre l'intensité de fluorescence et la concentration de l'histamine à partir de la loi de BEER-LAMBERT pour les faibles concentrations. La stœchiométrie de la réaction de formation du dérivé de l'isoindole à partir de l'OPA et de l'histamine est de 1:1.

Les méthodes en vigueur pour le dosage de l'histamine par voie fluorimétrique sont celles de LERKE et BELL [28], et de l'association officielle de chimie analytique (OAC) [32]. Leur différence se situe au niveau des solvants d'extraction : la première utilise une solution d'acide trichloracétique (TCA) à 10% et la seconde du méthanol à 75%. Ainsi, nous pouvons détailler une des méthodes, celle de LERKE et BELL.

Dans la méthode de LERKE et BELL, 10 g de chair de poisson broyée sont homogénéisés avec 90 mL de la solution de TCA 10%. De ce mélange, on recueille 50 mL de filtrat dont on prélève 0,2 mL pour l'extraction de l'histamine. On mélange alors ce petit volume de filtrat à 20 mL de tampon acétate (pH 4,62).

Après agitation, on transfère l'ensemble dans la colonne chromatographique contenant la résine Amberlite GC-50 tamponnée à pH 4,62. Après écoulement du tampon acétate, l'histamine fixée par la résine est éluée grâce à 18 mL de solution de HCl 0,2N. Le volume de l'éluat est ensuite complété à 20 mL par l'eau distillée. La réaction de condensation est réalisée en mélangeant 2 mL d'éluat avec 1 mL de NaOH 1N et 0,1 mL d'OPA 1% ($7,45 \cdot 10^{-2}$ M). Au bout de 3,5 minutes de réaction, 2 mL de HCl 0,7N sont ajoutés à la cellule du fluorimètre contenant le mélange précédent juste avant la mesure de l'intensité de fluorescence. Les calculs montrent que cette mesure de fluorescence se fait en solution acide (HCl 0,16N) et en présence d'OPA $1,46 \cdot 10^{-3}$ M. Ainsi, dans la méthode de LERKE et BELL (comme dans celle de OAAC), la condensation entre l'histamine et l'OPA a lieu en milieu basique (pH proche de 13) alors que la mesure de fluorescence s'effectue en milieu acide (pH proche de 1) [28, 32].

En réalité, les avantages des méthodes fluorimétriques sont associés à leur spécificité. En effet, pour qu'il ait interférence entre deux composés, il faudrait qu'ils présentent une même longueur d'onde d'excitation, et une même longueur d'onde d'émission. L'autre avantage des méthodes fluorimétriques est leur sensibilité qui permet d'obtenir des limites de détection très basses. Ainsi, par rapport aux autres méthodes, le dosage par voie fluorimétrique est de loin la méthode la plus utilisée, car plus sensible. Cependant, des inconvénients majeurs sont à signaler :

- La cinétique de formation du complexe OPA-histamine en milieu basique ne peut être suivie par un fluorimètre.
- Le milieu acide dans lequel la fluorescence est mesurée s'est révélé comme un inhibiteur de l'intensité de fluorescence du complexe. Cela a pour conséquence la réduction du domaine de calibration. Les résultats obtenus

deviennent ainsi moins fiables d'autant plus que la différence entre deux concentrations distinctes est moins nette.

- On observe en milieu acide l'existence de deux types de complexe, nettement décelables par un spectrofluorimètre. Cependant, l'utilisation du simple fluorimètre même couplé à un HPLC ne permet pas la visualisation des spectres, par conséquent la mise en évidence de l'apparition d'un second complexe en milieu acide.
- Le milieu réactionnel n'est pas optimisé en fonction du pH et/ou de la concentration d'OPA.
- La température réactionnelle n'est pas optimisée.
- Le domaine de linéarité est très faible. Ceci explique les résultats statistiques (limites de détection, taux de recouvrement...) peu fiables. Ainsi, les résultats obtenus dans le domaine médical par cette méthode sont le plus souvent erronés.

III. ETUDE EXPERIMENTALE

1. Produits utilisés

Le dichlorhydrate d'histamine (98%, m/m), l'histamine (96%), l'orthophthalaldéhyde (OPA, 99%, m/m) et le méthanol de qualité spectroscopique ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Allemagne) et utilisés sans modifications supplémentaires. L'hydroxyde de sodium (97%, m/m), l'acide chlorhydrique (36%, m/m), l'acétate de sodium et l'acide acétique cristallisable ont été obtenus chez Labosi (Oulchy Le Château, France). L'acide trichloracétique (TCA 99%, m/m) provenait de chez Janssen Chimica (Belgique) et l'acide phosphorique (85%) chez Fluka Chimica (Suisse). La résine Amberlite GC-50 (H) Type I était livrée par Prolabo (France). L'eau distillée a été utilisée pour préparer toutes les solutions aqueuses nécessaires.

2. Instrumentation

Toutes les mesures de fluorescence ont été exécutées à la température ambiante à l'aide d'un spectrofluorimètre de marque Kontron, modèle SFM-25, connecté à un micro-ordinateur IBM, modèle Aptiva. Les spectres de fluorescence non corrigés ont été acquis grâce au logiciel K-Wind 25 et traités par le logiciel Microcal Origin version 6.0. Nous avons utilisé un agitateur magnétique VELP ARE Scientifica muni d'un chauffage thermostaté. Pour enregistrer nos spectres d'absorption électroniques, nous avons utilisé un spectrophotomètre uv-visible de marque JASCO modèle 7800 associé à un écran PHILIPS de type Computer monitor 80 et une imprimante JASCO PTL-3965. Nous avons préparé nos solutions tampons grâce à un pH-mètre de marque HANNA Instruments modèle HI 190N. Un broyeur (moulinex) était utile pour homogénéiser les échantillons de poisson. Une balance de précision 0,1mg de marque Sartorius a été utilisée pour

la pesée de nos produits. De même, les cellules en quartz à cinq faces polies étaient utilisées pour la mesure en fluorescence, tandis que deux cellules en quartz à deux faces polies étaient nécessaires pour des mesures en absorption. Toutes les cellules avaient 1 cm de trajet optique. La verrerie était constituée de colonnes chromatographiques, fioles, béchers et pipettes de plusieurs dimensions. Une micropipette de 20µl de marque Pipetman et des cônes étaient nécessaires pour des prélèvements.

3. Procédures expérimentales

a) Préparation des solutions

Les solutions mères d'histamine (1×10^{-3} M) ont été directement préparées dans l'eau, pendant que celles d'OPA (1×10^{-3} M) nécessitaient éventuellement un minimum de méthanol (1/10, v/v) pour faciliter la dissolution. Les dilutions en série ont été effectuées pour obtenir des solutions standard de travail. Toutes les solutions ont été protégées contre la lumière avec du papier aluminium et conservées dans un réfrigérateur. Les solutions mères de HCl (1N) et de NaOH (1N) ont été préparées avec de l'eau distillée et utilisées avec ou sans dilutions préalables selon le cas.

b) Préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon ainsi que l'extraction et la purification de l'histamine ont été réalisées selon la méthode de LERKE et BELL décrite plus haut. Des changements ont été apportés au niveau de la condensation et de la mesure de fluorescence. En effet, à ce niveau, la solution tampon de phosphate de pH 11,5 était parfois utilisée.

c) Mesure de la fluorescence

L'allumage du spectrofluorimètre a lieu une trentaine de minutes avant le début des mesures afin d'atteindre la stabilité du rayonnement émis par la source.

Deux types de mesure ont été faites.

Le premier consistait à mettre une solution d'OPA de titre connu dans la cellule du spectrofluorimètre, ensuite on ajoutait progressivement des volumes d'histamine. Après chaque ajout, on enregistrait le spectre de fluorescence ou la cinétique du complexe OPA-histamine. La variation de l'intensité de fluorescence du complexe en fonction du nombre de moles d'histamine ajoutée nous permettait d'établir la courbe de calibration.

Le second type de mesure consistait à préparer le complexe OPA-histamine dans un réacteur contenant de l'eau distillée, l'OPA, NaOH et de l'histamine. Parfois une quantité de sel NaCl était introduite dans ce réacteur. Dans tous les cas, nous prenions soin d'introduire l'OPA ou l'histamine en dernier lieu avant de déclencher le chronomètre car c'est à cet instant que commençait la réaction. Pour étudier l'effet du pH, on ajoutait des quantités connues de HCl dans le réacteur. Le temps d'agitation et/ou chauffage variait entre 0 et 5 minutes, correspondant au temps de réaction de condensation. Une portion de ce mélange était prélevée dans la cuve et portée au spectrofluorimètre pour l'enregistrement de la cinétique de complexation. Après chaque mesure, le réacteur était lavé et rincé avant de reprendre un autre mélange réactionnel. La longueur d'onde d'excitation était fixée à 350 nm, l'intervalle de balayage du spectre de fluorescence était fixé entre 370 et 550 nm. Pour la cinétique de fluorescence, la longueur d'onde d'excitation était à 350 nm et celle d'émission à 430 nm. La cinétique nous permettait de mesurer la stabilité du complexe fluorescent, et des mesures successives des cinétiques en fonction de la concentration d'histamine nous permettaient d'établir la droite de calibration.

Toutes les mesures de fluorescence ont été corrigées par rapport au signal du solvant. Les résultats ont été exprimés comme valeurs moyennes des mesures répétées. Le logiciel MICROCAL ORIGIN, version 6.0, a été utilisé pour le traitement statistique des données.

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Travaux préliminaires

La recherche d'une nouvelle méthode de dosage d'histamine suppose la résolution des difficultés relatives aux méthodes existantes. Le travail doit donc porter sur l'amélioration de la précision, de la sensibilité, de la reproductibilité, de l'abaissement du coût et du temps de dosage. Ainsi, nous avons commencé nos recherches par une étude en absorption électronique uv-visible, suivie d'une autre en spectrofluorimétrie.

a) Travaux préliminaires en absorption électronique uv-visible

Lors de cette étude, l'exploitation des spectres d'absorption électronique des mélanges d'orthophthalaldéhyde (OPA) avec l'histamine nous a permis de confirmer la réaction entre ces deux composés. En effet, le graphe représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration d'histamine fait apparaître deux droites sécantes de pentes distinctes, ce qui prouve l'apparition d'un produit dans le mélange réactionnel (**figure 1**) [110]. En travaillant à un pH d'environ 11, les pentes des droites dont les valeurs sont 8988 et 1153 ont été déterminées avec des coefficients de corrélation de 0,99494 et 0,95951 respectivement, tous proches de l'unité, ce qui prouve la précision de nos mesures. La première droite traduit la formation du complexe OPA-histamine qui prend fin à l'intersection des deux droites. Le point d'intersection traduit la fin de la réaction et montre que la stœchiométrie de la réaction est donc de 1:1. La deuxième droite de la courbe de calibration constitue l'addition de l'histamine sur le complexe formé.

Cette stœchiométrie est conforme à celle trouvée dans la littérature. En effet, CSAMPAI et al. [94] ont montré qu'à la température de 30°C, la stœchiométrie de la réaction entre l'OPA et l'histamine est de 1:1.

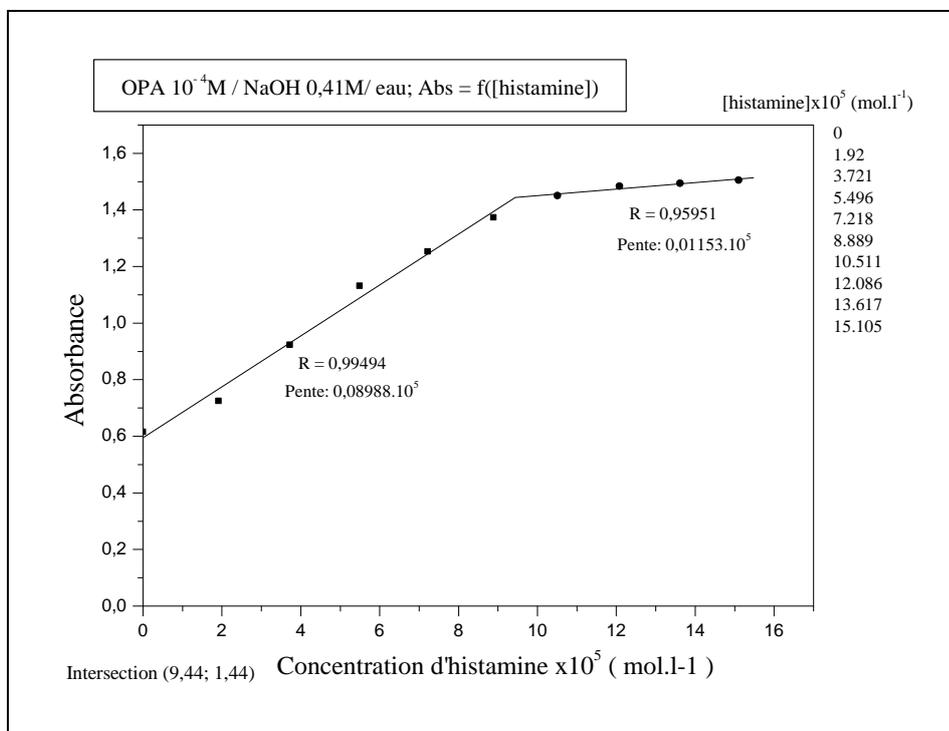


Figure 1: Courbe de calibration de l'histamine en présence d'OPA en milieu basique (NaOH).

Les études en absorption électronique uv-visible nous ont certes montré que la stœchiométrie de la réaction entre l'OPA et l'histamine est de 1:1. Il est de même possible de déterminer, à partir des courbes de calibration obtenues, des concentrations d'histamine assez élevées. Seule la première droite dans la courbe de dosage peut servir de droite de calibration. Cependant ces résultats, bien que satisfaisants pour la détermination de la toxicité, ne permettent pas de couvrir le domaine de faibles concentrations d'histamine (le domaine de linéarité de l'absorbance étant très limité). Pour une concentration d'OPA de 10^{-4} M, nous pouvons déterminer une concentration d'histamine comprise entre 10^{-5} et 10^{-4} M. Cependant, pour une concentration d'OPA inférieure à 10^{-4} M, il s'avère difficile de déterminer avec précision la concentration réelle d'histamine. Il est donc

impossible par l'absorption de déterminer le taux d'histamine à l'état de trace. D'où l'utilité de travailler en fluorescence.

b) Travaux préliminaires en fluorescence

Nous avons mené d'autres travaux préliminaires en spectrofluorimétrie [110]. Les résultats obtenus nous ont permis de comprendre que la réaction de formation du complexe OPA-histamine et son intensité de fluorescence dépendaient de la concentration de NaOH en solution avec l'OPA. Il en résulte que le domaine de calibration augmente lorsque la concentration de soude passe de 10^{-4} à 10^{-3} M (**figure 2**). Ainsi, la gamme de concentrations en soude comprises entre $6 \cdot 10^{-4}$ et 10^{-3} M nous permet d'obtenir les domaines de calibration les plus larges avec des intensités de fluorescence les plus élevées. Cet intervalle peut être considéré comme domaine de calibration optimale pour la détermination d'histamine à partir de l'OPA 10^{-4} M.

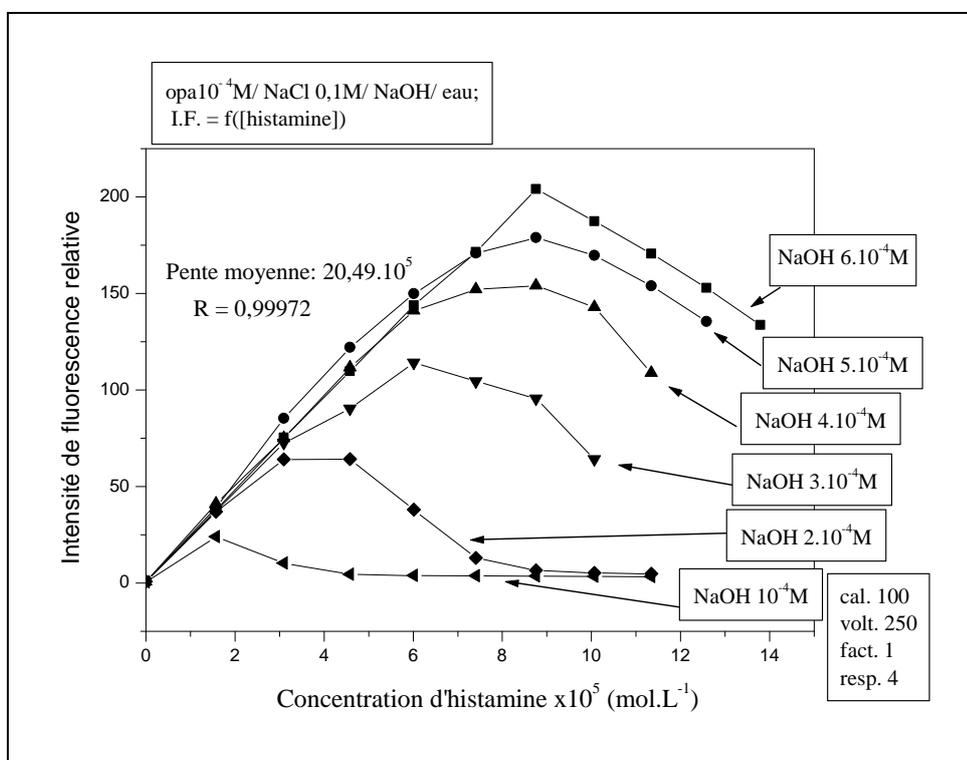


Figure 2: Illustration de l'effet de la concentration de soude sur les courbes de calibration d'histamine en présence d'OPA en milieu salin et basique.

Nous avons obtenu ces courbes de calibration à partir des maxima d'intensité de fluorescence de la cinétique de formation du complexe OPA-histamine (**figure 3**). Ces courbes de cinétique étaient réalisées par ajouts successifs de l'histamine dans la cellule contenant une solution d'OPA et de soude. Pour cela, nous avons suivi l'évolution de l'intensité de fluorescence pendant 10 minutes à la suite de chaque ajout d'histamine (**figure 3**).

La première courbe **a**, correspondant au premier ajout d'histamine, croît rapidement et atteint un palier vers la dixième minute. La phase de croissance symbolise le temps de complexation de l'histamine ajoutée avec l'OPA, et le palier traduit la fin de réaction.

Les courbes **b** à **e** sont caractérisées par une phase de croissance de plus en plus courte, suivie d'un maximum et d'une longue phase de décroissance. Le temps de complexation diminue donc au fur et à mesure que l'on ajoute l'histamine.

Les courbes **f** et **g** commencent par un palier puis présentent une longue phase de décroissance. L'histamine ajoutée est donc déjà complexée totalement pendant l'agitation du mélange réactionnel. La décroissance des intensités de fluorescence caractérise l'instabilité du complexe OPA-histamine.

Lorsque l'on ajoute des quantités supplémentaires d'histamine, les courbes deviennent intégralement décroissantes et les intensités de fluorescence initiales sont de plus en plus faibles. Cela traduit non seulement l'absence de complexation entre l'OPA et l'histamine ajoutée, mais aussi l'instabilité du complexe déjà formé.

