

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad DAHLAB -Blida 1



Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de biologie et physiologie cellulaire

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Master

en Biologie

Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire

Thème

**Etude microbiologique et biochimique de
l'altération de la sardine « *sardina pilchardus* »
dans la baie de Bouismail**

Soutenu le 02 /07/2016

Réalisé par :

DAOUAR FAIZA

&

TAKI KHAOULA

Présenté Devant le Jury :

Mme BOULKOUR S.	MCB	USD-Blida1	Présidente
Mme HAMZI	MAB	USD-Blida1	Examinatrice
Mme KADRI F.	MAA	USD-Blida1	Promotrice
Mr MEKNACHI A.	A.R	CNDRPA	Co-promoteur

Année universitaire 2015-2016

Remerciements

Tout d'abord nous devons remercier Dieu qui nous a donné la santé et la volonté durant la réalisation de ce présent mémoire.

Nous adressons de chaleureux remerciements à Mme KADRI F. pour son encadrement, ses conseils particulièrement précieux, ses remarques percutantes, Sa gentillesse, sa patience. Ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Nous tenons à remercier vivement Mr MEKNACHIA . Pour sa contribution considérable dans ce travail, pour notre encadrement au laboratoire et pour toutes les facilités ayant permis la réalisation de cette étude.

Nous exprimons notre gratitude à l'ensemble des membres de jury :

Mm BOULKOUR maitre de conférences B à la Faculté des Science de la Nature et de la Vie, université Saad DAHLAB - Blida 1 qui nous a honorés par sa présence et d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.

Nous remercions vivement Mme HAMZI maitre assistante B à la Faculté des Science de la Nature et de la Vie, université Saad DAHLAB - Blida 1 pour sa gentillesse d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit le jury de notre soutenance et d'être présente parmi le jury.

Vos remarques mes dames et critiques nous serviront surement dans l'enrichissement du fruit de notre travail.

Nous tenons à exprimer nos sincère remerciement et notre profond respect à :

Mr ANANE RACHID et Mr DJILALI MOSTAPHA et pour nous avoir accueillir au sein de leur organisme et nous avoir permet de réaliser notre travail.

*Un grand merci également à tout le personnel du **Centre National de la Recherche et Développement de la Pêche et L'aquaculture**, pour leur judicieux conseils et soutien ayant permis le bon déroulement de notre expérimentation.*

Enfin à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail puissent trouver ici toute notre reconnaissance.



Dédicace



*Je dédie ce travail et cet événement marquant de
ma vie*

*A mes parents, qu'ils trouvent ici
toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de
mes études.*

*A la mémoire de ma chère mère qui a béni mon désir d'apprendre et
m'a toujours encouragé, avec tout mon amour et ma reconnaissance
pour être devenue ce qui je suis.*

*A mon très cher père que j'aime très fort qui m'a tout appris, pour
toutes les peines et les sacrifices qu'il s'est donné pour me voir réussir
dans la vie.*

*A mes très chers frères et sœurs et leur mari
qui ont contribué à ma réussite
qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde tendresse*

*A mes nièces
à qui je souhaite beaucoup de bonheur et que de réussite dans leur vie*

A toute ma famille paternelle et maternelle

A toutes mes amies

*A ceux qui ont contribué de près ou de loin à
L'élaboration de ce modeste travail.*

*Et enfin A tous les collègues de la promotion de 2^{ème} année master de
Microbiologie et Toxicologie Alimentaire*

Faiza



Dédicace



Avec tout respect et amour Je dédie ce travail

*A mes chers parents pour leur confiance, sacrifices et
soutient moral*

*A mon frère et ma sœur ainsi qu'à son mari pour leur
encouragement*

*A tous mes amis ainsi mes collègues en zeme année master
microbiologie et toxicologie alimentaire*

Aussi bien

*« A tous ceux qui sont chères, proche de mon cœur et tous
ceux qui m'aiment et qui aurait voulu partager ma joie»*

khaoula

Résumé

L'objectif de ce travail est le suivi de la qualité de la sardine (*Sardina pilchardus*) fraîche réceptionnée au port de Bouharoun et l'étude de l'effet des conservateurs : l'acide citrique et l'huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur le ralentissement de l'altération pendant 12 jours.

Les échantillons à l'état frais ont montré une bonne qualité physicochimique, organoleptique et microbiologique.

L'altération a été caractérisée par la détérioration de la qualité organoleptique de la chair et une augmentation de la teneur en histamine entre 0 et $56,6 \pm 0,63$ jusqu'à $65,15 \pm 4,67$, accompagnée de l'apparition de la flore aérobie mésophile. L'activité de la protéase est plus au moins stable, l'altération protéolytique n'a pas été confirmée vu la stabilité des teneurs en protéines. Par ailleurs, les valeurs maximales de l'Azote basique volatil total enregistrées étaient de l'ordre de 21mg/100g au 12^{ème} jour mais elles restent cependant, en dessous des limites de rejet. De plus, l'existence d'un stress oxydant au niveau de la sardine au 3^{ème} jour qui pourrait être lié à une altération causée par la lipolyse et la neutralisation des radicaux libres.

L'utilisation de l'extrait de romarin comme conservateur de la chair de sardine à 4°C a donné un meilleur résultat par rapport à la stabilité de la teneur en protéine et l'effet ralentisseur de l'oxydation exprimé par la diminution de 30% de l'activité de la catalase. L'acide citrique semble avoir un effet inhibiteur sur les protéases et catalase.