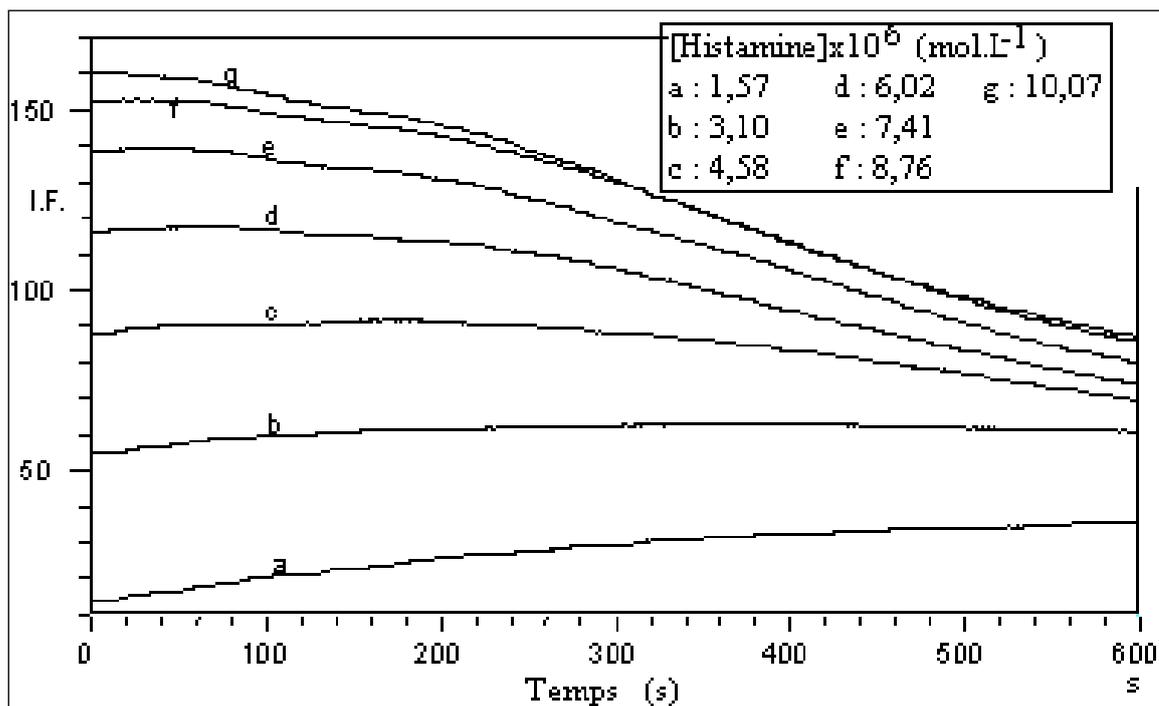


Figure 3: Intensités de fluorescence du mélange OPA-Histamine en fonction du temps dans un milieu salin basique par ajouts successifs (OPA $10^{-5}M$; NaCl 0,2M ; NaOH $5.10^{-3}M$).

Nous avons pu tracer la variation des intensités de fluorescence correspondant aux paliers de la cinétique en fonction de la concentration de l'histamine ajoutée (**figure 4**). Nous avons obtenu deux droites sécantes. Celle qui correspond à la formation du complexe a un coefficient de corrélation de 0,996 et une pente égale à $17,72.10^6$. Cette pente est donc très élevée par rapport à celle obtenue en absorption (de l'ordre de 10^4). Le coefficient de corrélation proche de l'unité indique la précision de nos mesures. Cette droite correspondant à la complexation peut donc servir de calibration pour doser l'histamine dont la teneur est comprise entre 10^{-6} et 10^{-5} M.

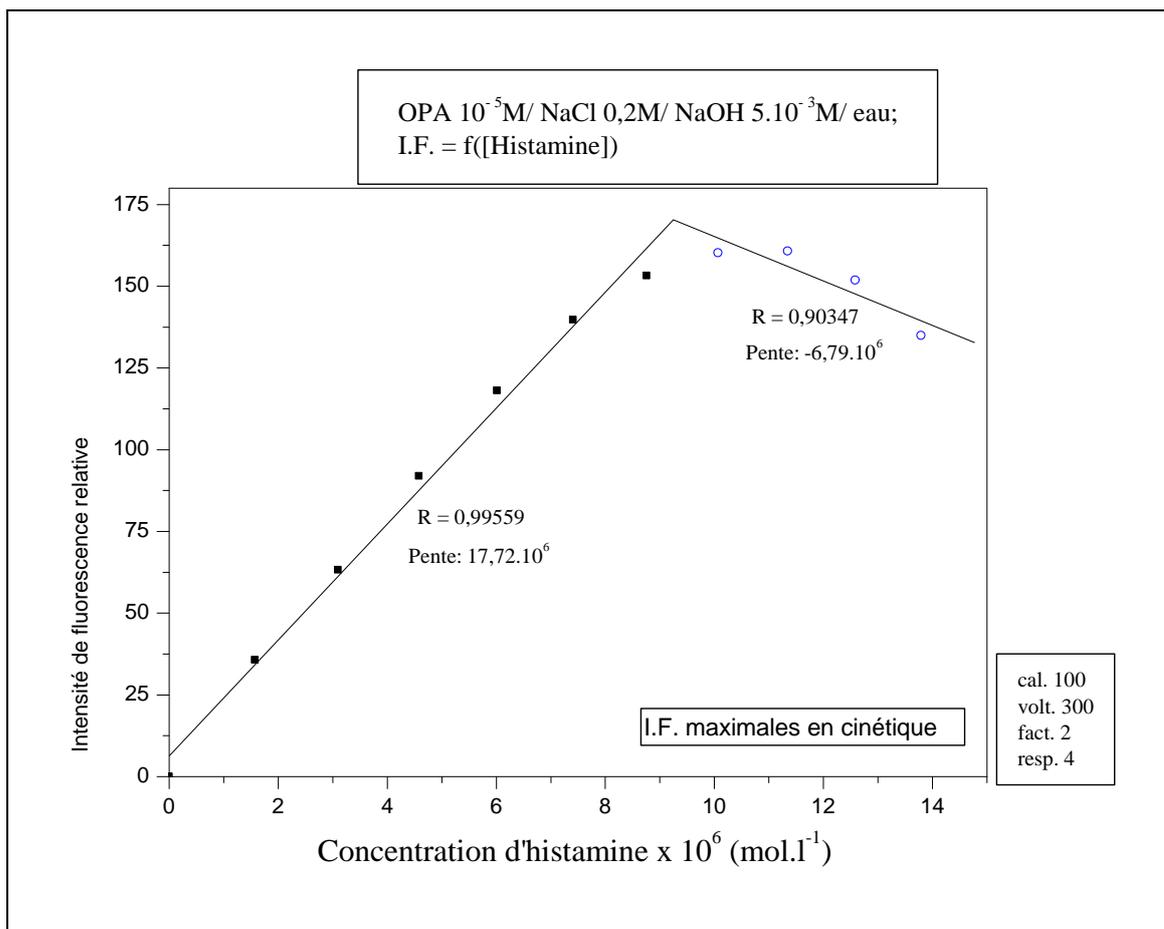


Figure 4: Courbe calibration d'histamine en présence d'OPA 10^{-5} M dans un milieu salin basique à partir des intensités maximales de fluorescence en cinétique par ajouts successifs

En optimisant les diverses courbes de calibration par le milieu réactionnel, nous avons constaté que la solution contenant l'OPA 10^{-4} M, NaCl 0,1M et NaOH $6 \cdot 10^{-4}$ M nous fournissait les meilleurs résultats avec une pente égale à $23,14 \cdot 10^5$ et un coefficient de corrélation égale à 0,99972 très proche de l'unité (**figure 5**). On remarque que le domaine de calibration est très large entre 0 et 200 unités de fluorescence. Cette droite de calibration peut donc bien servir au dosage d'histamine pour des concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-5} M.

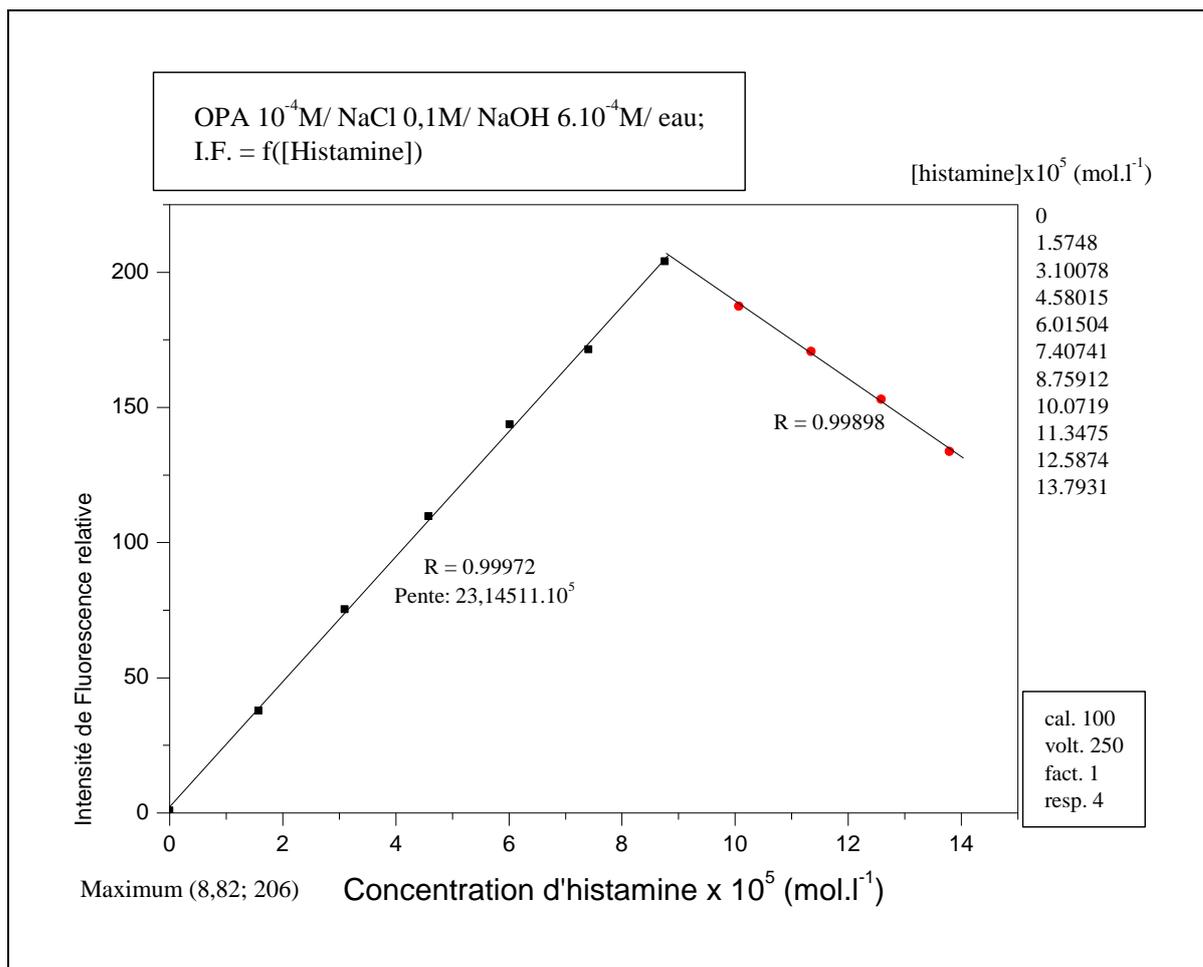


Figure 5: Courbe de calibration optimale d'histamine en présence d'OPA en milieu salin et basique (OPA 10^{-4} M/ NaCl 0,1M/ NaOH $6 \cdot 10^{-4}$ M).

Cependant, avec cette calibration, un problème fondamental se pose pour la détermination de l'histamine extraite du poisson par exemple. En effet, pour les mêmes concentrations d'histamine, les intensités de fluorescence correspondant aux paliers des maxima de fluorescence du complexe formé étaient différentes de celles obtenues sans ajouts. Ceci s'explique par le fait qu'en milieu alcalin, le complexe n'est pas stable. Cette remarque nous a conduits à optimiser les résultats de nos mesures à partir du dosage répétitif.

2. Optimisation du dosage répétitif

a) Vérification de l'effet de la concentration NaOH sur la formation du complexe OPA-histamine par mesures répétitives

Nous avons pris un mélange OPA-histamine équimolaire pour lequel la cinétique a été étudiée à différentes concentrations de NaOH (**figure 6**). Nous constatons que toutes les courbes semblent avoir la même origine. A des concentrations très faibles de soude de l'ordre de 10^{-4} M, l'intensité de fluorescence ne s'élève presque pas, sinon très peu et le palier marquant la fin de la réaction est très bas. Pour des concentrations de soude voisines de 10^{-3} M, l'intensité de fluorescence croît rapidement comme en témoigne la forte pente observée avant d'atteindre le palier. Ce palier marquant la fin de la réaction de formation du complexe est atteint très vite, ce qui prouve une plus grande accélération de la réaction. A des concentrations plus importantes de soude, au dessus de 10^{-2} M, le temps de réaction est plus important, la réaction devient donc plus lente avec une forte baisse de l'intensité de fluorescence. Ainsi, on a un effet inhibiteur de la soude aux fortes concentrations sur la formation du complexe OPA-histamine. La catalyse par NaOH est donc plus efficace pour des concentrations de l'ordre de 2.10^{-3} M (**figure 7**).

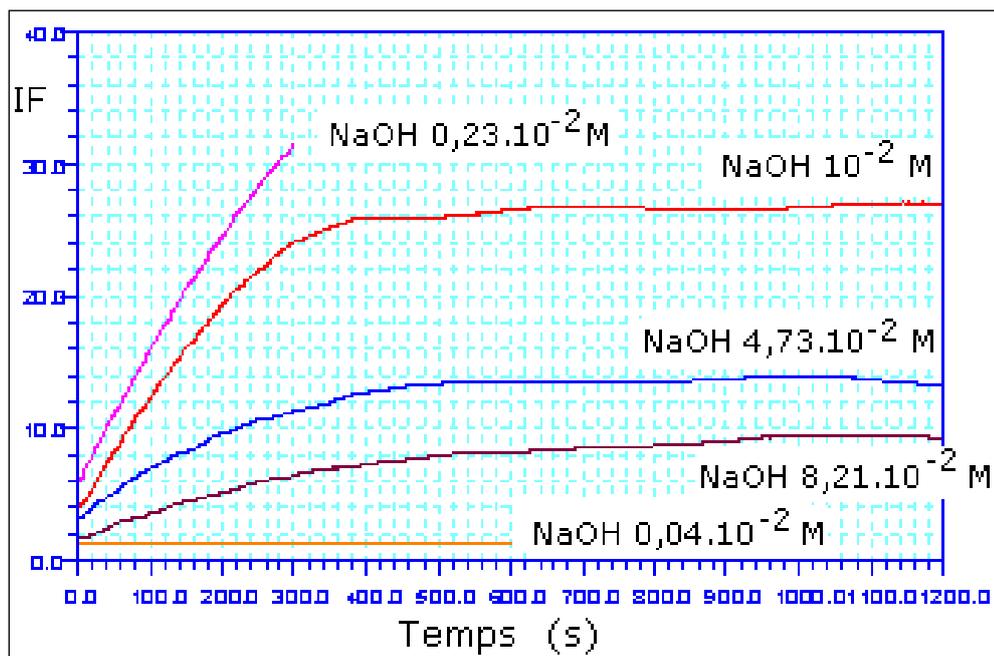


Figure 6: Effet de la concentration NaOH (en mol.L⁻¹) sur la cinétique de formation du complexe OPA-histamine

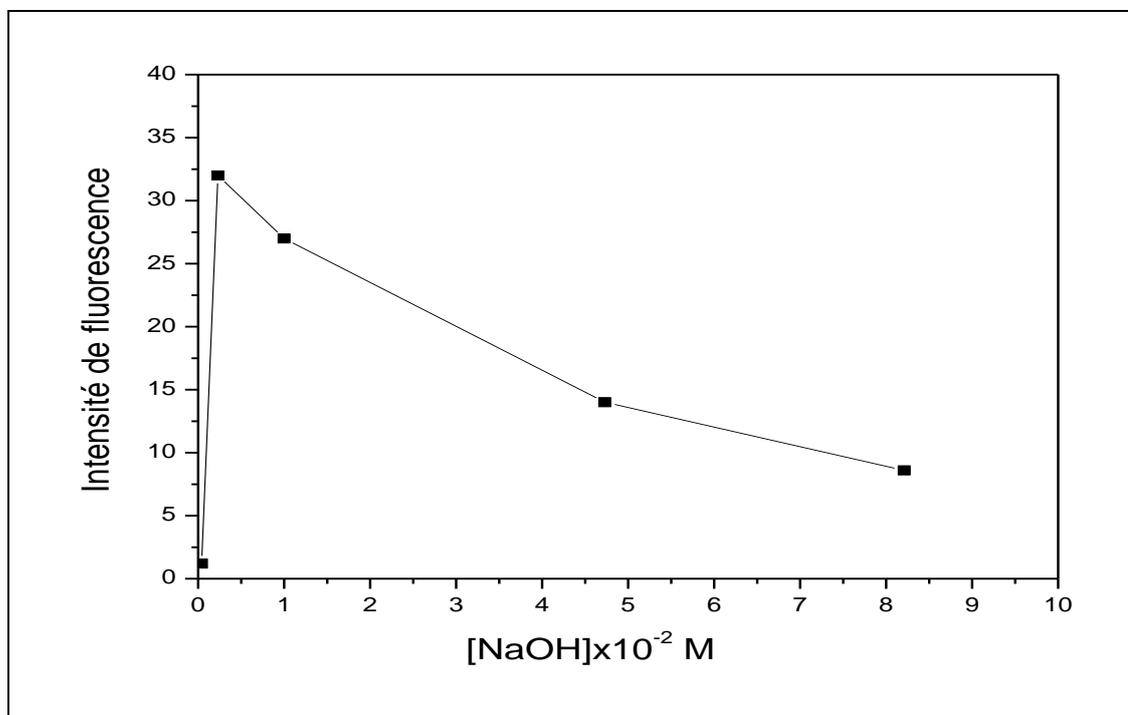


Figure7: Effet de la concentration NaOH (en mol.L⁻¹) sur la fluorescence du complexe OPA-histamine.

b) Effet de l'agitation sur la cinétique de formation du complexe OPA-histamine

Nous avons évalué l'apport du temps d'agitation sur la formation du complexe OPA-histamine. Pour les concentrations de réactifs fixées, on atteint le maximum du palier de la cinétique de complexation plus rapidement quand on prolonge l'agitation (**figure 8**). Toute fois, nous obtenons à peu près la même intensité maximale de fluorescence quel que soit le temps d'agitation pour une même concentration donnée. La faible variation de l'intensité de fluorescence correspondant aux maxima de paliers pour la même concentration est attribuée aux erreurs de manipulation et aux fluctuations de l'appareil.

Nous avons également représenté la courbe de temps de réaction en fonction du temps d'agitation (**figure 9**). Nous avons constaté que quelle que soit la durée de l'agitation, nous avons le même temps de réaction (c'est-à-dire le temps correspondant au début de la réaction jusqu'à l'obtention du palier). La constance du temps de fin de réaction quel que soit le temps d'agitation indique la fluidité du mélange réactionnel. C'est-à-dire les molécules s'y déplacent facilement sans trop grande nécessité d'agitation. En plus, la cellule utilisée est une petite cuve en quartz de trajet optique égale à 1 cm contenant donc un faible volume. Ceci explique la plus facile homogénéité obtenue.