L'utilisation de l'huile essentielle du romarin comme un bioconservateur de produits de mer, et la sardine en particulier, est recommandée.

Mots-clés : *Sardina pilchardus*, altération, histamine, ABVT, extrait de romarin, acide citrique.

Abstract

This work deals to follow up the quality of fresh sardine (*Sardina pilchardus*) from the port of Bouharoun and to study the effect of preservatives: citric acid and essential oil rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on slowing alteration during a storage period of 12 days at 4 ° C.

All fresh samples showed good quality according to physicochemical, organoleptic and microbiological norms. The alteration is characterized by the deterioration of the organoleptic quality of the flesh and increased histamine content between 0 and 56.6 ± 4.67 to $65,15, \pm 0,63$ coupled by the appearance of mesophilic aerobic flora. The protease activity is more or less stable. The proteolytic alteration was not confirmed because of the stability of protein contents. Furthermore, the maximum level of total volatile basic nitrogen recorded 21mg/100g level in 12th day of storage that still under discharge limit values. In addition, an oxidative stress was recorded in the flesh at the 3rd day, this could be related to an alteration caused by lipolysis and neutralizing of free radicals.

The use of rosemary extract as a preservative of the flesh of sardines at 4 ° C gave a better result compared to the stability of the protein and the oxidation retardant effect expressed by the decrease of 30 % of catalase activity. While, citric acid seems to have an inhibitory effects on both protease and catalase activities.

The use of the essential oil of rosemary as natural conservator in seafood products, and in particular sardine, is recommended.

Keywords: *Sardina pilchardus*, alteration, histamine, TVBN, microflora, rosemary extract, citric acid.

LISTE DES FIGURES

Figure 1	<i>Sardina pilchardus</i> (Walbaum, 1792).	04
Figure 2	Cycle de vie de la sardine (<i>Sardina pilchardus</i>), et influence de différents paramètres sur les étapes du cycle de vie.	06
Figure 3	Dégradation enzymatique des acides aminés en amines biogène par décarboxylation.	19
Figure 4	la répartition des échantillons selon le mode de conservation.	23
Figure 5	Plan adopté avec les différents démarches appliquées.	24
Figure 6	procédure de l'analyse biochimique.	26
Figure 7	Evolution de la teneur en eau en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	41
Figure 8	Evolution de la teneur en eau en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E4 traitée et non traitée par l'acide citrique.	41
Figure 9	Evolution du taux de pH en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	42
Figure 10	Evolution du taux de pH en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E4 traitée et non traitée par l'acide citrique.	43
Figure 11	Evolution de la teneur en matière minéral en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	44
Figure 12	Evolution de la teneur en matière minéral en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E4 traitée et non traitée par l'acide citrique.	44
Figure 13	Evolution de la teneur de la matière organique en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	45
Figure 14	Evolution de la teneur de la matière organique en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	45
Figure 15	Evolution de la teneur en protéines en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	46
Figure 16	Evolution de la teneur en protéines en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E54 traitée et non traitée par l'acide citrique.	46

Figure 17	Evolution de l'activité de la catalase en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	47
Figure 18	Evolution de l'activité de la catalase en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E4 traitée et non traitée par l'acide citrique.	48
Figure 19	Evolution de l'activité de protéase en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	49
Figure 20	Evolution de l'activité de protéase en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E4 traitée et non traitée par l'acide citrique.	50
Figure 21	Evolution de la teneur en ABVT en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	51
Figure 22	Evolution de la teneur en ABVT en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E4 traitée et non traitée par l'acide citrique.	52
Figure 23	Evolution de la teneur en histamine en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	53
Figure 24	Evolution de la teneur en ABVT en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E4 traitée et non traitée par l'acide citrique.	54
Figure 25	Evolution de la teneur en fer en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E5 traitée et non traitée par l'extrait de romarin.	54
Figure 26	Evolution de la teneur en fer en fonction de la durée de conservation à +4C° de la chair de la sardine <i>sardina pilchardus</i> E4 traitée et non traitée par l'acide citrique.	55

Liste des Abréviations

ABVT	Azote Basique Volatil Total
AG	Acide Gras
ANSES	Agence Nationale De Securite Sanitaire de L'alimentation, De L'environnement Et Du Travail
CAT	Catalase
CF	Coliformes Fécaux
CNRDPA	Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture
CT	Coliformes Totaux
DMA	Diméthylamine
E	Echantillon
FAMT	Flore Aérobie Mésophile Totale
FAO	Food and Agriculture Organization : l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation
IA	Indice d'altération
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
JORA	Journal officiel de la république algérienne
mi	masse initiale de l'échantillon
MM	Matière organique
MO	Matière minéral
mr	masse du résidu après calcination

MS	Matière sèche
NH3	L'ammoniac
NPP	Nombre plus probable
OGA	Gélose glucosée à l'oxytétracycline
OMS	Organisation mondiale de la santé
OTMA	Oxyde de triméthylamine
P/V	Poids/Volume
PCA	Plate Count Agar
S/C	Simple concentration
S9	Surnageant
SAB	Sérum Albumine Bovine
TMA	Triméthylamine
TSE	Tryptone Sel Eau
U ou UI	Unité internationale : unité de l'activité enzymatique ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
UFC	Unité Formant Colonies