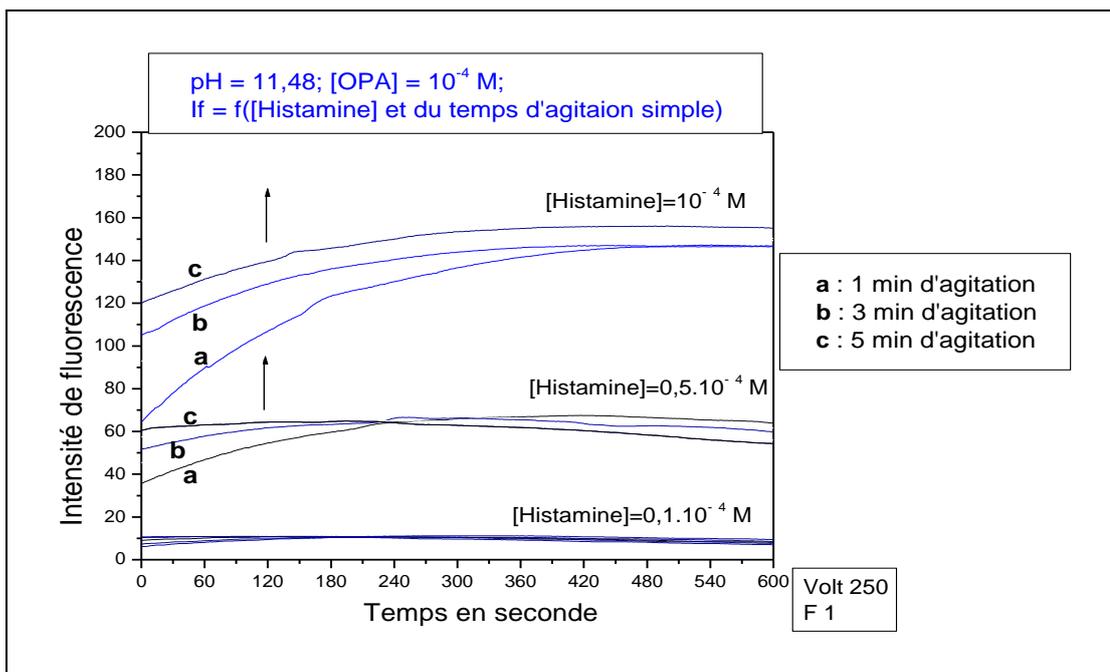


Figure 8: Effet du temps d'agitation sur la cinétique de formation du complexe OPA-histamine.

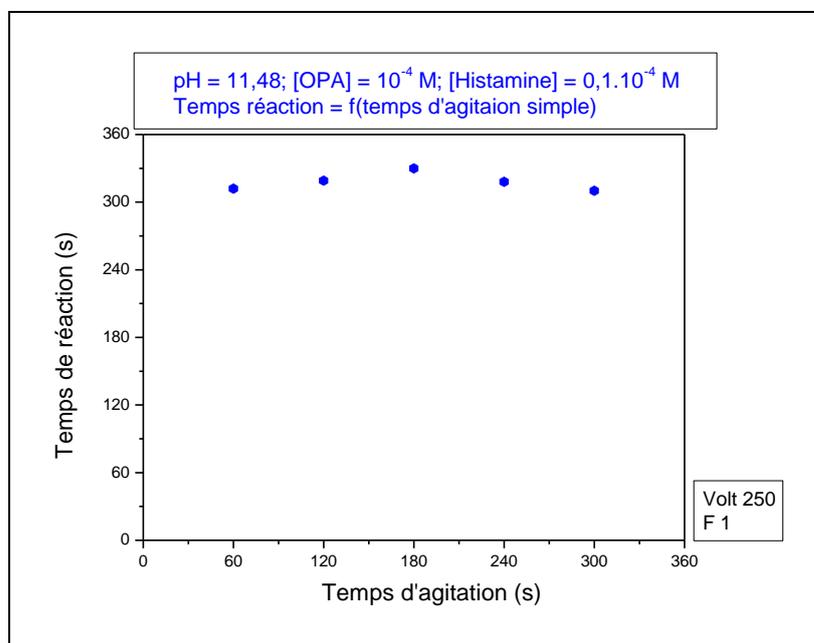
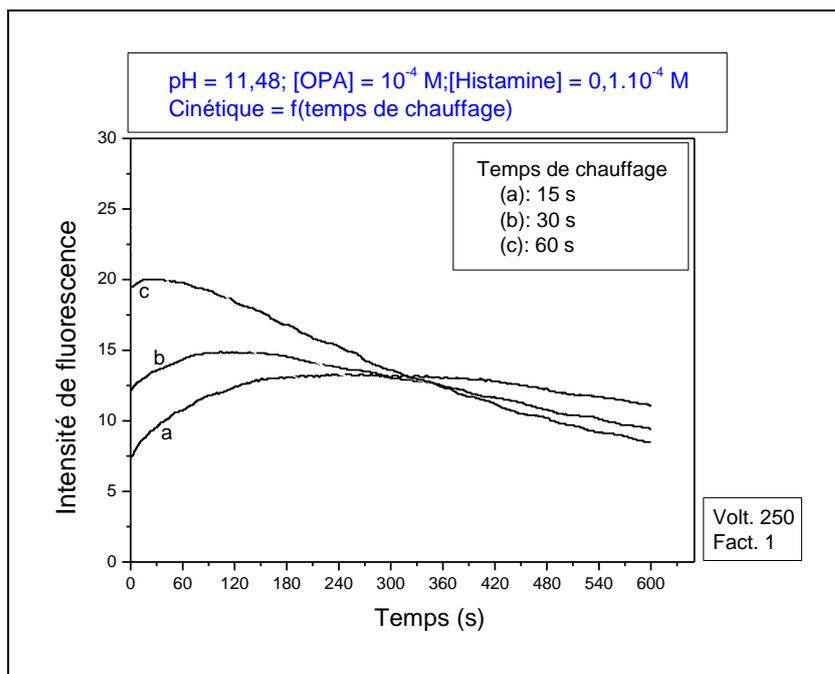


Figure 9: Evolution des temps de réaction en fonction du temps d'agitation lors de la formation du complexe OPA-histamine.

c) Effet de la température sur la cinétique de formation du complexe OPA-histamine

Nous avons examiné l'effet du temps de chauffage sur la cinétique de formation du complexe OPA-histamine. Les courbes de cinétique ont montré que pour une même concentration, l'intensité de fluorescence correspondant au maximum du palier de complexation augmentait en fonction du temps de chauffage (**figure 10**). Ainsi, le temps de chauffage exalte la fluorescence du complexe OPA-histamine. Là aussi, nous observons un raccourcissement du temps de réaction de formation du complexe en fonction du temps de chauffage. Les courbes de cinétique obtenues sur la figure 10 correspondaient à un fort excès d'OPA dans la cellule. Dans le souci d'avoir une courbe de calibration dans les faibles concentrations d'histamine, nous avons diminué la concentration d'OPA et tracé les courbes de cinétique après agitation et chauffage à 50°C (**figure 11**). Nous avons trouvé des intensités de fluorescence relativement constantes pour chaque concentration avec un faible palier tout de même. Nous avons alors tracé la droite de calibration à partir des maxima de fluorescence correspondant à chaque palier en fonction de la concentration de l'histamine (**figure 12**). Nous avons obtenu un coefficient de corrélation de l'ordre de 0,999 proche de l'unité. Ce qui explique la précision de nos mesures. La droite de calibration est caractérisée par une pente très élevée ($21,15 \cdot 10^7$) et un domaine de calibration très large.

Nous remarquons que dans le milieu réactionnel, on a ajouté du NaCl pour être conforme à un dosage éventuel d'histamine extraite d'un produit halieutique par exemple. Il y a donc lieu de discuter l'effet de NaCl sur la fluorescence du complexe.



Figures 10: Effet du temps de chauffage sur la cinétique de formation du complexe OPA-histamine en milieu basique pH 11,5 / [OPA] = 10^{-4} M / [Histamine] = $0,1 \cdot 10^{-4}$ M.

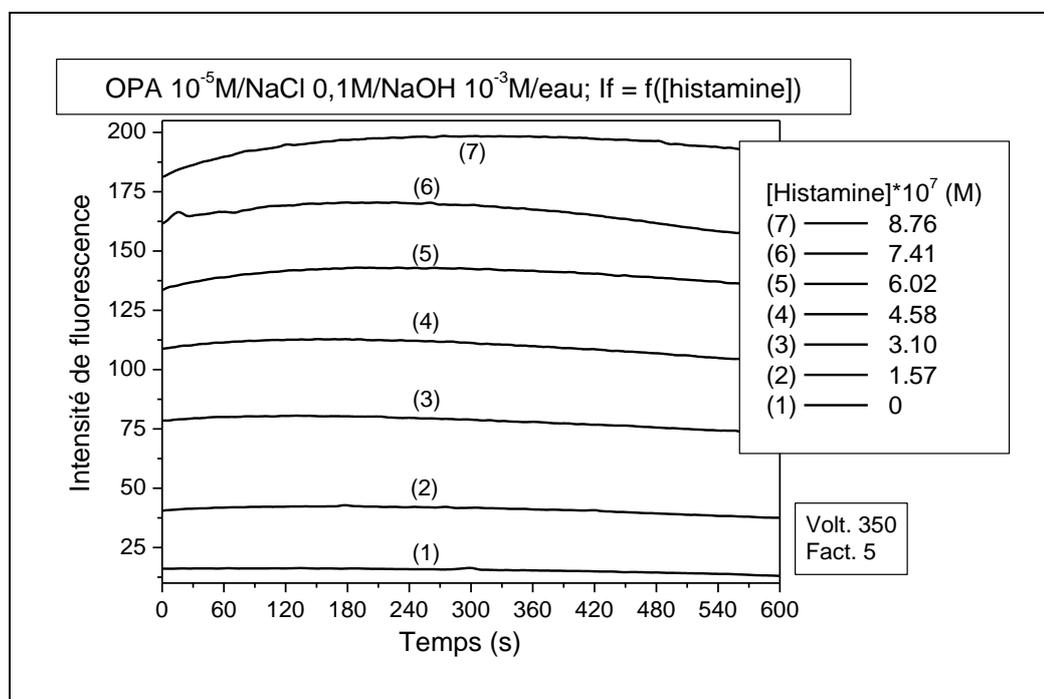


Figure 11 : Effet combiné de la température et de l'agitation sur la cinétique de formation du complexe OPA-histamine.

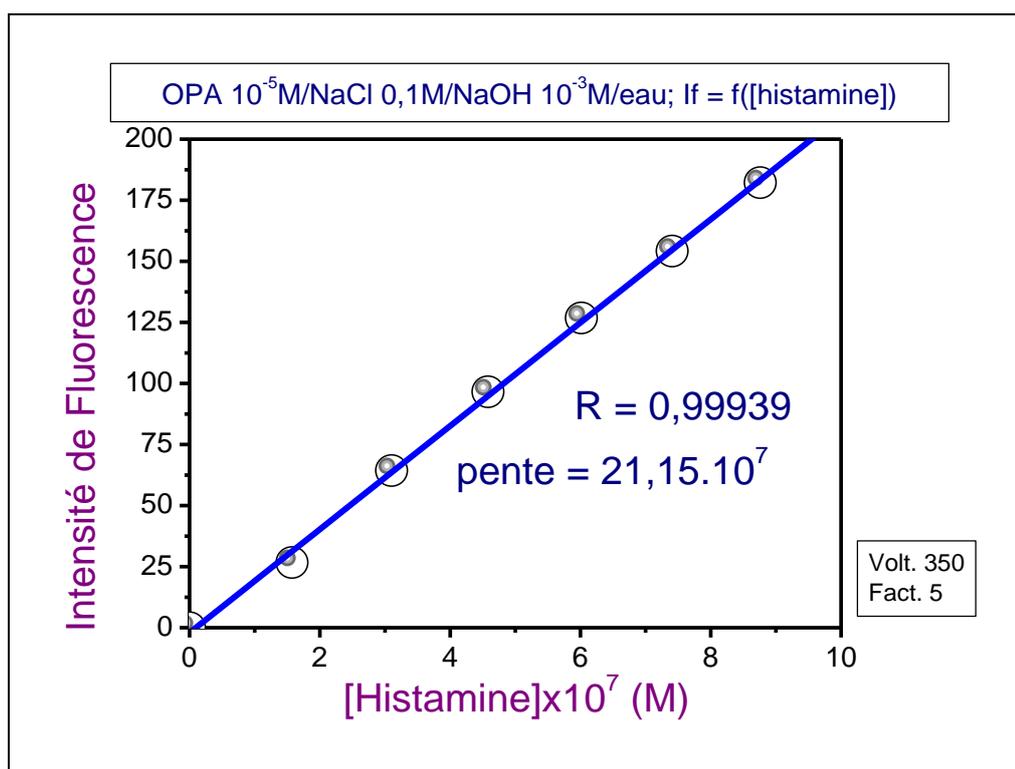


Figure 12 : Droite de calibration de l’histamine en présence d’OPA $10^{-5}M$; NaCl 0,1M et NaOH $10^{-3}M$ à partir de la cinétique de formation du complexe OPA-histamine à $50^{\circ}C$ pendant 3 minutes.

d) Effet de la concentration NaCl sur la fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu basique

L’histamine est extraite du poisson par l’acide chlorhydrique (HCl 0,2N). on rappelle que l’histamine n’émet pas. Cependant le complexe OPA-histamine qui se forme en milieu basique est fluorescent. Par conséquent, l’échantillon d’histamine à doser contiendra du NaCl en neutralisant l’acide chlorhydrique par la soude avant d’être en milieu alcalin. Aussi, jugeons-nous nécessaire d’examiner l’effet de NaCl sur l’intensité de fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu alcalin. Nous avons donc déterminé la variation de l’intensité de fluorescence du complexe en fonction de la concentration de NaCl. Le choix de l’intervalle de concentrations de NaCl est justifié par la concentration de NaCl obtenue après neutralisation selon la

méthode de LERKE et BELL. L'analyse des espèces chimiques donne une concentration de 0,2M pour NaCl dans le milieu réactionnel en pH alcalin. La **figure 13** nous montre que la concentration de NaCl n'affectait pas d'une manière significative l'intensité de fluorescence du complexe, du moins dans ce milieu alcalin entre 0 et 0,6M de soude.

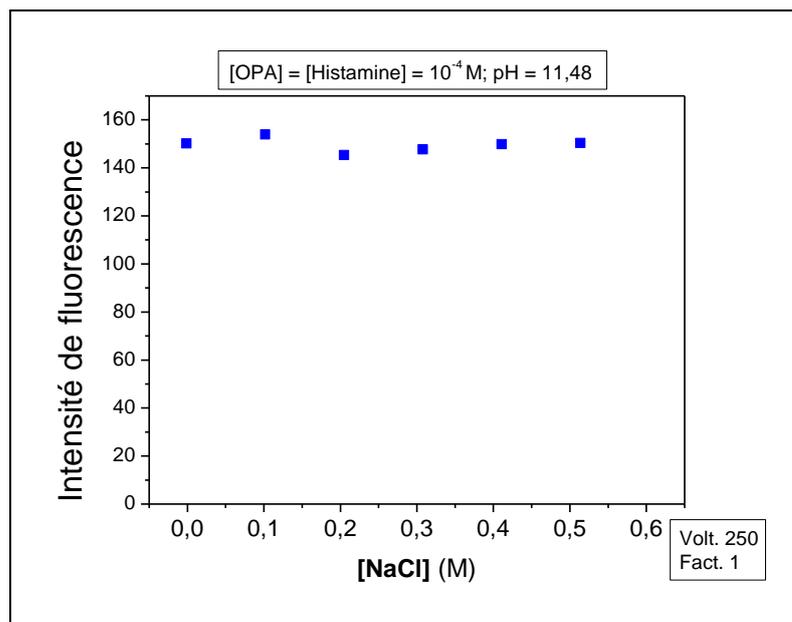


Figure 13: Effet de la concentration NaCl sur la fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu basique.

e) Effet du pH sur la fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu basique et en milieu acide

a) Effet de HCl sur la fluorescence du complexe

L'effet de l'acide chlorhydrique sur le spectre d'émission de fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu basique est donné par la **figure 14**. On observe un abaissement du pic de fluorescence au fur et à mesure que la basicité diminue. Dès que l'acide est en excès, le pic semble anéanti totalement. Ceci prouve qu'en

milieu acide, le complexe OPA-histamine n'est pas décelable en fluorescence, du moins aux environs de 430 nm à un voltage faible de 200V (**figure 14 : courbe 5**). Ainsi, en milieu acide, la fluorescence du complexe est totalement inhibée. En effet, l'intensité de fluorescence du pic diminue rapidement en fonction de la quantité d'acide ajoutée.

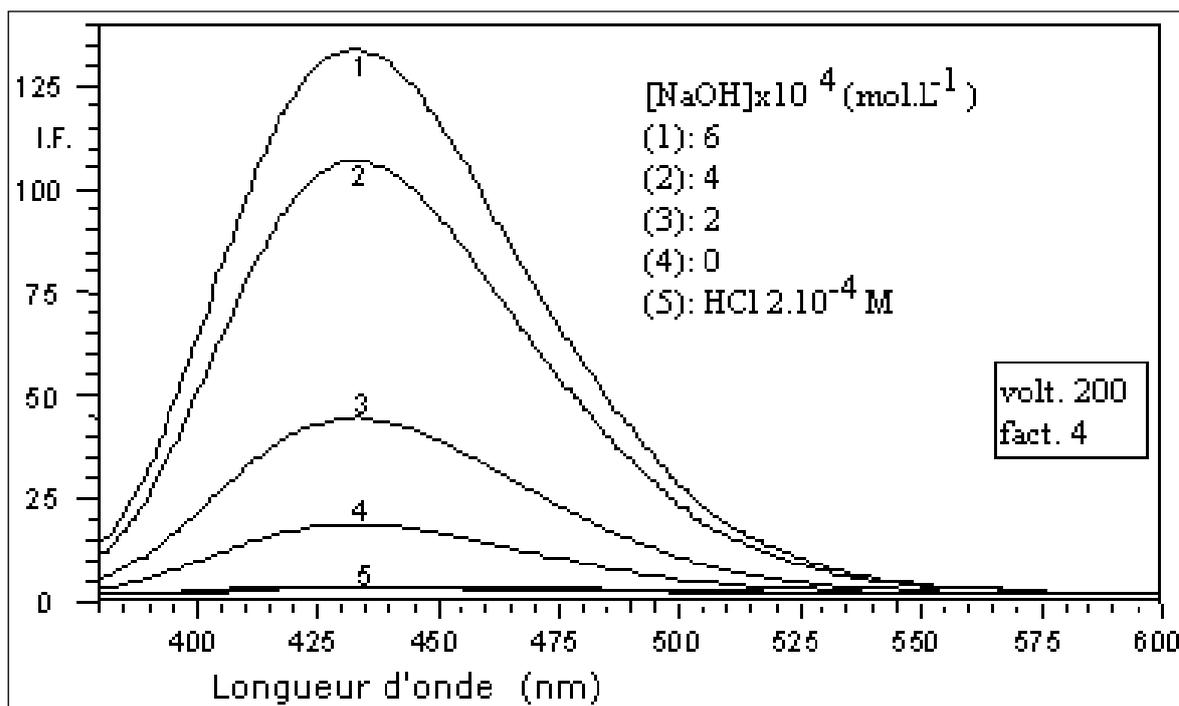


Figure 14: Abaissement de la bande d'émission de fluorescence du complexe OPA-Histamine à mesure que l'on neutralise la soude par l'acide chlorhydrique ($[OPA] = [Histamine] = 10^{-4}M$).

Cependant, quand on élève le voltage à 350 V, on arrive à déceler deux types de complexes. L'un émet à 430 nm et l'autre à 510 nm (**figure 15 : a et b**). En fixant la longueur d'onde d'émission à 430 nm, nous avons enregistré les spectres d'excitation et nous avons décelé deux pics. L'un à 346 nm, correspondant à l'excitation du pic d'émission à 430 nm, et l'autre à 386 nm, correspondant à l'excitation de l'émission du complexe dont le pic est à 510 nm (**figure 16: a et b**).