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	composition et valeur nutritionnelle de la sardine de l'atlantique en conserve dans l'eau, égouttée avec arêtes (Santé Canada, 2005).	10
Tableau 2	Types et signes d'altération sensorielle de la chair du poisson (la sardine)	14
Tableau 3	Microflore produisant de l'histamine (Boulay, 1999)	19
Tableau 4	Cotation des caractères observés de la sardine arrivée au laboratoire selon la norme N° 103/76/CEE.	34
Tableau 5	résultats des analyses physico-chimiques de la sardine à l'état frais en fonction des lots réceptionnés au laboratoire.	34
Tableau 6	résultats du contrôle bactériologique de la sardine fraîche provenant du port de Bouharoun.	35
Tableau 7	Valeurs moyennes des teneurs de catalase, protéase et en protéines dans la chair des lots de sardine fraîche réceptionnés au laboratoire.	36
Tableau 8	résultats du contrôle toxicologiques de la chair de sardine fraîche réceptionnés au laboratoire.	37
Tableau 9	résultats de la lyse bactérienne dans les différents échantillons en fonction du temps de conservation sur milieu Gélose-Gélatine	55

Sommaire

Introduction I	1
Chapitre I Synthèse Bibliographique	3
I.GENERALITE SUR L'ESPECE	
I.1. Poissons pélagiques	3
.1. Présentation de la sardine.....	3
I.1.1.Position systématique	3
I.1.2.Distribution & Habitat.....	4
I.2.Biologie de la sardine	4
I.2.1.morphologie	5
.2.2. Cycle de vie	5
.2.3.Croissance	6
.2.4. Reproduction	6
I.2.5. Nutrition et digestion	7
I.2.6. Respiration	7
I.2.7.Comportement de la sardine.....	7
I.3. La pêche de la sardine.....	8
I.3.1. la consommation de poissons en Algérie	8
I.3.2. Caractéristiques de la chair des produits de la pêche.....	9
II.QUALITE DES PRODUITS DE LA MER	
1. méthodes d'évaluation de la qualité.....	10
1.1. Les méthodes organoleptiques et sensorielles.....	11
1.2. Les méthodes chimiques et biochimiques.....	11
1.3. Les méthodes microbiologiques.....	11
2. Altération de la chair	12
2.1. Phases d'altération.....	12
2.2. Types d'altération.....	12
2.2.1. Altérations autolytiques (enzymatiques)	12
2.2.2. Altérations microbiennes.....	13
2.2.3. Altérations chimiques (oxydation).....	13
2.2.4. Altérations sensorielles.....	14
2.3. Niveaux et sources de contamination microbienne.....	15
2.4. Les indicateurs microbiens.....	15
2.4.1. <i>Salmonella spp</i>	15
2.4.2. <i>Escherichia coli</i>	15
2.4. 3. <i>Shigella sp</i>	16
2.4.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.4.5. <i>Clostridium botulinum</i>	16
2.4.6. <i>Vibrio sp</i>	17
2.4.7. <i>Listeria monocytogenes</i>	17
2.4.8. <i>Flore mésophile aérobie totale</i>	17
3.Amines biogènes et l'histamine.....	17
3.1. Caractéristiques physicochimiques de l'histamine	18
3.2. Facteurs de production d'Histamine.....	18

3.3. Bactéries Histaminogènes	19
3.4. Intoxication histaminique	20
3.5. Réglementation	20
3.6. Utilisation des amines biogènes comme indicateurs d'altération.....	21
3.7. Précaution	21

Chapitre II MATERIEL ET METHODES

II.1. Période et Lieu de stage	22
II.2. Matériel.....	22
II.3. Echantillonnage et conditionnement	22
II.3. Méthodologie	23
II.4. Méthodes.....	24
II.4.1. Appréciation sensorielle	24
II.4.2. Analyse physicochimiques.....	25
II.4.2.1. Teneur en eau	25
II.4.2.2. Matière minérale et organique.....	25
II.4.2.3. Détermination du Ph.	25
II.5. Analyses Biochimiques	26
II.5.1. Dosages des protéines par la méthode de Lowry.....	27
II.5.2. Dosages de la protéase	27
II.5.3. Dosage de la Catalase par mode Cinétique	27
II.6. Analyses Toxicologiques	28
II.6.1. Teneur en azote basique volatil total (ABVT).....	28
II.6.2. Détermination de la teneur en histamine	28
II.6.3. Mesure du taux de fer	29
II.7. Analyses bactériologiques.....	29
II.7.1. Echantillonnage.....	29
II.7.2. Traitement des échantillons.....	29
II.7.3. Préparation de la solution mère.....	29
II.7.4. Numération de la flore aérobie mésophile totale.....	30
II.7.5. Numération des coliformes totaux, des coliformes fécaux et thermotolérants.....	30
II.7.6. Numération de levures et moisissure.....	31
II.7.7. Numération des Streptocoques fécaux ou thermotolérants	31
II.7.8. Numération des clostridium sulfito-réducteurs	32
II.7.9. Recherche des salmonelles.....	32
II.7.10. Recherche de l'activité gélatinolytique	33

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Qualité de la sardine fraîche	34
III.1.1. Qualité Sensorielle et Organoleptique	34
III.1.2. Résultats des paramètres physico-chimiques	34
III.1.3. Qualité Microbiologique.....	35
III.1.4. Résultats des analyses Biochimiques	36
III.1.5. Résultats des analyses toxicologiques	37
III. 2. Résultats de Test de conservation.....	39
III.2.1. Qualité Sensorielle et Organoleptique.....	39
III.2.2. Analyses Physico-chimiques	40
III.2.3. Paramètres d'altération et effet de conservateur	45
III.2.3.1. Analyses Biochimiques	46
III.2.4. Analyses Toxicologiques.....	50
III.2.5. Analyses Bactériologiques.....	55
Conclusion.	57
Référence Bibliographique	59

INTRODUCTION

Depuis toujours l'homme consomme des produits de la pêche. Les produits de la mer sont des denrées très vulnérables à l'action d'oxydation lipidique et à l'altération autolytique (enzymatique et microbienne), La qualité des produits de la pêche est définie par une série de caractéristiques impliquant leur composition initiale, leur valeur nutritionnelle, les conditions de capture, de stockage, de distribution et de commercialisation (Aguilar & Martinez, 2001).