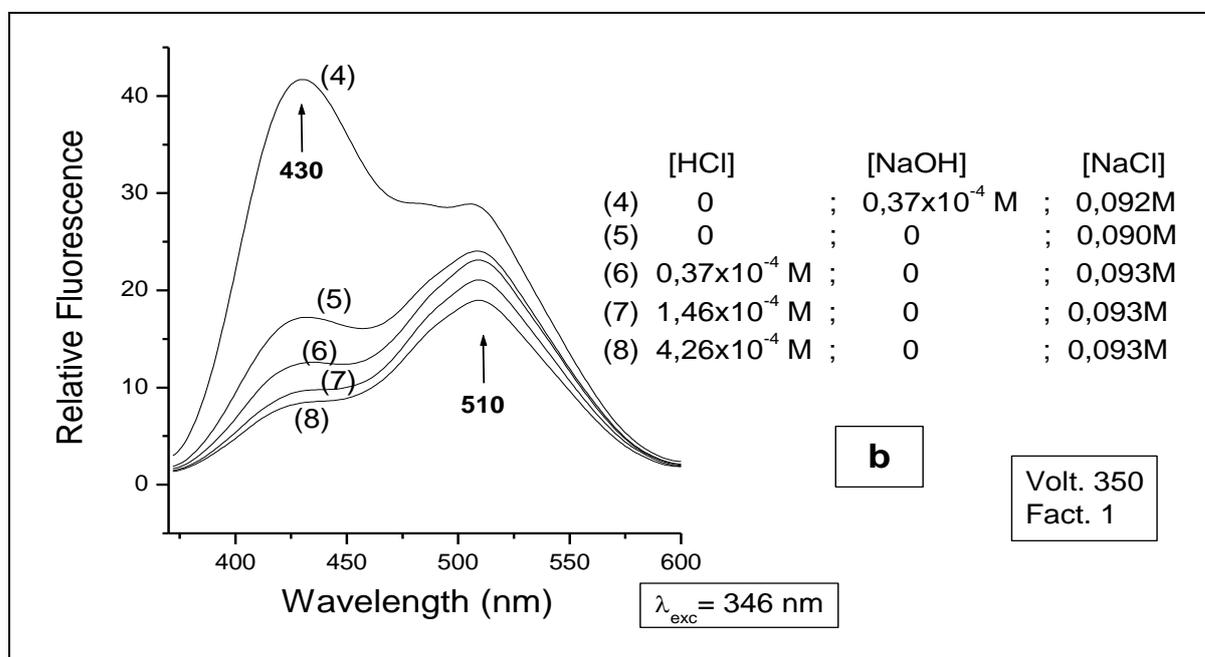
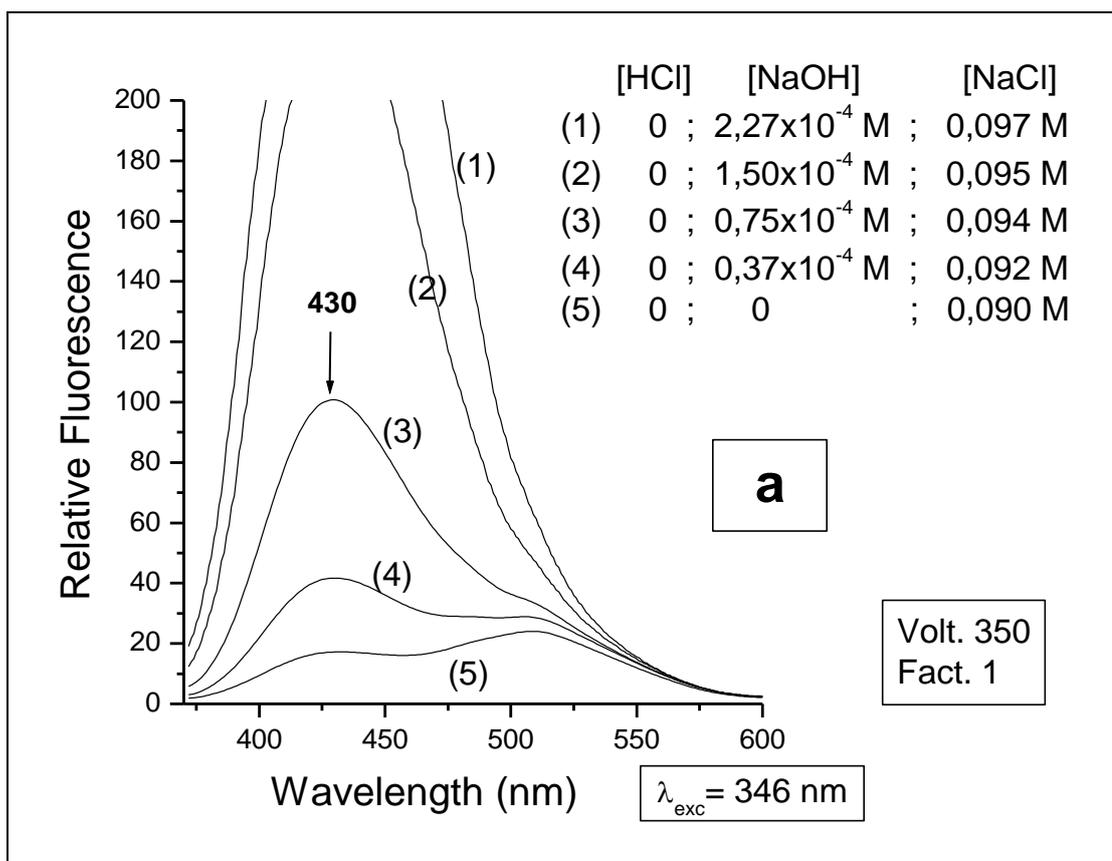


Figure 15 (a et b) : spectres d'émission du complexe OPA-histamine à haut voltage (350V), $\lambda_{exc} = 346$ nm ([OPA] = [histamine] = 10^{-4} M).

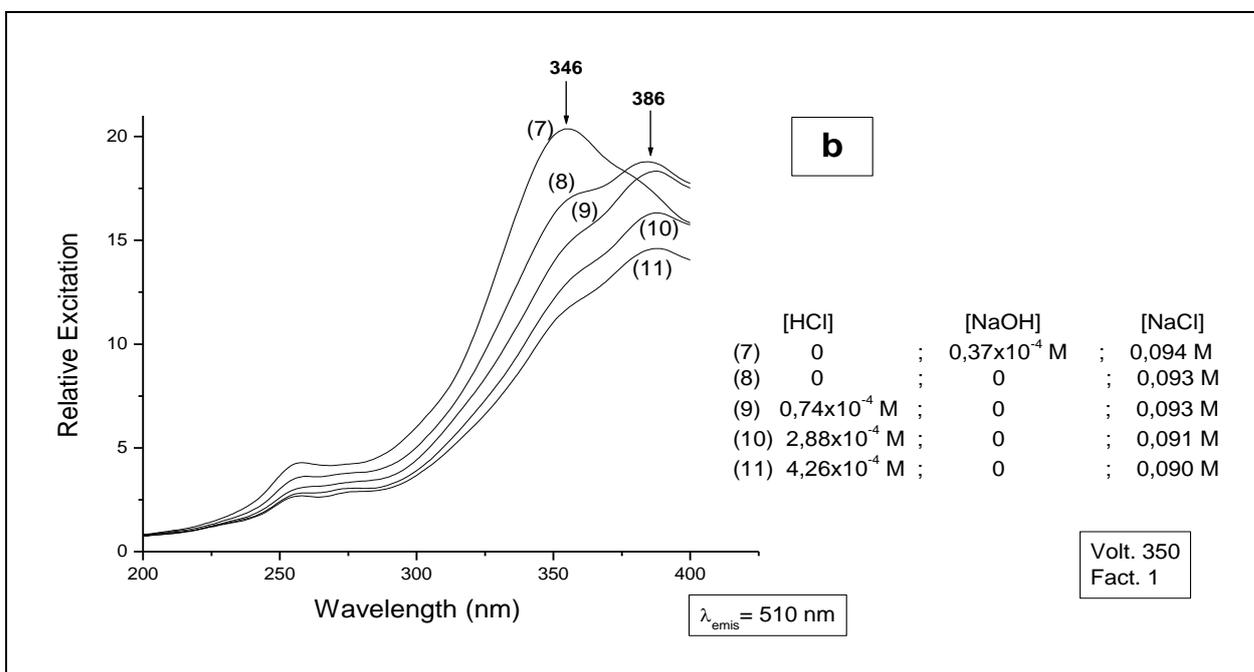
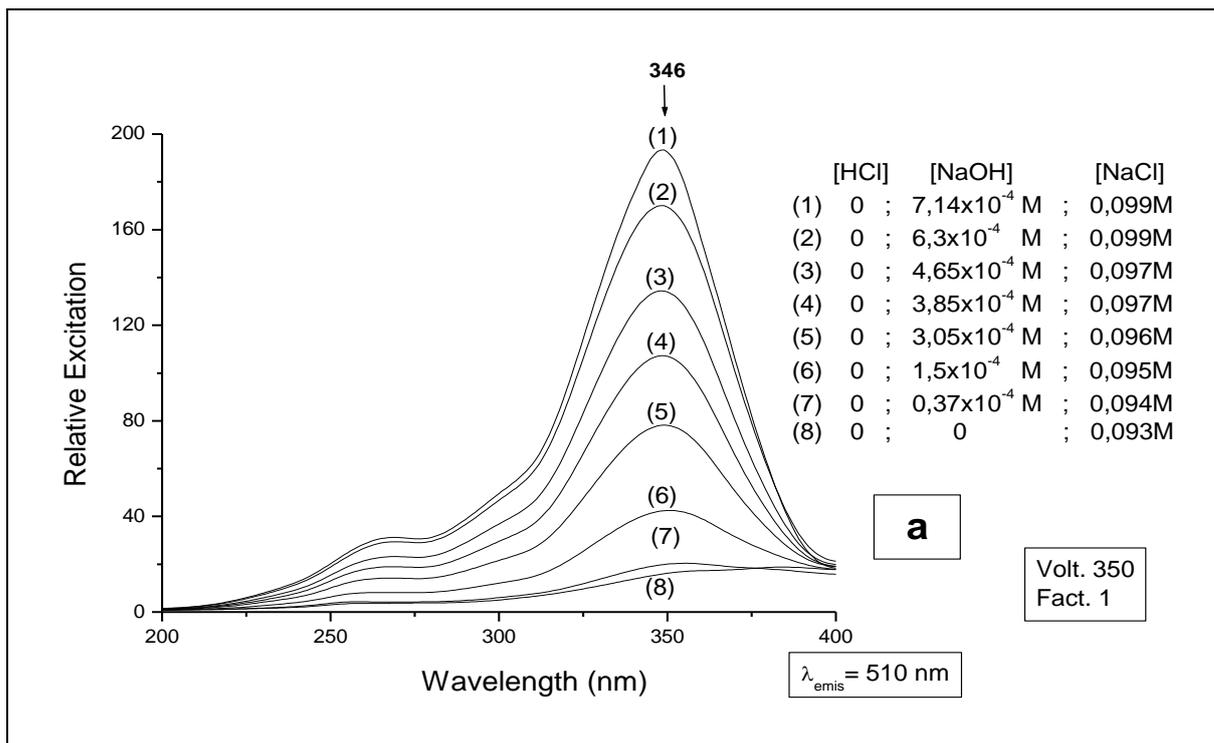


Figure 16 (a et b) : spectres d'excitation du complexe OPA-histamine à haut voltage (350V), $\lambda_{em} = 510$ nm ([OPA] = [histamine] = 10^{-4} M).

Nous avons également tracé les spectres d'émission en fixant l'excitation à 386 nm (**figure 17a**). Nous avons observé l'apparition d'un point isobestique aux environs de 510 nm. Ceci prouve l'existence d'un équilibre entre les deux complexes. En continuant l'acidification, nous constatons que l'intensité des deux pics diminue en même temps quand on atteint la neutralité entre l'acide et la soude (**figure 17b**). Ceci prouve alors que l'acide chlorhydrique inhibe la fluorescence des deux complexes.

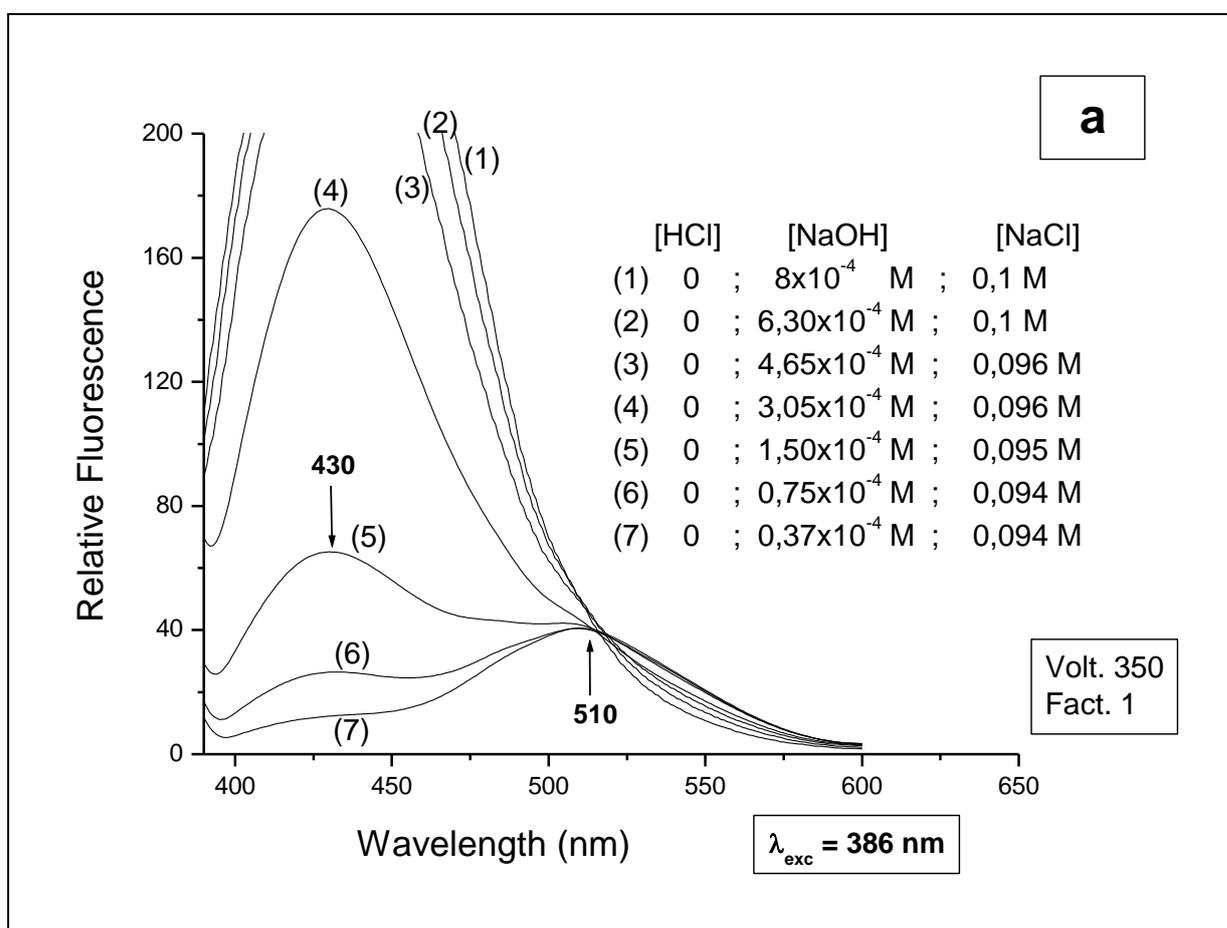
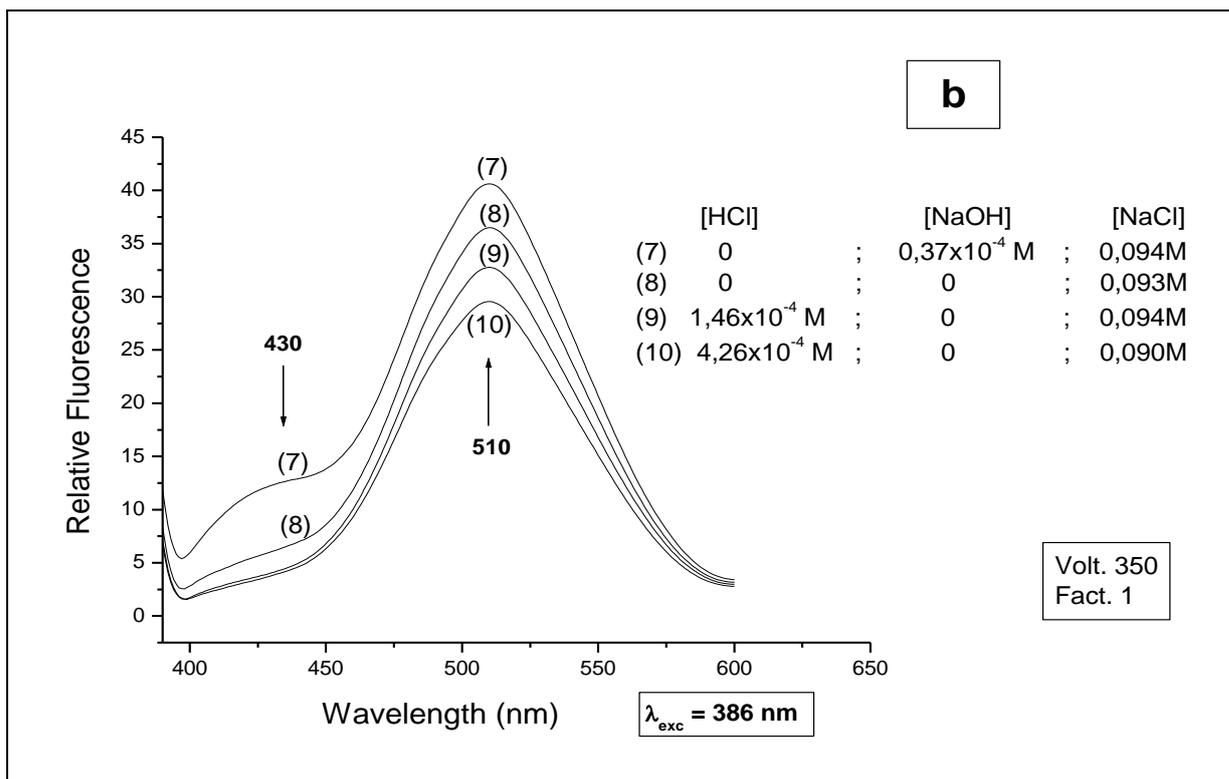


Figure 17 a : spectres d'émission du complexe OPA-histamine à haut voltage (350V), $\lambda_{exc} = 386$ nm ($[OPA] = [histamine] = 10^{-4}$ M).



Figures 17 b : spectres d'émission du complexe OPA-histamine à haut voltage (350V), $\lambda_{exc} = 386 \text{ nm}$ ([OPA] = [histamine] = 10^{-4} M).

Cependant, pour être dans les mêmes conditions choisies par LERKE et BELL, nous avons optimisé l'effet de la concentration de l'OPA. En réalité, les conditions fixées par LERKE et BELL se faisaient pour une concentration d'OPA au voisinage de 10^{-3} M. Si à des concentrations faibles d'OPA de 10^{-4} M aucune fluorescence n'a été constatée, nous notons une faible augmentation de fluorescence du complexe à 430 nm en fonction de la concentration d'OPA qui se stabilise aux environs de 10^{-3} M (**figure 18**). Cependant, l'étude de l'intensité de fluorescence en milieu acide en fonction du pH montre que l'intensité maximale de fluorescence correspond à un intervalle très étroit de pH (**figure 19**). Ce faible intervalle peut causer d'énormes erreurs si on ne travaille pas dans un milieu tampon. Ainsi, nous avons tracé la courbe de calibration de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration d'histamine dans les conditions

optimales de l'OPA en milieu acide (**figure 20**). Nous avons trouvé un coefficient de corrélation de 0,994 et une pente de 2.10^7 . Si la précision de cette courbe est bonne, le domaine de calibration est très faible. Ce faible domaine de calibration ne devrait pas nous donner des résultats probants pour la détermination de faibles taux d'histamine venant des produits halieutiques, d'autant plus qu'on utilise cette méthode de LERKE et BELL pour la détermination du taux d'histamine dans les restes alimentaires consommés par des patients intoxiqués. Ce faible domaine de calibration nous a conduit à travailler dans un milieu alcalin.