Les premiers changements survenant *post mortem* dans le poisson sont dus aux enzymes tissulaires et digestives et à l'oxydation des lipides, c'est ensuite le développement bactérien qui est le responsable essentiel de la dégradation du poisson. L'altération met en jeu un ensemble de processus microbiologiques, chimiques et physiques. (Leduc, 2011).

Le poisson représente non seulement un produit de grand valeur socio-économique mais aussi un aliment de haute valeur nutritionnelle vue sa richesse exceptionnelle en éléments nutritifs essentiels (protéines, lipides, vitamines liposolubles, éléments minéraux, ...etc.), de plus il est particulièrement apprécié pour sa haute teneur en acide gras polyinsaturés (Ackman, 1989) dont les effets bénéfiques sur la santé humaine. Cependant, cette grande qualité représente aussi l'un des principaux problèmes surtout lorsqu'on ne respecte pas les conditions de conservation.

La sardine *Sardina pilchardus*, reste l'un des rares produits de la mer encore accessible au consommateur algérien. Elle est inscrite dans la culture culinaire algérienne et est recommandée par plusieurs institutions internationales de la santé pour ses vertus nutritionnelles (AFSSA, 2003).

La qualité et la sécurité des produits de la pêche et de l'aquaculture sont des éléments cruciaux tout au long de la chaîne, depuis la production primaire jusqu'à l'utilisateur final. La difficulté de conservation des denrées alimentaires périssables et plus particulièrement les produits de la pêche et de l'aquaculture, est un véritable frein au développement de leur consommation (Kodo, 1990).

L'amélioration de la qualité des produits de la pêche et de l'aquaculture est devenue une préoccupation majeure des pouvoirs publics et de tous les acteurs opérant dans ce domaine.

En industrie alimentaire, le consommateur cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure. Afin de limiter ces altérations, on a recours à la conservation par le froid +4°C ou à l'utilisation de divers conservateurs de synthèse. En outre, les extraits végétaux sont utilisés pour réduire la prolifération des microorganismes (Lachowicz *et al.* 1998).

La microflore responsable de la dégradation du poisson frais change avec les variations de température de conservation. A basse température (de 0 et 5°C), on retrouve *photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas spp*, *Pseudomonas spp*. Aux températures plus élevées on rencontre les Enterobacteriaceae et Vibrionaceae, parfois avec des risques de formation des amine biogènes (Hellal, 2011).

La formation des amines biogènes dans les aliments par la décarboxylation microbienne des acides aminés peut engendrer des réactions allergiques chez le consommateur. L’histamine provient essentiellement de la décarboxylation de l’histidine par des enzymes microbiennes. Elle est produite plus particulièrement dans les muscles des poissons qui contiennent des taux d’histidine naturellement élevés, notamment les scombridés et certains clupéidés. L’histamine fait partie des amines biogènes, définies comme des molécules biologiquement actives sur le système nerveux central et le système vasculaire.

L’origan, le thym, la sauge, le romarin, les clous de girofle sont des plantes aromatiques fréquemment utilisées comme ingrédients alimentaires. Les huiles et extraits de ces plantes ont toutes une particularité commune : elles sont riches en composés phénoliques comme l’eugénol, le thymol, et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne et antioxydante. Le carvacrol est reconnu comme étant l’un des composés non toxiques le plus actif de tous. Il est utilisé comme agent de conservation et aussi comme arôme alimentaire (Zambonelli., 2004).

Comme les produits de la pêche contaminés ou altérés sont à l’origine de différentes maladies d’intoxication alimentaire nous nous sommes intéressés dans notre travail à suivre l’évolution de l’altération dans son aspect microbiologique et biochimique de la sardine (*Sardina pilchardus*) capturée dans de la baie de Bouismail.

Notre travail se présente en deux parties, une première partie concernant la synthèse bibliographique et une deuxième partie comprenant le travail expérimental, matériel et méthode et résultats et discussion. Qui porte sur :

- échantillonnage d’une sardine fraîche capturée au niveau de la baie de Bouismail (port de Bouharoun)
- évaluation de sa qualité physicochimique et organoleptique.
- Conservation de la sardine dans différentes conditions : sans conservateur, en ajoutant un conservateur chimique, l’acide citrique ou un bioconservateur, l’hydrolat du romarin (*Rosmarinus officinalis*)
- évaluation des paramètres d’altération au cours de conservation à 4C° pendant 12 jours :
 - ✓ Microbiologiques : entérobactéries, une microflore psychrophile et mésophile.
 - ✓ Biochimique et enzymatique : protéase, protéine et catalase
 - ✓ Physicochimiques : Ph, matière minérale, matière organique et la teneur en eau.
 - ✓ Toxicologique : la teneur en azote basique volatil total, l’histamine et le fer huminique.
- Etude de l’effet des conservateurs : acide citrique et l’huile essentielle de romarin sur le ralentissement de l’altération évalué pour les mêmes paramètres.