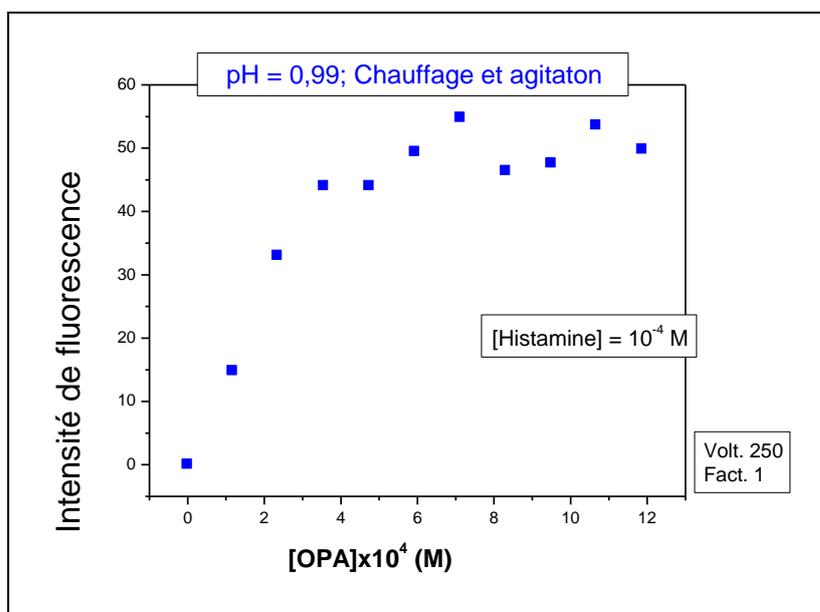


Figure 18 : Effet de la concentration d'OPA sur la fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu acide.

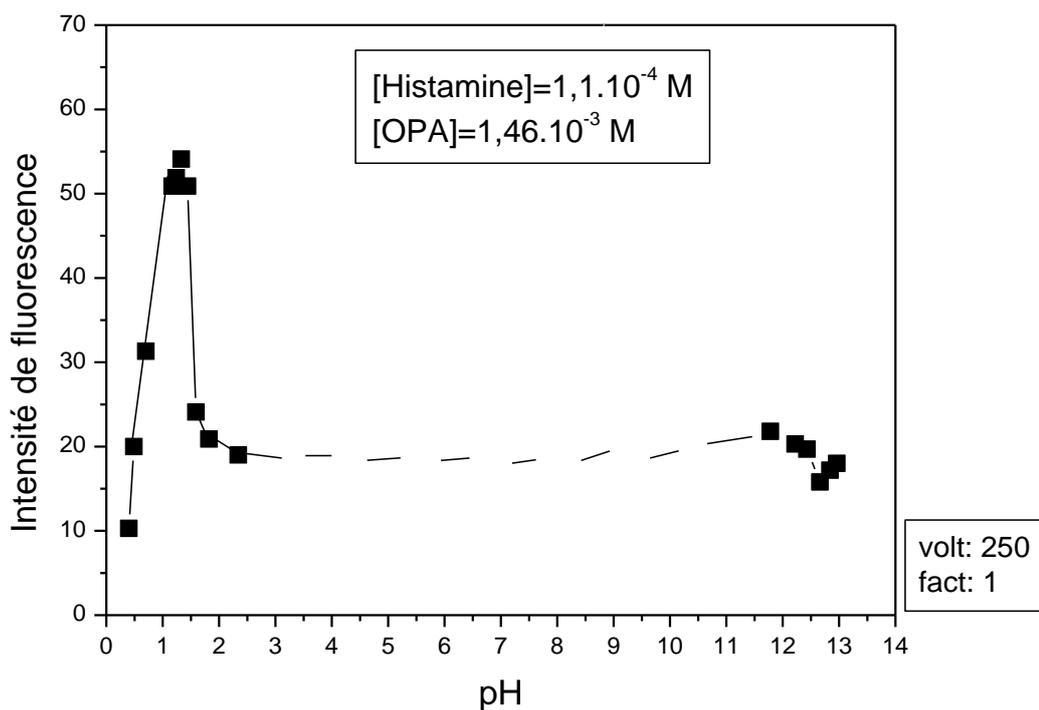


Figure 19 : Effet du pH sur la fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu acide.

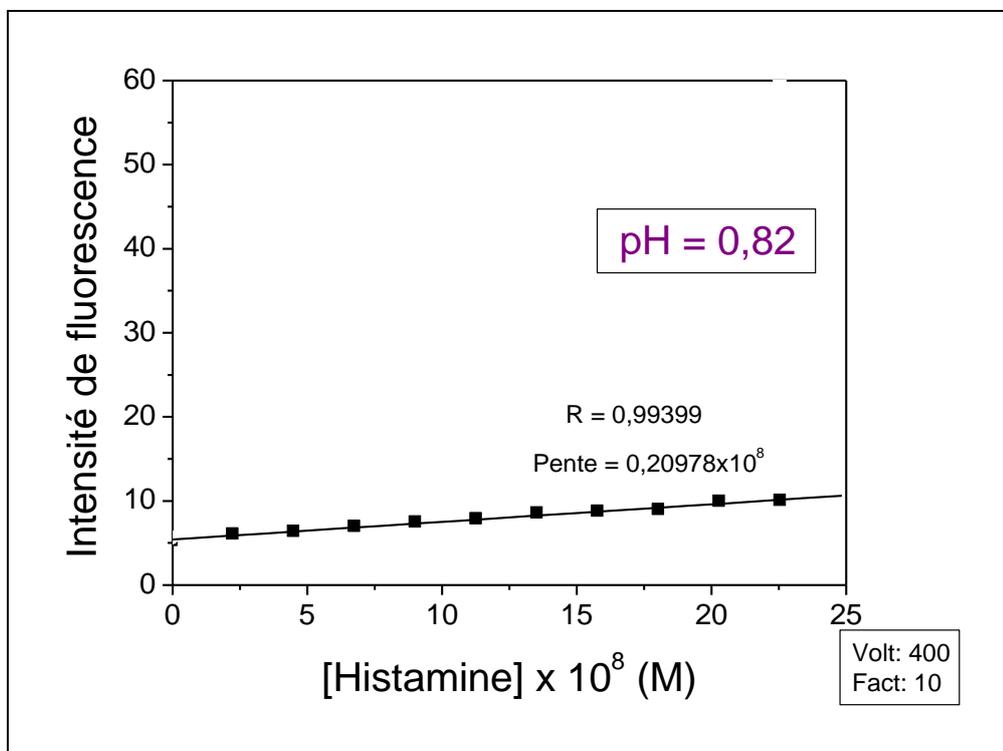


Figure 20 : Calibration du complexe OPA-histamine en milieu acide selon la méthode de LERKE et BELL.

β) Effet de NaOH sur la fluorescence du complexe

En étudiant l'effet du pH en milieu alcalin, nous avons constaté que l'intensité de fluorescence est maximale aux environs de pH compris entre 11 et 12, précisément au pH égal à 11,48 (**figure 21**). En tenant compte de toutes les conditions optimales précédentes, nous avons tracé une courbe de calibration à partir de l'intensité de fluorescence correspondant aux paliers du complexe en fonction de la concentration d'histamine (**figure 22**). Nous avons obtenu une pente très élevée (2,38.108) avec un coefficient de corrélation de 0,999 prouvant la précision de nos mesures.

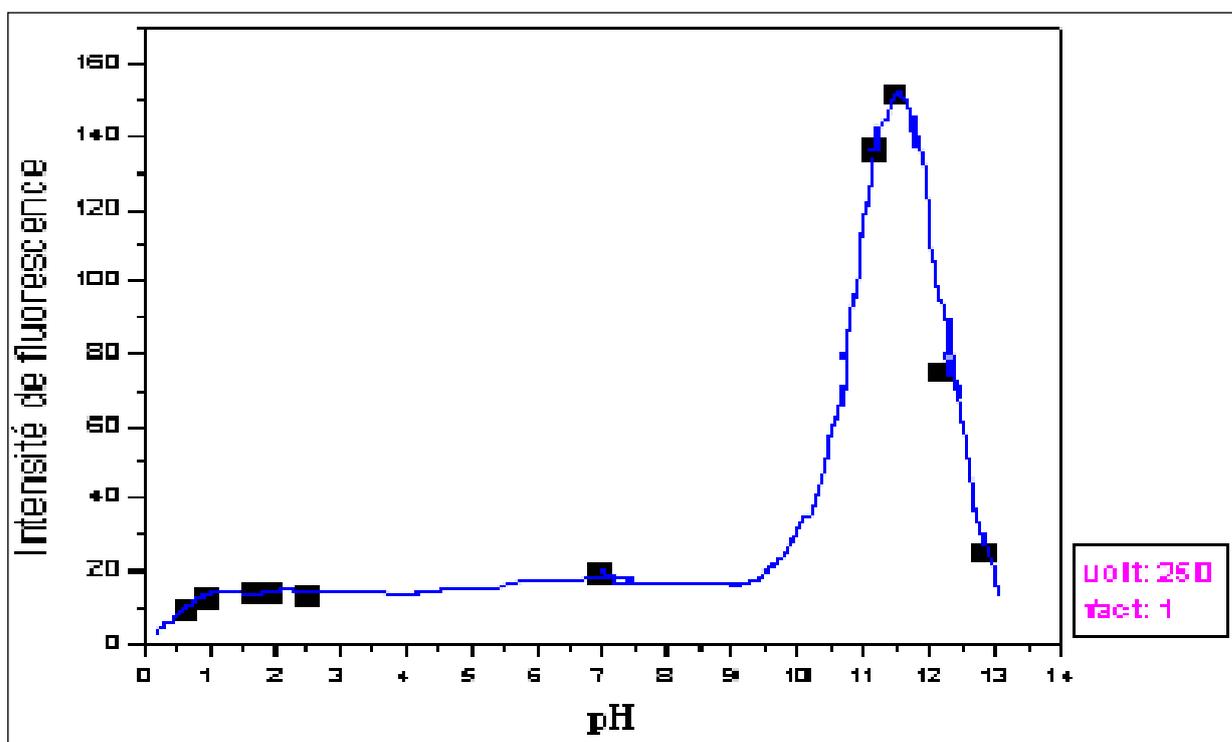


Figure 21 : *Effet du pH sur la fluorescence du complexe OPA-histamine en milieu basique ($[OPA] = 1,1.10^{-4} M$ et $[histamine] = 1,1.10^{-4} M$).*

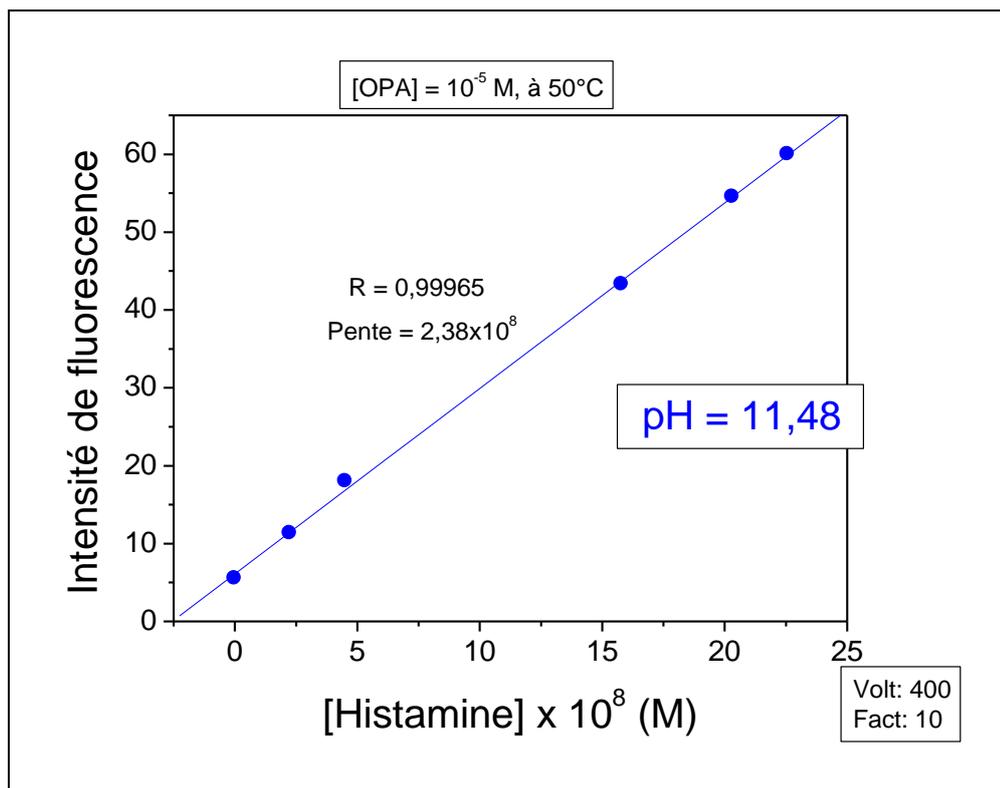


Figure 22 : Calibration de l’histamine en présence d’OPA 10^{-5} M en milieu NaOH à pH 11,48.

En comparant nos résultats obtenus en milieu alcalin avec ceux obtenus en milieu acide, nous avons constaté que le domaine de calibration est dix fois plus élevé en milieu alcalin, avec un coefficient de corrélation beaucoup plus proche de l’unité (**figures 23, 24** et **tableau 3**). Les résultats d’analyse à partir des droites de calibration sont donc beaucoup plus précis en milieu alcalin qu’en milieu acide. Les résultats statistiques ont montré une nette amélioration de notre méthode par rapport à celle de LERKE et BELL. En effet, si la limite de détection est de 0,25 ng/mL pour la méthode en milieu basique, elle est seulement de 2,5 ng/mL en procédant par la méthode de LERKE et BELL. De même, le taux de recouvrement est compris entre 89 et 114% pour notre méthode. Il est alors compris entre 17 et 217% pour l’autre méthode, donc un très large taux de recouvrement. Ainsi, les résultats statistiques montrent que la méthode d’analyse en milieu basique est nettement meilleure que celle en milieu acide.

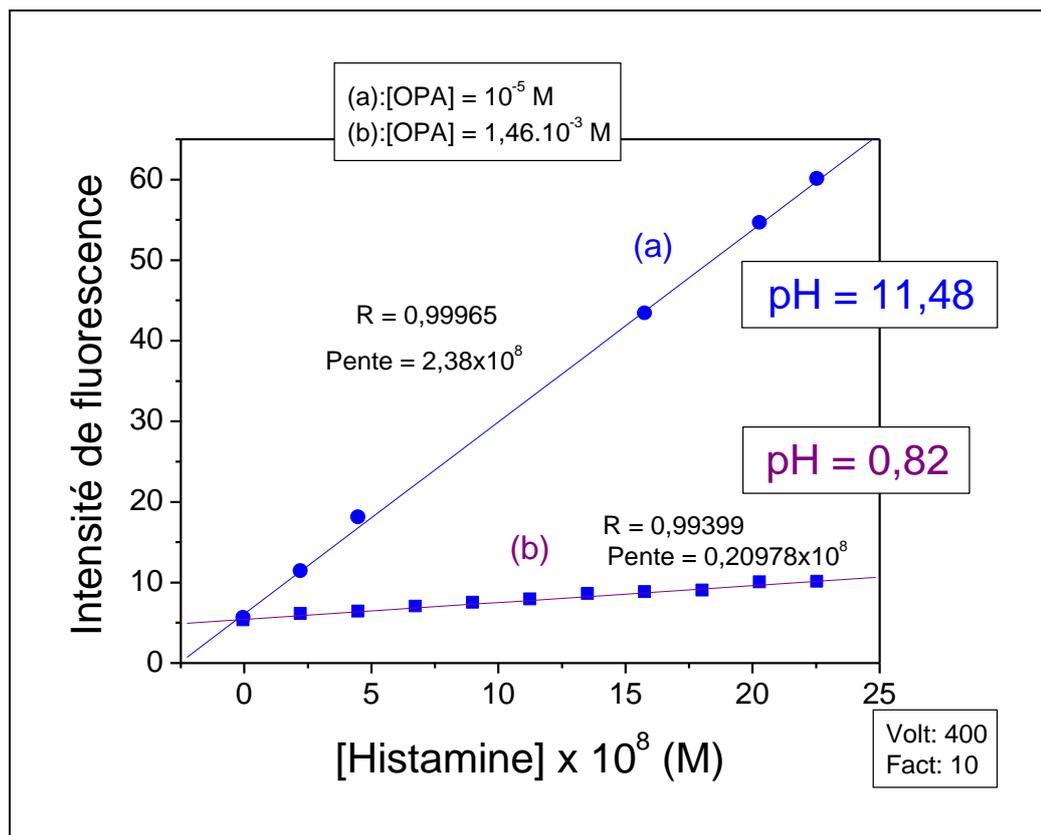


Figure 23 (a et b) : Calibration du complexe OPA-histamine en milieu basique (a) et en milieu acide (b).

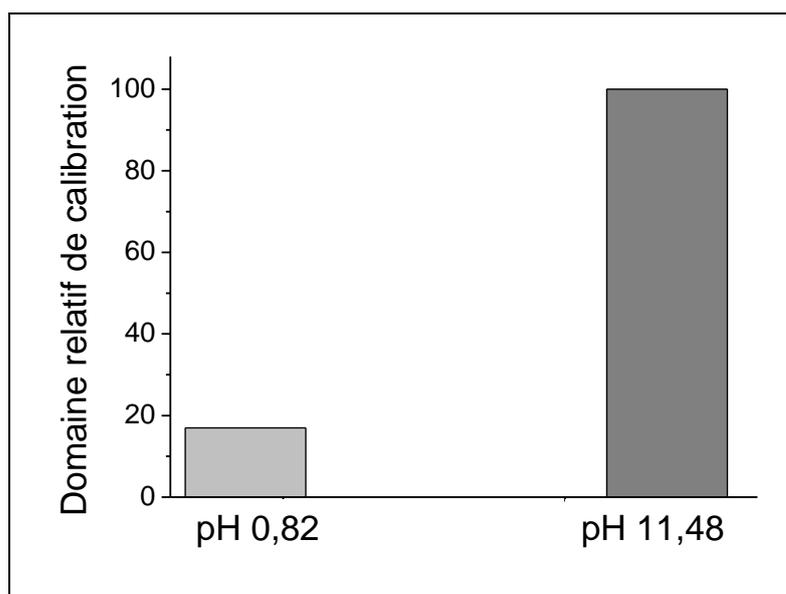


Figure 24 : Diagramme comparatif des domaines de calibration du complexe OPA-Histamine en milieux acide (pH 0,82) et basique (pH 11,48).

Tableau 3: Comparaison des résultats statistiques obtenus dans les deux milieux

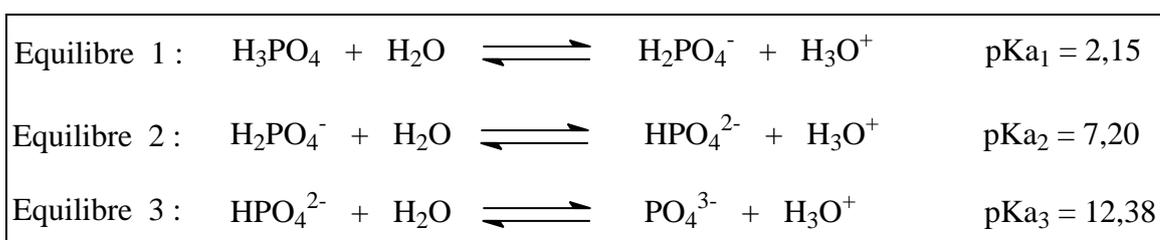
Méthode	Domaine relatif de calibration en If	Limite de détection (ng/mL)	Taux de recouvrement	Coefficients de corrélation
Notre méthode (milieu basique)	1 - 100	0,25	89% - 114%	0,9996
Méthode de Lerke et Bell (milieu acide)	0 - 10	2,5	17% - 217%	0,9940

Si nos résultats obtenus en milieu basique sont beaucoup plus probants qu'en milieu acide, on remarque que le domaine de pH correspondant à l'intensité maximale de fluorescence est très étroit (**figure 21**). D'où l'utilité de travailler dans une solution tamponnée pH égale à 11,48.

3. Optimisation avec le tampon phosphate

a) Préparation de la solution tampon phosphate

La neutralisation de l'acide de l'éluat en vue de la réaction de la condensation est une réaction entre une base forte et un acide fort (NaOH et HCl). Une telle réaction provoque toujours un saut brusque de pH au voisinage du point équivalent entre l'acide et la base. Il est alors difficile d'être dans les conditions optimales de pH en neutralisant uniquement l'acidité de l'éluat par la soude. C'est pourquoi nous avons utilisé une solution tampon. Cette solution est obtenue à partir de l'acide phosphorique. On sait que l'acide phosphorique correspond à trois équilibres qui sont :



En neutralisant l'acide phosphorique par la soude, on peut avoir une solution tampon correspondant à l'équilibre 3. En effet, cet équilibre nous permet d'avoir une solution tampon couvrant le pH égale à 11,5. L'étendue de ce domaine tampon couvre un intervalle contenant la valeur du pH de travail (11,5). Nous avons donc la formulation suivante pour les faibles concentrations de PO_4^{3-} et de HPO_4^{2-} :

$$pH = pKa + \log \frac{[PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]} \quad (1)$$

On sait d'autre part que la concentration de l'acide chlorhydrique de l'éluat est 0,2N. Pour minimiser l'apport de cet acide dans la solution tampon, nous devons utiliser de fortes concentrations de PO_4^{3-} et de HPO_4^{2-} . Dans ces conditions, le pH de la solution tampon obéit à la relation :

$$pH = pKa + \log \frac{a_{PO_4^{3-}}}{a_{HPO_4^{2-}}} \quad (2)$$

Si on sait que l'activité $a = \gamma \cdot C$, l'activité de l'espèce basique peut s'écrire alors

$$a_{Base} = \gamma_{Base} \cdot [PO_4^{3-}] \text{ et celle de l'espèce acide s'écrit } a_{Acide} = \gamma_{Acide} \cdot [HPO_4^{2-}].$$

Dès lors, la relation (2) peut s'écrire :

$$pH = pKa + \log \frac{a_{Base}}{a_{Acide}} + \log \frac{[PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]} \quad (3)$$

Le rapport des activités de la forme basique par la forme acide étant connu et égale

$$\text{à } \frac{a_{Base}}{a_{Acide}} = 0,447 \quad [111].$$

L'expression du pH peut alors s'écrire :

$$pH = 12,38 + \log 0,447 + \log \frac{[PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]} \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad (4)$$

et après calcul, on peut écrire l'expression finale :

$$\boxed{pH = 12,03 + \log \frac{[PO_4^{3-}]}{[HPO_4^{2-}]}} \quad \text{à } 25^\circ\text{C} \quad (5)$$

Dans le souci d'avoir un pH égale à 11,48 au moment du dosage, nous avons préparé une solution tampon de pH 11,5 (1M). Pour cela, nous avons mélangé 330mL d'une solution d'acide phosphorique 1M à 670 mL de solution de soude 1M. A l'aide d'un pH-mètre et d'un agitateur magnétique, nous avons ajusté le pH à 11,5 en nous servant de la solution de soude 1M. L'expérience a montré qu'en mélangeant 2 mL d'éluat d'histamine contenu dans une solution de HCl 0,2N avec 5 mL de solution tampon, on obtenait un mélange dont le pH tournait autour de 11,48. C'est dans cette solution, en présence d'une concentration bien définie

d'OPA, que l'on faisait la réaction de condensation de l'histamine afin d'obtenir la complexe OPA-histamine (voir le **protocole**).

b) Droite de calibration standard et calcul des limites de détection et de quantification

Nous avons établi une corrélation linéaire entre l'intensité de fluorescence correspondant aux maxima de la cinétique du complexe et la concentration d'histamine en tenant compte de toutes les conditions optimales. La droite de calibration avait une pente de $18,71 \cdot 10^7$ avec un coefficient de corrélation de 0,998 proche de l'unité (**figure 25**).

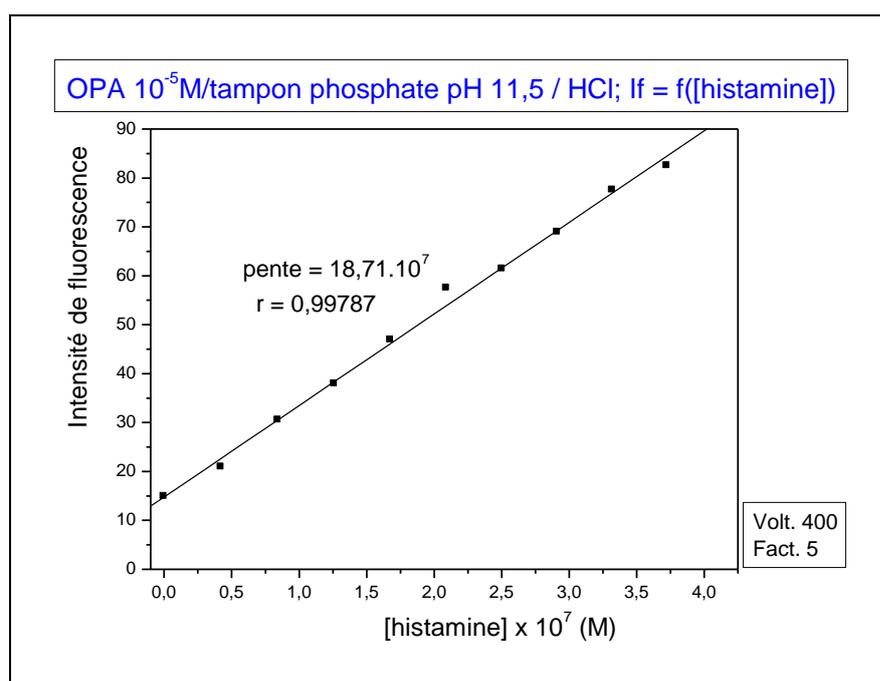


Figure 25: Droite de calibration standard du complexe OPA-histamine en présence d'OPA et du tampon phosphate pH 11,5.

Nous pouvons donc utiliser une solution tampon basique à la place d'une solution de NaOH pour la formation du complexe OPA-histamine. Le seul inconvénient est d'avoir une solution visqueuse à cause de la concentration de la

solution tampon (1M). C'est la raison pour laquelle la limite de détection est faible par rapport à celle obtenue avec le NaOH. Des études supplémentaires sont entrain d'être menées pour diminuer la viscosité de la solution tampon.

A partir de cette droite de calibration, nous avons établi quelques résultats statistiques : la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ). Pour cela, nous avons déterminé l'écart-type correspondant aux essais répétitifs de l'intensité de fluorescence du solvant (voir le **tableau 4**). Nous avons trouvé un écart-type $\sigma = 1,6383124$. A partir de cette valeur, nous avons déterminé la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ).

Tableau 4 : tableau de détermination de l'écart-type des mesures

I_F	14,1	13,7	13,6	13,1	14,9	18,8	14,8	14,6	14,7
$\overline{I_F}$	14,7								
$I_F - \overline{I_F}$	-0,6	-1	-1,1	-1,6	0,2	4,4	0,1	-0,1	0
$\sigma^2 = \frac{\sum (I_F - \overline{I_F})^2}{9}$	2,75								
σ	1,6583124								

La limite de détection (LD) est calculée comme étant la concentration obtenue à partir de l'intensité de fluorescence correspondant à 3 fois l'écart-type sur la droite de calibration, avec :

$$I_{LD} = \overline{I_F} + 3\sigma$$

En traçant la courbe logarithmique $\log(I_F) = f(\log C)$, on a l'équation :

$$\log(I_F) = 0,63765 \cdot f(\log C) + 6,00191$$

dont le coefficient de corrélation vaut 0,9972.

On obtient ainsi une équation sous la forme :

$$\log(I_F) = \alpha \cdot \log C + \beta$$

avec $\alpha = 0,63765$ et $\beta = 6,00191$

Ainsi, pour $I_F = 3\sigma$, on peut écrire :

$$\log 3\sigma = \alpha \cdot \log LD + \beta$$

$$\Leftrightarrow \log \frac{(LD)^\alpha}{3\sigma} = -\beta = \log 10^{-\beta}$$

$$\Rightarrow \boxed{LD = \left(\frac{3\sigma}{10^\beta} \right)^{1/\alpha}}$$

Pour notre cas, en remplaçant α et β par leurs valeurs, on trouve :

$$LD = 0,05 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1} \text{ correspondant à } 555 \text{ ng.L}^{-1} \text{ ou } \mathbf{0,55 \text{ ng.mL}^{-1}}.$$

Cette valeur plus élevée que 0,25 ng/mL obtenue en milieu NaOH serait due à la plus faible intensité de 2,5 ng/mL obtenue en milieu acide à cause de la viscosité.

La limite de quantification (LQ) : elle est définie comme étant la concentration correspondant à l'intensité de fluorescence égale à 10 fois l'écart-type (10σ).

$$LQ = \left(\frac{10\sigma}{10^\beta} \right)^{1/\alpha} = 1,5 \text{ ng.mL}^{-1}$$

Les limites de détection et de quantification très basses de l'ordre de 1 ng/mL sont parmi les meilleures des méthodes de dosage d'histamine connues à nos jours.

Forts de ces résultats, nous avons établi un protocole pour l'extraction et la détermination du taux d'histamine, d'autant plus que le taux de recouvrement est compris entre 96,87 et 110,83%. En effet, cette méthode donne des résultats très fiables et elle est très peu coûteuse. Ce protocole serait donc très utile pour une utilisation industrielle, qui est facile à réaliser avec peu de réactifs.

c) Détermination du taux de recouvrement par notre méthode expérimentale

Pour déterminer le taux de recouvrement du dosage, nous avons effectué des mesures de fluorescence d'une concentration connue d'histamine de l'étalon égale à $7,9 \cdot 10^{-8}$ M. Pour cela, la condensation a été effectuée à 50°C dans une solution de tampon phosphate en présence d'OPA 10^{-5} M. A partir de l'intensité de fluorescence obtenue, on a pu déterminer la concentration correspondante à l'aide de la droite de calibration standard. Pour cette même solution, nous avons effectué des mesures répétitives après avoir vidé préalablement le contenu de la cellule. Nous avons obtenu des concentrations respectives de $7,65 \cdot 10^{-8}$; $7,9 \cdot 10^{-8}$; $8,75 \cdot 10^{-8}$; $8,01 \cdot 10^{-8}$ et $8,08 \cdot 10^{-8}$ mol.L⁻¹ correspondant respectivement à 96,87 ; 100 ; 110,83 ; 101,42 et 102,28%, soit un taux de recouvrement compris entre 96,87 et 110,83%. Ce qui montre que la méthode utilisée est très bonne, beaucoup mieux que la méthode officielle où le taux de recouvrement varie entre 17 et 217%.

4. Protocole expérimental et Applications

a) Protocole expérimental

a) Préparation de la résine et de la colonne chromatographique

Mettre en suspension 1g de résine Amberlite GC-50 dans 15 mL de tampon acétate (pH 4,62) contenu dans un bécher. Transvaser la suspension de résine dans la colonne chromatographique propre. La hauteur de la couche de résine doit être 5 cm environ. Il est parfois nécessaire de garnir le fond en verre fritté de la colonne à l'aide du coton pour éviter que la résine ne le traverse.

β) Conservation et régénération de la résine

Pour régénérer et conserver la résine, il faut la rincer et la maintenir immergée dans HCl 1N après chaque usage. L'acide chlorhydrique 1N ne sera élué qu'en vue d'une nouvelle extraction d'histamine. La résine est ensuite lavée à l'aide de 100 mL d'eau distillée puis de 100 mL de tampon acétate pH 4,62.

γ) Préparation de la solution d'acide trichloracétique (TCA) 10%

Peser 100g de cristaux d'acide trichloracétique et les dissoudre dans 900 mL d'eau distillée. Lors de cette opération, éviter tout contact avec ce produit, car il cause de graves brûlures. La solution obtenue devra également être manipulée avec beaucoup de précaution.

δ) Préparation du tampon acétate pH 4,62 (0,2M)

Dans une fiole jaugée de 1 L, dissoudre 8,05g d'acétate de sodium anhydre dans de l'eau distillée. Y ajouter 5,9 mL d'acide acétique cristallisable. Compléter le volume de la fiole à 1 L avec de l'eau distillée. Ajuster le pH à 4,62 à l'aide d'un pH-mètre et d'un agitateur magnétique; pour cela, se servir d'une solution de NaOH 1N ou d'acide acétique 1N.

ε) Préparation du tampon phosphate pH 11,5 (1M)*

Préparer 1 litre de solution de NaOH 1M en dissolvant 40g de soude dans un litre d'eau distillée. Préparer également une solution d'acide phosphorique 1M. Mélanger ensuite 330 mL de la solution d'acide phosphorique 1M avec 670 mL de la solution de soude 1M. A l'aide d'un pH-mètre et d'un agitateur magnétique, procéder à l'ajustement du pH à 11,5 en se servant d'une solution de soude 1M ou d'acide phosphorique 1M.

θ) Préparation de la solution d'OPA*

Selon le degré de pureté de l'OPA dont on dispose (OPA 97% par exemple), peser 27 mg du produit. Solubiliser celui-ci dans de l'eau distillée à l'aide d'une fiole jaugée de 50 mL. Pour une solubilisation rapide, on peut utiliser d'abord 5 mL de méthanol avant d'ajouter de l'eau distillée. Une agitation vigoureuse permet dans tous les cas d'homogénéiser la solution. On obtient ainsi une solution d'OPA de concentration voisine de $3,9 \cdot 10^{-3}$ M.

ι) Préparation de la solution d'histamine standard

Peser environ 8,7 mg d'histamine 96% (standard) puis les dissoudre dans 50 mL d'eau distillée à l'aide d'une fiole jaugée. On obtient donc une concentration de $1,5 \cdot 10^{-3}$ M environ. Par dilutions successives avec de l'eau distillée, ramener celle-ci à une concentration de $1,5 \cdot 10^{-6}$ M.

Les prélèvements sont effectués à partir de cette dernière solution diluée pour l'établissement de la droite de calibration standard.

κ) Préparation de l'échantillon

Prélever une certaine masse de poisson en évitant le mieux possible les arêtes (os) et les écailles. Broyer cette chair de poisson à l'aide d'un Moulinex et prélever exactement dix grammes de broyat puis mélanger avec 90 mL de la solution de TCA 10% (l'ensemble constitue V_{ext}). Le tout sera homogénéisé pendant 15 minutes grâce à l'agitation magnétique. Procéder ensuite à la filtration à travers le papier Watman. Jeter les premières gouttes et recueillir 50 mL de filtrat dans un bécher dont 0,2 mL (V_{fil}) y seront prélevés pour l'extraction de l'histamine.

λ) Extraction de l'histamine

Dans un becher contenant 20 mL de tampon acétate, introduire 0,2 mL de filtrat (V_{fil}), à l'aide d'une pipette. Après agitation, transférer le mélange dans la

colonne chromatographique dotée de résine Amberlite CG-50 tamponnée à pH 4,62. Ouvrir légèrement le robinet de la colonne avec un débit d'une goutte toutes les 3 secondes. Lorsqu'il ne reste plus qu'un centimètre de liquide au dessus de la résine dans la colonne, verser les 30 mL de tampon acétate ayant servi au rinçage du bécher précédent. Laisser l'écoulement à la même vitesse (1 goutte/ 3 secondes). Verser ensuite 50 autres mL de tampon acétate pour dégager toutes les molécules non fixées par la résine. L'extraction de l'histamine se fera à la fin de ce dernier écoulement ; pour cela, placer une fiole jaugée propre de 20 mL sous la colonne. Verser dans la colonne 18 mL de solution d'acide chlorhydrique 0,2 N. Ouvrir le robinet de la colonne pour éluer l'histamine. Compléter l'éluat recueilli dans la fiole jaugée à 20 mL (V_{col}) à l'aide de l'eau distillée. Y prélever 2 mL ($V_{élu}$) pour la réaction de condensation (dérivatisation) avec l'OPA.

μ) Réaction de condensation avec l'OPA*

Introduire dans un flacon à fond plat servant de réacteur 5 mL de tampon phosphate (pH 11,5), 2 mL d'éluat d'histamine et 20 μ L de la solution d'OPA $3,9 \cdot 10^{-3}$ M. Placer tout le contenu du réacteur ($V_{réa}$) dans un bain-marie, chauffé entre 50 et 55°C à l'aide d'une plaque chauffante thermostatée tout en agitant pendant 2 minutes. Retirer le réacteur du bain-marie et prélever une partie de ce contenu pour mesurer l'intensité de fluorescence du complexe OPA-histamine.

ν) Mesure de fluorescence du complexe*

Aussitôt après le retrait du réacteur du bain marie, verser une partie (environ 3,5 mL) du mélange dans la cuve parallélépipédique de fluorescence en quartz à cinq faces polies. Placer ensuite la cuve dans le support du spectrofluorimètre et enregistrer la courbe de la cinétique de formation du complexe OPA-histamine. L'intensité maximale de la courbe de cinétique obtenue permet de déterminer la concentration du complexe par comparaison à celle de l'étalon. Cette concentration

peut également être déterminée par extrapolation à partir de la droite de calibration standard. Le complexe OPA-histamine étant d'ordre 1:1, la concentration de l'histamine est égale à celle du complexe.

N.B. *la droite de calibration standard est obtenue également à partir de l'intensité maximale de fluorescence de la cinétique de formation du complexe OPA-histamine (étalon), dans les mêmes conditions décrites ci-dessus (réaction de condensation et mesure de fluorescence).*

ξ) Calcul du taux d'histamine dans l'échantillon*

L'exploitation de la courbe de cinétique permet de relever la valeur de l'intensité maximale de fluorescence dont l'extrapolation à partir de la droite de calibration standard détermine la concentration de l'histamine contenue dans le réacteur ($V_{réa}$) et d'en déduire le taux d'histamine de l'échantillon. Tenant compte des différentes dilutions effectuées, les calculs aboutissent à la valeur du taux d'histamine, en partie par million (ppm), dans l'échantillon suivant la formule :

$$Taux = \frac{V_{ext} \cdot V_{rea} \cdot V_{col} \cdot 10^{-3} \cdot 111,1 \cdot 10^6 \cdot [Histamine]}{V_{fil} \cdot V_{elu} \cdot m} \quad (\text{ppm})$$

Où m = masse en gramme du broyat de l'échantillon et $[Histamine]$ = concentration molaire de l'histamine dans le réacteur ou la cuve.