GENERALITE SUR L'ESPECE

1. Poissons pélagiques

La sardine *Sardina pilchardus* appartient à un groupe taxonomique complexe qui regroupe les poissons pélagiques marins et dulçaquicoles. Un poisson est appelé pélagique lorsqu'il vit dans les eaux proches de la surface ou entre la surface et le fond. Le hareng, les sprats, la sardine, l'anchois, le maquereau, les aloses, le thon et la sardinelle sont des poissons pélagiques (Lavoué et *al.* 2007).

La sardine (*Sardina pilchardus*) peut se distinguer des jeunes aloses (genre *Alosa*, est un poisson migrateur de la famille des Clupeidae) par l'absence d'une fente médiane à la mâchoire supérieure et par la position de l'extrémité postérieure de la bouche. Chez la sardine, cette dernière est située en avant de la verticale qui passe par le centre de l'oeil. Les deux espèces de sardinella, *Sardinella aurita* et *Sardinella maderensis*, diffèrent de *Sardina pilchardus* par l'absence de stries rayonnantes sur l'opercule et des points sombres sur les côtés du corps (Lavoué et *al.* 2007).

.1. Présentation de la sardine

Le genre *Sardina* ne comprend qu'une espèce, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) in (Lavoué et *al.* 2007).

I.1.1.Position systématique

La classification de la sardine selon Walbaum (1792) est la suivante :

Embranchement : Vertébrés
Sous-embranchement: Gnathostomes
Super –classe: Poissons
Classe : Ostéichtyens
Sous-classe: Actinoptérygiens
Super-ordre : Téléostéens
Ordre : Clupéiformes
Sous-ordre : Clupéoidés
Famille : Clupéidés
Genre : *Sardina*
Espèce : *Sardina pilchardus*

Les noms vernaculaires (Walbaum, 1792):

- ✓ Anglais : European pilchard,
- ✓ Français : Sardine commune,
- ✓ Espagne : Sardina,
- ✓ Algérie : Sardine.



Figure(1) : *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792).

I.1.2. Distribution & Habitat

La sardine est une espèce pélagique côtière, allant jusqu'à 200 m de profondeur mais présente surtout entre 25 à 55 m de la colonne d'eau pendant le jour et entre 15 à 35 m pendant la nuit. Elle est rencontrée le long des côtes atlantiques et méditerranéennes d'Europe et d'Afrique. En Méditerranée, elle est très commune dans le bassin occidental. Dans l'océan Atlantique, la sardine se répartit depuis Dogger Banc en mer du Nord jusqu'aux côtes Mauritanienes et peut même atteindre les eaux du Sénégal (Fréon et Stequert, 1978). La sardine se rencontre également dans les archipels des Açores, de Madère et des Canaries (Furnestin, 1952 ; Silva, 2003).

Elle vit sur le plateau continental à une profondeur maximale de 150 m et sa présence est souvent associée à celle de l'anchois, *Engraulis encrasicolus* (Abad *et al.*, 1998).

I.2. Biologie de la sardine :

La sardine présente un cycle de vie qui se caractérise essentiellement par une croissance rapide, une durée de vie courte, une taille petite, une maturation rapide associée à une grande fécondité et une mortalité élevée surtout en phase larvaire (Rochet, 2000 ; Rose *et al.*, 2001).

La sardine vit en bancs parfois importants, près de la surface, la nuit et plus en profondeur le jour. Elle fraie toute l'année avec une période de ponte variant en fonction de la répartition géographique (Dumay, 2006).

I.2.1.morphologie

La sardine se caractérise par une mâchoire légèrement saillante. Opercules portant des cannelures radiaires. La Nageoire dorsale est située en avant des pelviennes. L'anale est caractérisée par un allongement au niveau des deux derniers rayons. Les flancs sont dorés et le ventre argenté. Une rangée de taches sombres se trouve le long de chaque flanc (Walbaum, 1792).

.2.2. Cycle de vie

Selon Laurec et Legen (1981), L'identification et la définition des unités de stocks halieutiques sont une donnée importante dans l'aménagement des pêcheries. Elle nécessite une parfaite connaissance du cycle de vie du poisson avec entre autre, la caractérisation des sites de ponte, de la fécondité, de l'importance du recrutement (Intégration des nouveaux recrues à la population adulte, des migrations et de la mortalité naturelle.

En général, le cycle de vie d'un poisson peut être schématisé par deux phases, la phase larvaire et la phase adulte, reliées entre elles par deux phénomènes biologiques, le recrutement et la reproduction (Figure 2). L'abondance d'un stock est donc dépendante de ces phases, elles-mêmes sous l'influence des facteurs de la colonne d'eau (Boudry *et al.*, 2002). Par exemple, la reproduction est soumise à des conditions de température (Koutrakis *et al.*, 2004), la dispersion larvaire à des conditions hydrologiques particulières (Alvarez *et al.*, 2001 ; Siegel *et al.*, 2003) et le recrutement est soumis, à la fois à des conditions hydrologiques (Chavez *et al.*, 2003), de température (Brochier *et al.*, 2008) ou encore de salinité (Chan *et al.*, 2001).

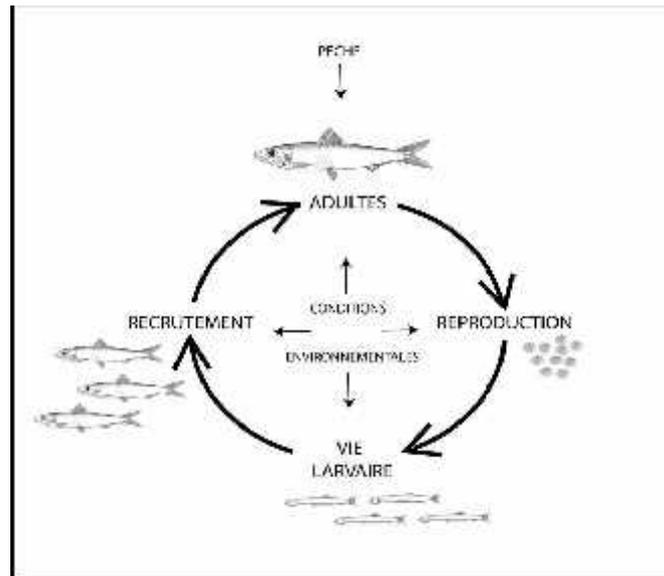


Figure (02) : Cycle de vie de la sardine (*Sardina pilchardus*), et influence de différents paramètres sur les étapes du cycle de vie (Boudry *et al*, 2002)

.2.3.Croissance

La sardine a une croissance rapide, notamment dans sa phase juvénile, mais qui connaît des différences en fonction de la période, la zone de ponte et du sexe (Forest, 2001). L'intensité de la croissance peut être rapide au printemps et ralentie ou même interrompue au cours de l'hiver (Lee, 1961). Leur longévité est faible, qui peut être inférieure à 10 ans (Claude et Jacques, 2005).

La taille de la sardine peut atteindre 27 cm dont 90 % est atteinte durant la première année de son cycle (Whitehead, 1985). Dans la région du Nord Ouest Africain, la taille de la sardine augmente du nord au sud (FAO, 2007), ceci est probablement en relation avec une richesse trophique du milieu et la température engendrée par l'upwelling auquel sont soumises ces côtes. La sardine atteint sa maturité sexuelle durant les deux premières années de sa vie. La croissance et la maturité sexuelle présentent de larges variations tout au long de l'aire de répartition (Alemany et Alvarez, 1993; FAO, 2001).

.2.4.Reproduction

La Ponte de la sardine est fortement corrélée aux facteurs environnementaux, comme la température et l'hydrodynamisme (Olivar *et al*, 2001), la température semble être un facteur essentiel dans le déclenchement de la Ponte soit par une stimulation des mécanismes physiologiques soit par un enrichissement trophique du milieu (Amenzoui *et al.*, 2005).

La femelle pond de 50 000 à 60 000 œufs pélagiques, mesurant environ 1.5 mm, dans la mer ou près des côtes, elle pond, de juin à août, tout au sud de la mer du Nord, en avril dans la Manche, de février à avril au Portugal, et de septembre à mai dans la Méditerranée.

Les œufs éclosent au bout de 2 à 4 jours, les larves mesurant 4 mm de longueur (Muus *et al.* 1998). La phase larvaire dure 60 jours (Ramirez *et al.*, 2001), les larves vivent entre 10 et 40 m de profondeur et se dispersent plus largement la nuit (Olivar *et al.*, 2001).

I.2.5.Nutrition et digestion

L'appareil digestif se compose de mâchoires qui sont subégales, dont les dents tapissent l'ensemble de la cavité buccale disposés en table de broyage, pharynx, oesophage, estomac et un duodénum (Darley, 1992).

La sardine est une espèce planctophage, la jeune sardine se nourrit de phytoplancton représenté par les diatomées (Fisher *et al.*,1987), d'œufs et de larves de petits crustacés (Ettahiri, 1996).

L'adulte consomme essentiellement des crustacés planctoniques, des larves de crabes ou d'ophiures (Ettahiri, 1996).

I.2.6.Respiration

La respiration se fait par un appareil respiratoire qui contient quatre paires de branchies operculées et qui sont complétées par la vessie gazeuse, qui joue le rôle de réserve d'oxygène (Dob, 1998). Lors de la respiration de la sardine, l'eau est aspirée dans la cavité buccale, tandis-que les opercules sont fermés, l'eau pénètre par la bouche jusqu'aux branchies, puis lorsque la bouche est refermée, elle sort par les opercules ouverts (Pivnicka et Cerny, 1996).

I.2.7.Comportement de la sardine

La sardine effectue des déplacements saisonniers de faible amplitude, commandés par la nutrition, la reproduction et les conditions thermiques (Fréon *et al.*,2005).

Il s'agit d'une espèce grégaire, elle forme des bancs parfois très importants qui peuvent être composés d'individus d'âge et de sexe différents mais de tailles équivalentes (Forest,2001), par contre si la sardine est moins importante, les bancs seront composés de plusieurs espèces de petits pélagiques, notamment des anchois et/ou des chinchards (Cury *et al.*, 2000).

Les poissons planctophages effectuent des migrations verticales entre la nuit et le jour, suivant exactement celles du plancton animal dont ils se nourrissent, en période de pleine lune cette migration est réduite par le risque d'exposition aux prédateurs qui peuvent profiter de la brillance des poissons facilement repérables à partir des couches d'eau inférieures (Fréon et *al.*,2005).