En définitif, compte tenu des volumes utilisés l'expression ci-dessus du taux peut s'écrire :

$Taux = \frac{100 \cdot 7,02 \cdot 20 \cdot 10^{-3} \cdot 111,1 \cdot 10^6 \cdot [Histamine]}{0,2 \cdot 2 \cdot 10} = 3,89 \cdot 10^8 \cdot [Histamine] \quad (\text{ppm})$

Notre protocole expérimental de détermination du taux d'histamine d'un produit halieutique est illustré par le **schéma 7**.

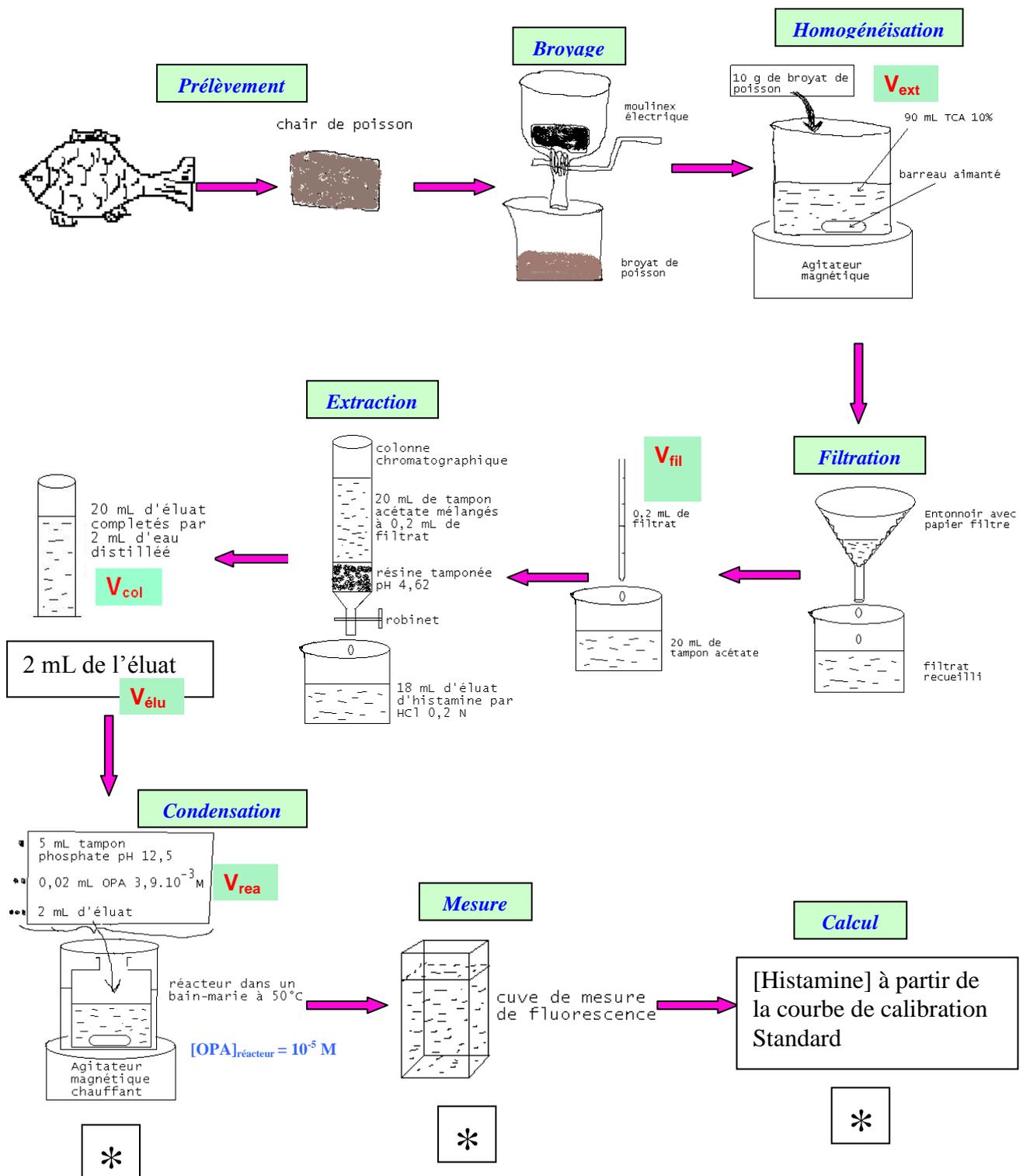


Schéma 7 : protocole de détermination du taux d'histamine dans les produits halieutiques

* Représente la nouveauté de notre méthode par rapport à celles de LERKE et BELL ou de l'Association Officielle de Chimie Analytique (OAC).

b) Applications : détermination du taux d’histamine dans le poisson

Pour illustrer notre protocole de détermination du taux d’histamine, nous avons déterminé le taux d’histamine contenu dans un échantillon de poisson séché. L’expérience a été faite en deux étapes. La première étape consistait à déterminer le taux d’histamine aussitôt après l’achat (**échantillon 1**), et la seconde étape quelques jours après, en prenant soin de bien garder l’échantillon au congélateur (**échantillon 2**).

a) Détermination du taux d’histamine dans l’échantillon 1

Nous avons extrait l’histamine de cet échantillon conformément au protocole décrit ci-dessus. Nous avons comparé ensuite les spectres d’excitation et d’émission de l’histamine extraite de l’échantillon avec ceux venant de l’étalon dans le même solvant (**figure 27**). Nous avons obtenu une différence de longueurs d’onde nulle pour chaque type de spectre, confirmant alors la présence de l’histamine dans notre échantillon.

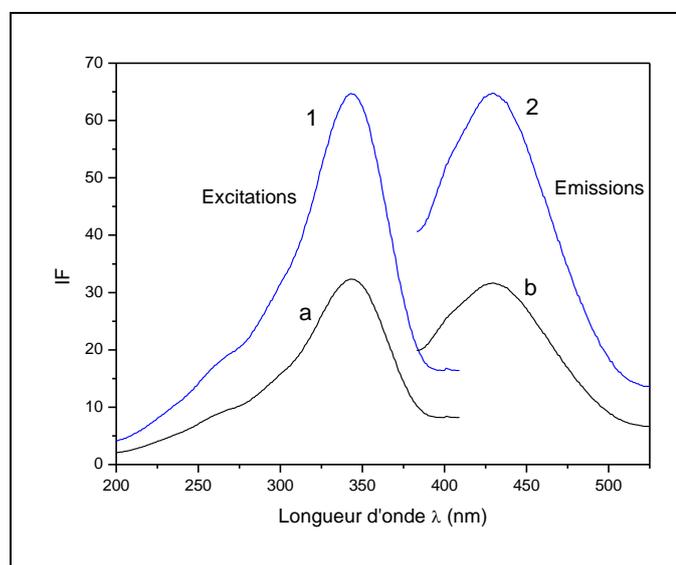


Figure 27 : Spectres d’excitation et d’émission du complexe OPA-histamine : histamine authentique (a et b), extrait de l’échantillon (1et 2) ; en présence d’OPA 10^{-5} M et du tampon phosphate pH 11,5.

Nous avons ensuite déterminé le taux d’histamine de l’échantillon à partir de la droite d’addition standard et la courbe de calibration de l’histamine (**figure 28**).

Les coefficients de corrélation correspondant aux deux droites sont de l'ordre de 0,999 proches de l'unité. Ce qui indique la bonne précision de nos mesures. Une bonne extrapolation de l'ordonnée à l'origine de la droite d'addition standard sur la droite de calibration nous donne la concentration de l'histamine contenue dans le réacteur. Avec la concentration de $1,39 \cdot 10^{-7}$ M trouvée, le calcul donne un taux d'histamine égale à 54 ppm en utilisant la formulation du protocole.

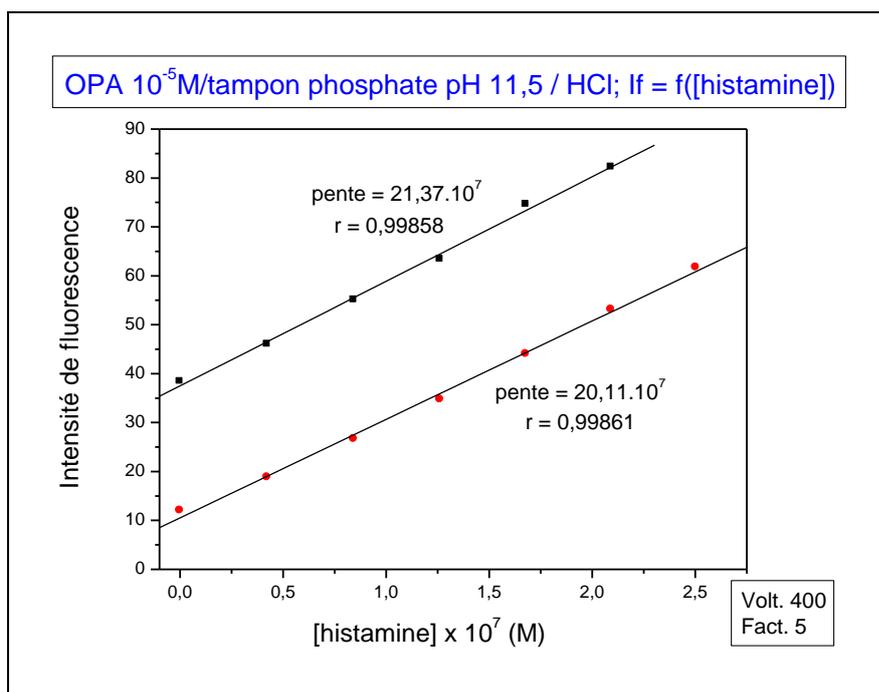


Figure 28 : Addition standard (dessus) et calibration (dessous) de l'histamine en présence d'OPA 10^{-5} M et du tampon phosphate pH 11,5.

β) Détermination du taux d'histamine dans l'échantillon 2

Avec le même procédé, nous avons réalisé une droite de calibration standard (en fonction de la concentration de l'histamine de l'étalon) et une autre d'addition standard (**figure 29**). Nous avons trouvé aussi pour les deux droites des coefficients de corrélation de l'ordre de 0,999 indiquant la précision de nos mesures. L'utilisation de ces deux courbes nous a permis par extrapolation d'en

déduire la concentration de l'histamine égale à $1,4 \cdot 10^{-7}$ M dans le réacteur. Ce qui correspond toujours à un taux de 54 ppm en utilisant la formulation du protocole. Ce taux d'histamine de 54 ppm est identique à celui obtenu lors de la première mesure de l'échantillon 1. Ce résultat prouve donc qu'il n'a pas eu d'évolution du taux d'histamine quand on a conservé l'échantillon au froid. Ce résultat prouve également la reproductibilité de notre méthode.

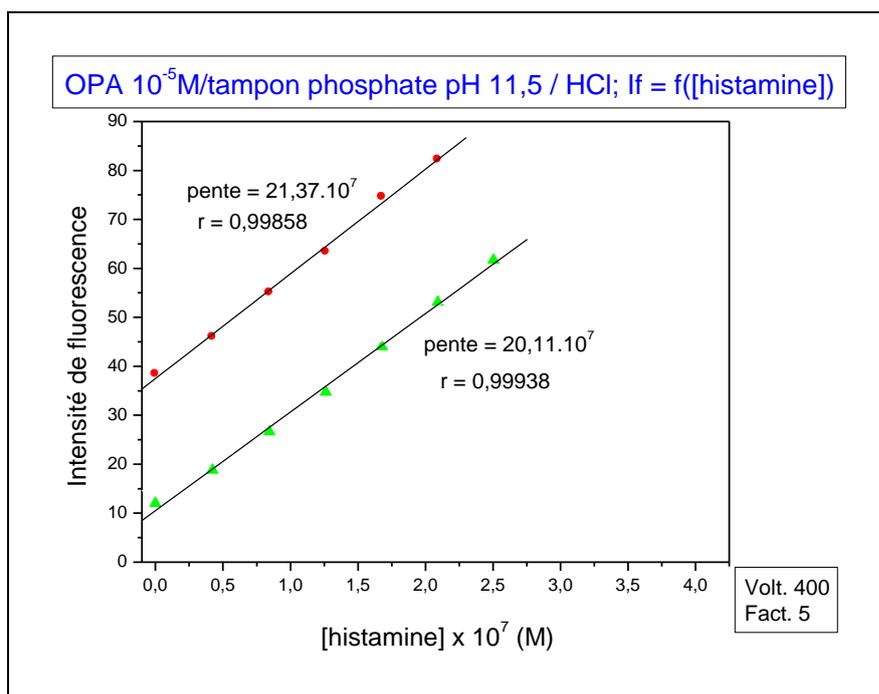


Figure 29 : Addition standard (dessus) et calibration standard (dessous) de l'histamine en présence d'OPA 10^{-5} M et du tampon phosphate pH 11,5 : vérification de la reproductibilité.

V. CONCLUSION GENERALE

Notre présent travail composé de quatre parties aboutit aux résultats suivants :

La première partie composée de nos études préliminaires en absorption et en fluorescence nous a permis de confirmer la stoechiométrie 1:1 de la réaction entre l'orthophthalaldéhyde (OPA) et l'histamine. Les courbes de calibration obtenues en absorption et en fluorescence nous permettent de déterminer le taux d'histamine correspondant aux concentrations de 10^{-5} M et au dessus.

Pour avoir des limites de détection plus faibles, nous avons effectué des courbes de calibration entre l'intensité de fluorescence correspondant aux maxima de la cinétique de formation du complexe en fonction de la concentration de l'histamine. Après avoir cherché les conditions optimales (température optimale, pH optimal 11,48...), nous avons obtenu une stabilité du complexe OPA-histamine et les corrélations correspondant aux droites de calibration obtenues étaient de 0,99 proches de l'unité. Dans ce même milieu basique, nous avons eu un grand domaine de calibration. Les limites de détection étaient de 0,25 ng/mL, beaucoup plus faibles que lors de nos travaux préliminaires. Nous avons montré ainsi que la détermination du taux d'histamine était plus probante et plus fiable en milieu basique qu'en milieu acide (conditions de LERKE et BELL ou de l'Association Officielle de Chimie Analytique). En effet, nous avons montré l'existence de deux types de complexes en milieu acide et un domaine de calibration très faible.

Cependant, l'étude de pH sur la fluorescence du complexe nous a montré un intervalle très étroit du pH en milieu basique. Il nous fallait donc faire le même travail en solution tampon pH avoisinant 11,48. Dans ce milieu, en tenant compte des conditions optimales, nous avons également établi des corrélations linéaires

entre les intensités de fluorescence correspondant aux maxima de cinétique du complexe et la concentration de l'histamine. Les coefficients de corrélation de 0,999 montrent la précision de nos mesures. La comparaison des résultats statistiques de nos mesures avec ceux obtenus par la méthode de LERKE et BELL ont montré que notre méthode était de loin plus fiable, plus précise et plus reproductible que la méthode officielle de LERKE et BELL ou de l'OAAC.

Forts de nos résultats, nous avons établi donc un protocole expérimental avec lequel nous avons déterminé le taux d'histamine venant du poisson séché à partir de deux échantillons du même poisson à des intervalles de temps différents. Dans tous les cas, nous avons obtenu les mêmes résultats, ce qui explique la fiabilité et la reproductibilité de notre méthode.

Les difficultés rencontrées pour la détermination du taux d'histamine par la méthode officielle sont donc résolues et notre protocole peut servir valablement, d'une manière plus précise et plus nette, pour la détermination du taux d'histamine aussi bien dans les milieux industriels que dans les hôpitaux.

Pour la suite de nos travaux, nous envisageons d'adapter notre méthode de dosage en « Flow Injection Analysis » (FIA) pour des analyses en série. Une étude parallèle du dosage de l'azote basique volatil total (ABVT) est prévue également pour établir une relation entre le taux d'histamine et le degré d'altération du poisson. Les résultats obtenus en FIA nous permettraient d'avoir un éventail de protocoles pour la détermination du taux d'histamine dans le poisson et tous les autres produits halieutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] - H.H. Huss; [La qualité et son évolution dans le poisson frais](#); document technique sur les pêches – 348, Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO); Rome, 1999.
http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/003/V7180F/V7180F00.HTM
- [2] - <http://www.ictsd.org/africodev/index.htm> (centre international pour le commerce et le développement durable : bulletin mensuel «Passerelles»).
- [3] - <http://www.gouv.sn/senegal/index.html> (site officiel du gouvernement du Sénégal)
- [4] - K. Becker, K. Southwick, J. Reardon, J.N. McCormack; Histamine poisoning associated with eating tuna burgers; J. American Med. Assoc., Vol. 285, N° 10 (2001) 1327-1330.
- [5] - S. Taylor, Histamine food poisoning: toxicity and clinical aspects; Critical Rev. in Tox., (1986) 91-128.
- [6] - F. Antolini, S. Franciosini, A.L. Floridi, A. Floridi; An ion pair HPLC method for the determination of histamine, tyramine, tryptamine, β -phenylethylamine and their amino acid precursors in cheeses for industrial purposes; Italian J. Food Science, Vol. 11, N° 4 (1999) 335-346.
- [7] - M. Izquierdo-Pulido, S. Albala-Hurtado, A. Marine-Font, M.C. Vidal-Carou; Biogénic amines in Spanish beers: differences among breweries; Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, Vol. 203, N° 6 (1996) 507-511.
- [8] - J. Borycz, M. Vohra, G. Tokarczyk, I.A. Meinertzhagen; The determination of histamine in drosophila head; J. Neuroscience Methods, Vol. 101, N° 2 (2000) 141-148.
- [9] - C. Ito; The role of brain histamine in acute and chronic stresses: Stress; Biomedicine and pharmacotherapy, Vol. 54, N° 5 (2000) 263-267.
- [10] - T.L. Chambers, W.F. Staruszkiewicz; J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61 (1978) 1092.
- [11] - S.L. Taylor, J.E. Stratton, J.A. Nordlee; J. Toxicol., 27 (1989) 225.
- [12] - L. Lehane, J. Olley; Histamine fish poisoning revisited; International J. Food Microbiol., Vol. 58, N° 1-2 (2000) 1-37.
- [13] - S.H. Kim, K.G. Field, M.T. Morrissey, R.J. Price, C.I. Wie, A.N. Haejung; Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore; J. Food Prot., Vol. 64, N° 7 (2001) 1035-1044.
- [14] - E.I. Lopez-Sabater, J.J. Rodriguez-Jerez, A.X. Roig-Sagues, M.A.T. Mora-Ventura; J. Food Prot., 57 (1994) 318.
- [15] - K.V. Basavakumar, I. Karunasagar; Indian J. Microbiol., 32 (1992) 75.
- [16] - P.K. Vijayan, P.K. Surendran, K.K. Balachandran; (Symp. On Tropical Marine Living Ressources, Cochin, India, Jan.12-16, 1988), J. Mar. Biol. Assoc. India, 31 (1989) 202.
- [17] - C.M. Osborne, P.J. Bremer; Application of the Bigelow (z-value) model and histamine detection to determine the time and temperature required to eliminate morganella morganii from seafood; J. Food Prot., Vol. 63, N° 2 (2000) 277-280.

- [18] - A.L. Cinquina, F. Longo, A. Cali, L. De Santis, R. Baccelliere, R. Cozzani; Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. *J. Chromatogr.*, Vol. 1032, N° 1-2 (2004) 79-85.
- [19] - A.R. Shalaby; Significance of biogenic amines to food safety and human health; *Food Res. Int.*, Vol. 29, N° 7 (1996) 675–690.
- [20] - M. Arlorio, J.D. Coisson, A.Martelli; Extraction methods for biogenic amines in wine and beer; *Italian J. Food Science*; Vol. 11, N° 4 (1999) 355-360.
- [21] - F. Wantke, W.Hemmer, T. Haglmuller, M. Gotz, R. Jarisch; Histamine in wine: Bronchoconstriction after a double-blind placebo-controlled red wine provocation test; *International archives of allergy and immunology*; Vol. 110, N° 4 (1996) 397-400.
- [22] - T. Hibit, M. Senda; Enzymatic assay of histamine by amperometric detection of H₂O₂ with a peroxidase-based sensor; *Bioscience-biotechnology-and-biochemistry*, Vol. 64, N° 9 (2000) 1963-1966.
- [23] - K.B. Male, P. Bouvrette, J.H.T. Luong, B.F. Gibbs; Amperometric biosensor for total histamine, putrescine and cadaverine using diamine oxidase; *J. Food science*; Vol. 61, N° 5 (1996) 1012-1016.
- [24] - K. Pihel, Hsieh-Showchien, J.W. Jorgeson, R.M. Wightman; Electrochemical detection of histamine and 5-hydroxytryptamine at isolated mast cells; *Analytical chemistry*, Vol. 67, N° 24 (1995) 4514-4521.
- [25] - I.G. Casella, M. Gatta, E. Desimoni; Determination of histamine by high-pH anion-exchange chromatography with electrochemical detection; *Food chemistry*, Vol. 73, N° 3 (2001) 367-372.
- [26] - M.J. Van der Schans, J.C. Reijenga, F.M. Everaerts, A. Cohen, S. Terabe, Z. Deyl; Quality control of histamine and methacholine in diagnostic solutions with capillary electrophoresis: Capillary electrophoresis separations of drugs; *J. Chromatogr.*, Vol.735, N° 1-2 (1996) 387-394.
- [27] - K. Kuruma, T. Sakano; Highly sensitive determination of histamine by narrow-bore high-performance liquid chromatography using post-column fluorescence detection; *Analytical Sciences*, Vol. 15, N° 5 (1999) 489-492.
- [28] - P.A. Lerke, D. Bell L; *J. Food Sci.*, 41 (1976) 1282.
- [29] - P.A. Lerke, S. Werne, S. Taylor; *West. I. Med.*, 129 (1978) 381.
- [30] - P.A. Lerke, M.N. Poscuna, H.B. Chin; *J. Food Sci.*, 48 (1983) 155.
- [31] - W. Lorenz, E. Neugebauer, B. Uvnäs, M.A. Beaven, M. Ennis, G. Granerus, J.P. Green, J.J. Keyzer, P.T. Mc Bride, P.F. Mannaioni, F.L. Pearce, J. Watkins; K. MUNICH Consensus Development Conference On Histamine Determination, Current techniques of histamine determination, 2 (1990) 81.
- [32] - P.L. Rogers, W. Staruszkiewicz; *J. AOAC International*, Vol. 80, N° 3 (1997) 591-602.
- [33] - W. Lorenz, and E. Neugebauer; Fluorometric assays, Current techniques of histamine determination; 2 (1990) 9-30.
- [34] - P.B. Henderson; Case of poisoning from the bonito (*Scomber pelamis*); *Edinburgh Med. J.*, 34 (1830) 317–318.
- [35] - C. Den Brinker, C. Rayher, and M. Kerr; Investigation of Biogenic Amines in Fermented Fish and Fish Products; Ed. 1, Public Health Division, Victorian Government Department of Human Services (2002).

- [36] - A. Torreggiani, M. Tamba, S. Bonora, G. Fini; Raman and IR Study on Copper Binding of Histamine; *Biopolymers (Biospectroscopy)*, Vol. 72, (2003) 290–298.
- [37] - I.M. Mandity, G. Paragi, F. Bogár, I.G. Csizmadia ; A conformational analysis of histamine, and its protonated or deprotonated forms: an ab initio study; *J. Molecular Structure (Theochem)* 666–667 (2003) 143–152.
- [38] - P. Malle and S.H. Tao; *Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation*, *J. Food protection*, 50 (9) (1987) 756-760.
- [39] - M. Saincliver; *L'industrie alimentaire halieutique: Des techniques ancestrales à leurs réalisations contemporaines*, *Sci. Agro., Rennes*, 2 (1985).
- [40] - T.A. McMeekin, J. Olley, T. Ross, D.A. Ratkowsky; A thermodynamic approach to bacterial growth (In: *Predictive Microbiology: Theory and Application*) Research Studies Press–Wiley, Taunton, New York, Chapter 10 (1993) 287–309.
- [41] - E.I. Lopez-Sabater, J.J. Rodriguez-Jerez, M. Hernandez-Herrero, M.T. Mora-Ventura; Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroidfish species from retail markets in Barcelona area; *Int. j. food microbiol.*, vol. 28 , N° 3 (1996) 411–418.
- [42] - S.L. Taylor, L.S. Guthertz, M. Leatherwood, E.R. Lieber; Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning; *Applied and Environmental Microbiol.*; Vol. 37, N° 2 (1979) 274-278.
- [43] - S-H. Kim, K.G. Field, D-S. Chang, C-I. Wei, H. AN; Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in Pacific mackerel during storage. *J. food prot.*, vol. 64 , N° 10 (2001) 1556–1564.
- [44] - M. Kanki, T. Yoda, M. Ishibashi, T. Tsukamoto; *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *International J. food microbial.*, Vol. 92, N° 1 (2004) 79-87.
- [45] - A. Bermejo, M.A. Mondaca, M. Roeckel, M.C. Marti; Growth and characterization of the histamine-forming bacteria of jack mackerel (*Trachurus symmetricus*). *J. food processing and preservation*, Vol. 26, N° 6 (2003) 401 - 414.
- [46] - S.S. Sumner, F. Roche, S.L. Taylor; Factors controlling histamine production in swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*; *J. Dairy science*, Vol. 73, N° 11 (1990) 3050-3058.
- [47] - H.A. Frank, D.H. Yoshinaga, and W.K. Nip; Histamine formation and honeycombing during decomposition of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) at elevated temperature; *Marine Fisheries Review*, Vol.43, N° 10 (1981) 9-14.
- [48] - M. Subburaj, I. Karunasagar, I. Karunasagar; Incidence of histidine decarboxylating bacteria in fish and market environs; *Food Microbiol.*, 1 (1984) 263–267.
- [49] - R.Hardy, J.G.M. Smith; The storage of mackerel (*Scomber scombrus*): Development of histamine and rancidity; *J. Sci. Food Agric.*, 27 (1976) 595–599.
- [50] - F. Ahmed; Scombroid (histamine) fish poisoning: *Seafood Safety*; Ed. National Academy Press; Chapter 4 (1991) 93-96.
- [51] - G.C. Fletcher, G. Summers, P.W.C. Van Veghel; Levels of histamine and histamine-producing bacteria in smoked fish from New Zealand markets; *J. Food Prot.*, Vol. 61, N° 8 (1998) 1064–1070.

- [52] - P. Lehtonen; Determination of amines and amino acids in wine: a review; *Am. J. enol. vitic.*, vol. 47 , N° 2 , (1996) 127–133.
- [53] - N. Jimenez-Moreno, C. Ancin-Azpilicueta; Influence of wine turbidity on the accumulation of biogenic amines during aging; *J. sci. food agric.*, vol. 84 , N° 12 (2004) 1571–1576.
- [54] - H.J. Nielsen, L. Edvardsen, K. Vangsgaard, E. Dybkjaer, P.S. Skov; Time-dependent histamine release from stored human blood products; *Br. J. surg.*, vol. 83 , N° 2 (1996) 259–262.
- [55] - J.H. Weil; *Biochimie Générale*, 5^{ème} Ed., Masson Paris, (1987) pp.386.
- [56] - F.R. Antoine, C.I. Wei, R.C. Littell, B.P. Quinn, A.D. Hogle, M.R. Marshall; Free amino acids in dark- and white-muscle fish as determined by O-phthaldialdehyde pre-column derivatization ; *J. food sci.*, vol. 66, N° 1 (2001) 72–77.
- [57] - G.C. Rollan, E. Coton, and A. Lonvaud-Funel; histidine decarboxylase activity of *Leuconostoc oenos* 9204; *Food Microbiol.*, 12 (1995) 455-461.
- [58] - E. Bolygo, P.A. Cooper, K.M. Jessop, F. Moffatt; *J. AOAC international*; Vol. 83, N° 3 (2000) 543-548.
- [59] - M. Arlorio, J.D. Coisson, A. Martelli; *Italian j. science*, Vol. 11, N° 4 (1999) 355-360.
- [60] - S. Kôse, P. Quantick, G. Hall; Changes in the levels of histamine during processing and storage of fish meal; *Anim. feed sci. technol.*, vol. 107, N° 1-4 (2003) 161–172.
- [61] - A. Minniti, G. Micali, F. Lanuzza, A. Panebianco; *Italian J. food science*, Vol. 7, N° 3 (1995) 305-309.
- [62] - Lonvaud-Funel A., Joyeux A.; *J. Appl. Bacteriol.*, 77 (1994) 401-407.
- [63] - M.J. Periago, J. Rodrigo, G. Ros, J.J. Rodriguez-Jerez, M. Hernandez-Herrero; Monitoring volatile and nonvolatile amines in dried and salted roes of tuna (*Thunnus thynnus* L.) during manufacture and storage; *J. food prot.*; Vol. 66, N° 2 (2003) 335-340.
- [64] - S. Chytiri, E. Paleologos, I. Savvaidis, M.G. Kontominas; Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwater rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored on ice; *J. food prot.*, vol. 67 , N° 5 (2004) 960–965.
- [65] - G.I. Kanny, A. Moneret-Vautrind (dir.), G. Grignon (dir.); Thèse Université de Nancy 1, 1 (1996).
- [66] - <http://www.inspection.gc.ca/> (agence canadienne d'inspection des aliments).
- [67] - D.K. Cavanah, T.B. Casale; Histamine. In: Kaliner, M.A., Metcalfe, D.D. (Eds.); *The Mast Cell in Health and Disease*; Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, Chapter 11 (1993) 321–342.
- [68] - Min-Chu, Z.L. Huang, W.M. Qu, N. Eguchi, M.H. Yao, Y. Urade; Extracellular histamine level in the frontal cortex is positively correlated with the amount of wakefulness in rats; *Neuroscience Research*, Vol. 49, N° 4 (2004) 417-420.
- [69] - V. Ramesh, M.M. Thakkar, R.E. Strecker, R. Basheer, R.W. Mc Carley; Wakefulness-inducing effects of histamine in the basal forebrain freely moving rats; *Behavioural brain research*, Vol. 152, N° 2 (2004) 271-278.

- [70] - K. Furitani, T. Aihara, E. Nakamura, S. Tanaka, A. Ichikawa, H. Ohtsu, Okabe; Crucial role of histamine for regulation of gastric acid secretion ascertained by histidine decarboxylase-knockout mice; *J. pharmacology and experimental therapeutics*, Vol. 307, N° 1 (2003) 331-338.
- [71] - C.R. Hung, P.S. Wang; Role of histamine and acid back-diffusion in modulation of gastric microvascular permeability and hemorrhagic ulcers in *Salmonella typhimurium*-infected rats; *Life Sciences*, Vol. 74, N° 16 (2004) 2023-2036.
- [72] - S. Jolly, N.E. Robinson, D.J. Desmecht; Effect of histamine on lung contractile elements in growing cattle; *American J. Veterinary Research*, Vol. 64, N° 7 (2003) 819-822.
- [73] - U. Pietrini, M. De Luca, E. Del Bene, F. De Cesaris, L. Bertinotti, N. Colangelo, A. Pignone; Prophylactic activity of increasing doses of intravenous histamine series of refractory migraine: Retrospective observations of a series of patients with migraine without aura; *Current therapeutic research*, Vol. 65, N° 1 (2004) 70-78.
- [74] - J.A. Choich, A. El-Nabawi, and E.K. Silbergeld ; Evidence of histamine receptors in fish brain using an in vivo [¹⁴C]2-deoxyglucose autoradiographic method and an in vitro receptor-binding autoradiographic method; *Environmental Research*, 94 (2004) 86-93.
- [75] - H. Ducrot, G. Maillard, N. Brion, M. Plotkine, J.C. Trinchet, M. Sionneau, J. Cao, O. Picard, F. Saur, A. Rousseau; Banque d'Informations Automatisées sur les Médicaments (B.I.A.M.) cri.ensmp.fr/biam/www/Sub3695.html (2000).
- [76] - Van Gelderen, Savelkoul, Van Ginkel, Van Dokkum; The effects of histamine administered in fish samples to healthy volunteers; *J. Toxicol.: Clin. Toxicol.*, **30** (4) (1992) 585-596.
- [77] - S.L. Taylor, J.E. Stratton, J.A. Nordlee; *J. Toxicol.*, **27** (1989) 225.
- [78] - C.A.B. Clemetson; Elevated blood histamine caused by vaccinations and vitamin may mimic the shaken baby syndrome; *Medical Hypotheses*, Vol. 62, N° 4 (2004) 533-536.
- [79] - M. Previati, A. Raspadori, L. Bertolaso, A. Parmeggiani, D. Bindini, C. Vitali, I. Lanzoni, E. Corbacella, M. Saviano, F. Fagioli, G. Blo, S. Capitani; Determination of histamine in the whole blood of colon cancer patients; *J. chromatogr., B, Biomedical sciences and applications*, Vol. 780, N° 2 (2002) 331-339.
- [80] - Wahlqvist, C. Rayner, M. Wooten, J. Silalahi, and R. Wills; Amine levels in some Asian seafood products; *J. Sci. Food Agric.* (1989) 503-506.
- [81] - K. Ekici, R. Sekeroglu, Y.C. Sancak, T. Noyan; A note on histamine levels in Turkish style fermented sausages; *Meat Science*, Vol. 68, N° 1 (2004) 123-125.
- [82] - J.Y. Hui, S.L. Taylor; Inhibition of in vivo histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine N-methyl transferase, and mono-amine oxidase; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **8** (1985) 241-249.
- [83] - B.A. Bartholomew, P.R. Berry, J.C. Rodhouse, R.J. Gilbert; Scombrototoxic fish poisoning in Britain: Features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986; *Epidemiol. Infect.* **99** (1987) 775-782.
- [84] - J. Llenas, I. Cardelus, A. Heredia, F. De Mora, R.W. Gristwood; Cardiotoxicity of histamine and the possible role of histamine in the arrhythmogenesis produced by certain antihistamines; *Drug safety*, Vol. 21 (1999) 33-38.

- [85] - R. Eitenmiller, J. Orr, and W. Wallis; Histamine formation in fish: Microbiological and biochemical conditions in "Chemistry and Biochemistry of Marine food products," AVI- Connecticut- Ed. R. Martin, (1980) 39-50.
- [86] - P.L. Rogers, W. Staruszkiewicz; Histamine test kit comparison; J. Aquatic Food Product Technology; Vol. 9, N° 2 (2000) 5-17.
- [87] - J.E. Stratton, R.W. Hutkins, S.L. Taylor; Biogenic amines in cheese and other fermented foods; A review. J. Food Prot., 54 (1991) 460–470.
- [88] - <http://www.gov.mb.ca/agriculture/homeec/cbe05s01.fr.html>
(La manipulation des aliments à la maison)
- [89] - E. Kownatzki, G. Grüniger, N. Fuhr; Interference with the fluorometric histamine assay by biogenic and amino acids; Pharmacology 34 (1987) 17-24.
- [90] - O.H. Wilhelms; An improved automated fluorometric method for determination of histamine; J. Immunological methods, 36 (1980) 221-226.
- [91] - P.A. Shore; Fluorometric assay of histamine; Amine assays 259 (1968) 842-845.
- [92] - J.R. Benson, and P.E. Hare; o-Phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range, Comparison with fluorescamine and ninhydrin; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 72, N° 2 (1975) 619-622.
- [93] - S. Stein, P. Böhlen, and Udenfriend S.; Studies on cinetics of reaction and hydrolysis of fluorescamine; Archives of Biochemistry, N° 163 (1974) 400-403.
- [94] - A. Csampai, D. Kutlan, F. Toth, I. Molnar-Perl; o-Phthaldialdehyde derivatization of histidine: stoichiometry, stability and reaction mechanism; J. chromatogr., Vol. 1031, N° 1-2 (2004) 67-78.
- [95] - M. Simoes, M.O. Pereira, M.J. Vieira; Effect of different concentrations of ortho-phthalaldehyde on biofilms formed by Pseudomonas fluorescens under different flow conditions; Biofouling, Vol. 19, N° 5 (2003) 287-292.
- [96] - S.E. Walsh, J.Y. Maillard, A.D. Russel; Ortho-phthalaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection; J. applied microbial., Vol. 86, N° 6 (1999) 1039-1046.
- [97] - S.E. Walsh, J.Y. Maillard, C. Simons, A.D. Russell; Studies on the mechanisms of the antibacterial action of ortho-phthalaldehyde; J. appl. microbiol., vol. 87, N° 5 (1999) 702–710.
- [98] - H.A. De Abreu, W.B. De Almeida, H.A. Duarte; pKa calculation of poliprotic acid: histamine; Chemical Physics Letters, Vol. 383, N° 1-2 (2004) 47-52.
- [99] - Y. Sekigushi, H. Makita, A. Yamamura, K. Matsumoto; A thermostable histamine oxidase from Arthrobacter crystallopoietes KAIT-B-007; J. Bioscience and Bioengineering, Vol. 97, N° 2 (2004) 104-110.
- [100]- P.M. Drozdowski, E. Kordon, S. Roszak; Studies of metal isotope and spectra of palladium (II) complex with histamine; Int. J. Quantum Chemistry, Vol. 96, N° 4 (2004) 355-364.
- [101]- E.Y. Bivian-Castro, F. Cervantes-Lee, G. Mendoza-Diaz; Synthesis, characterization and crystal structure of copper (II) ternary complex with cinoxacin and histamine; Inorganica Chimica Acta, Vol. 357, N° 2 (2004) 349-353.

- [102]- C. Bruce, W.H. Taylor; Radio-enzymatic determination of histamine: interference by fluoride and possible activation of histamine methyl transferase; *Clinica Chimica Acta*, Vol. 276, N° 2 (1998) 157-162.
- [103]- <http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt27.html> [Scombrototoxin \(Histamine\) Formation](#) : commercial test products for histamine.
- [104]- B-S. Hwang, J-T. Wang, Y-M. Choong; A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products; *Food Chemistry*, Vol. 82, N° 2 (2003) 329-334.
- [105]- E.I. Lopez-Sabater, J.J. Rodriguez-Jerez, A.X. Roig-Sagues, M.A.T. Mora-Ventura; *J. Food Prot.*, 57 (1994) 318.
- [106]- Y-H. Cho, H-S. Yoo, J-K. Min, E-Y. Lee, S-P. Hong, Y-B. Chung, Y-M. Lee; Comparative study of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and o-phthalaldehyde fluorogenic reagents for chromatographic detection of sphingoid bases; *J. chromatogr.*, Vol. 977, N° 1 (2002) 69-76.
- [107]- K. Takagi, S. Shikata; Flow injection determination of histamine with a histamine dehydrogenase-based electrode; *Analytica Chimica Acta*, Vol. 505, N° 2 (2004) 189-193.
- [108]- L.Y. Zhang, M.X. Sun; Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection; *J. Chromatogr.*, Vol. 1040, N° 1 (2004) 133-140.
- [109]- F. Rouessac ; *Analyse chimique : Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes* ; Ed. Masson Paris, (1992).
- [110]- S.E.Douabalé, M.Dione, C A.oly, A.Tine; Contributions to the determination of histamine rate by measuring out the histamine-orthophthalaldehyde complex in the absorption and fluorescence; *Talanta*, 60 (2003) 581-590.
- [111]- <http://www2.univ-reunion.fr/~dbbm/FTP/CYCLE2/TPUE1.pdf>