I.3. La pêche de la sardine

Les poissons pélagiques constituent la plus grande part des captures marines mondiales, En méditerranée, les petits pélagiques (sardines, anchois, maquereaux, sparts et sardinelles) totalisent presque 50 % des débarquements totaux annuels de pêche (Leonard et Maynou, 2003). Parmi eux, l'anchois et la sardine sont les espèces les plus importantes en termes d'intérêt commercial et de biomasse (Pinnegar et *al.*,2003; FAO, 2005).

Les deux principaux métiers qui exploitent la sardine sont les senneurs et chaluts pélagiques. La pêche de la sardine est une activité influencée par les conditions hydrologiques et climatiques, car la température agit directement sur la localisation et la concentration des bancs de sardines d'où l'accessibilité aux flottilles de pêche (Forest, 2001). L'exploration de ces données est importante et constitue une étape primordiale dans l'identification des stocks de poissons par des techniques avancées (Begge *et al.*, 1999). La sardine européenne, est une espèce très exploitée en nord ouest africain et en Atlantique Nord-Est présente, elle aussi, des fluctuations importantes des stocks (Cendrero, 2002; ICES, 2005; FAO, 2007).

I.3.1.la consommation de poissons en Algérie

Le Ministère de la pêche a commandité une étude de consommation de poissons par les ménages en Algérie dont l'étude aboutit que les ménages algériens ont une préférence de consommation pour le poisson frais. Ainsi, 93,8% de la consommation moyenne par tête sont constitués de poissons frais, 2,3% de congelés et 2,7% de conserves.

Ainsi que, Les espèces de poisson les plus consommés par les ménages, pour le poisson frais, sont la sardine (83,1%), le saurel (5,0%) et le rouget (1,6%). Les 10,3% restants se répartissent entre différentes espèces de poisson blanc et de poisson bleu. (MPRH ,2014).

I.3.2. Caractéristiques de la chair des produits de la pêche

La chair des poissons se différencie des autres animaux à la fois par l'organisation structurale des muscles qui la constituent et par sa composition chimique qui en fait un aliment de haute valeur nutritionnelle:

I.3.2.1. Structure physique

La chair des poissons est composée de deux principaux types de muscles qui se distinguent par la nature des fibres qui les composent majoritairement :

- **le muscle rouge, de type oxydatif** : il est généralement présent sous forme d'une fine couche située sous la peau; il est plus abondant sur les flancs du poisson. Sa proportion dans la chair varie d'une espèce à une autre.

- **le muscle blanc, de type glycolytique** : il est quantitativement le plus important puisqu'il représente jusqu'à 50% de la masse corporelle du poisson.

Les muscles sont constitués d'une mosaïque de fibres de différents diamètres qui résultent à la fois de phénomènes d'hyperplasie (augmentation du nombre de fibres) et d'hypertrophie (augmentation de la taille des fibres).

Le tissu conjonctif, composé principalement de collagène (88 à 98 % de collagène et de 2 à 12 % d'élastine) enveloppe chaque fibre (endomysium) ainsi que les faisceaux de fibres (perimysium). Il est aussi le constituant majoritaire des myoseptes, cloisons qui séparent les feuillettes musculaires (myomères) (Medale, 2005).

I.3.2.2. Composition chimique et valeur nutritionnelle

La chair des poissons contient en moyenne 70 à 80 % d'eau, 16 à 22 % de protéines, peu de glycogène (moins de 1% en général) et des lipides en quantité très variable (1 à 20 % selon les espèces et leur alimentation (Medale, 2005).

Malgré la très large variété taxonomique des poissons, la teneur en protéines des tissus musculaires est d'une constance remarquable (Piclet, 1987). Le muscle blanc contient davantage de protéines que le muscle rouge mais moins de lipides (Pérez-Villareal et Pozo, 1990; Medale, 2005).

La sardine est un poisson gras qui possède un grand intérêt nutritionnel (tableau1), En effet, c'est l'un des poissons les plus riches en lipides et particulièrement en acides gras de la famille des (n-3) qui représentent de 20 à 30% des acides gras totaux, dont les propriétés vasculo-protectrices sont maintenant bien établies. La sardine est également un des poissons

les plus riches en protéines (autour de 20% de la composition totale du filet). Ces protéines sont une bonne source d'acides aminés indispensables puisque 100 g de sardine suffisent à couvrir 100% des besoins quotidiens. La sardine est pauvre en glucides (0.1% par rapport au poids frais), et contient des vitamines, des sels minéraux et des oligo-éléments (Dumay, 2006).

Tableau 1 : composition et valeur nutritionnelle de la sardine de l'atlantique en conserve dans l'eau, égouttée avec arêtes (Santé Canada, 2005).

Composition	Poids en g /100g de sardine
Protéines	24,6
Glucides	0
Lipides	11,5
- Saturés	1,5
- mono insaturés	3,9
- Polyinsaturés	5,2
- oméga-3*	1,5
Cholestérol	0,142
Fibres alimentaires	0
Calories	208

* AEP, ADH et acide alpha-linolénique

II. QUALITE DES PRODUITS DE LA MER

La plupart du temps le mot "qualité" se réfère à l'aspect esthétique et à la fraîcheur ou au degré d'altération que le poisson a subi. Il peut aussi comprendre des aspects de sécurité tels que l'absence de bactéries et parasites pathogènes ou produits chimiques toxiques. La qualité englobe également des notions, telles que la sécurité, la nutrition, la pureté, la régularité des produits, la valeur ou l'excellence des produits, la loyauté (étiquetage par exemple) et la gastronomie (F.A.O ,2003).

En effet, La fraîcheur est l'indicateur de qualité des produits de la mer le plus important. De nombreuses méthodes existent pour l'évaluer. (Ifremer ,2009).

1. méthodes d'évaluation de la qualité

1.1. Les méthodes organoleptiques et sensorielles

Les méthodes organoleptiques et sensorielles reposent sur l'évaluation de critères d'aspect, d'odeur, de texture et de goût des produits. L'analyse sensorielle constitue un outil de mesure

immédiate, rapide et précis qui permet d'obtenir des informations pertinentes sur les aliments et des éléments pour comprendre le comportement des consommateurs.

1.2. Les méthodes chimiques et biochimiques

Les méthodes chimiques et biochimiques pour l'évaluation de la qualité des produits de la mer sont plus fiables et plus précises, depuis qu'ils éliminent les opinions personnelles sur la qualité des produits. Ces méthodes objectives doivent être en corrélation avec la qualité sensorielle, et les composés chimiques qui sont déterminés doivent augmenter ou diminuer comme la détérioration microbienne ou les procédés d'autolyse (Huss 1995). Parmi les composés chimiques d'altération à mesurer, on trouve les amines basiques volatiles totales (A.B.V.T.), les amines biogènes ou histamine et les produits d'oxydation de lipides de poisson tels que les hydroperoxydes (produits primaires) et les TBARS (sr-TBA : produits secondaires de l'oxydation lipidique) (substances réactives à l'acide thiobarbiturique). De plus, les méthodes biochimiques et chimiques permettent de remplacer les méthodes bactériologiques plus lentes (Huss, 1999).

1.3. Les méthodes microbiologiques

Le but des examens microbiologiques des produits de la pêche est d'évaluer la présence possible de bactéries ou d'organismes pouvant avoir des conséquences sur la santé publique et de donner une idée de la qualité hygiénique du poisson incluant la rupture de la chaîne du froid, l'hygiène au cours de la manutention et du traitement. Les données microbiologiques ne fournissent pas en général d'informations sur l'appétence ou la fraîcheur. Les examens bactériologiques traditionnels sont complexes, longs, coûteux et requièrent des compétences pour leur exécution et l'interprétation des résultats. (Leduc, 2011)

2. Altération de la chair

Les produits de la pêche sont particulièrement périssables. En effet, dès leur mort, les réactions d'autodestruction liées à l'activité des enzymes autolytiques libèrent dans la chair des molécules simples, constituant des substrats favorisant la propagation *in situ* des microorganismes. La conséquence en est une rapide altération des propriétés organoleptiques, une réduction de la valeur nutritive et la formation de composés toxiques. (Ifremer,1990)

2.1. Phases d'altération

Dès la mort du poisson la contraction *post-mortem* et la chute de pH reste modérées. Le pH du muscle du poisson est généralement insuffisant pour inhiber ou ralentir le développement bactérien. En plus d'une activité protéolytique susceptible d'amollir rapidement les tissus, des enzymes telles que les lipases et les phospholipases restent

remarquablement actives au froid et dégradent les lipides. Les modifications *post-mortem* des muscles se traduisent par une baisse de solubilité des protéines, une fragilisation des cellules, et la libération d'acides gras.

L'évolution du muscle après la mort peut être divisée en quatre phases (Chéret, 2005):

- **la phase pré-rigor** dite d'excitabilité musculaire et de contraction fibrillaire : Le changement le plus important chez le poisson en état *post mortem* est l'établissement de la *rigor mortis*. Immédiatement après la mort du poisson, le muscle est détendu et la texture de la chair est souple et élastique. Cette phase *pre rigor* ne dure que quelques heures.

- **la phase de rigidité cadavérique (rigor mortis)** : Ensuite, le muscle durcit et le corps du poisson se raidit. Ainsi le poisson est en état de rigidité cadavérique *rigor mortis* (perte des propriétés élastiques du muscle). Cette dernière s'installe à des temps différents selon les espèces et les conditions de conservation.

- **la phase post-rigor** dite de résolution de la rigidité cadavérique : Le muscle entre alors dans la phase *post rigor* et devient à nouveau souple.

Après un certain temps, les principaux mécanismes biochimiques se mettent en place conduisant à une altération progressive du muscle, il s'agit de la phase d'autolyse (Dunajsky, 1979).

2.2. Types d'altération

Le problème de la conservation en parfait état de fraîcheur est souvent difficile, en raison de l'activité enzymatique des tissus eux-mêmes et de celle des bactéries contaminants. Il faut considérer successivement trois causes d'altération :

2.2.1. Altérations autolytiques (enzymatiques)

Les enzymes de la protéolyse autolytiques contribuent à la dégradation des tissus de la chair de poisson *post mortem*, conduisant à un ramollissement considérable du muscle (Chéret, 2005).

En effet, suite à la mort du poisson, la dégradation de l'ATP est instantanée et se traduit chimiquement par sa disparition et par l'augmentation de plusieurs autres molécules (Samuel et al., 2002). De plus, la dégradation de l'ATP permet la formation de l'adénosine diphosphate (ADP), l'adénosine monophosphate (AMP), l'inosine monophosphate (IMP), l'inosine (Ino) et l'hypoxantine (Hx). On considère, que l'hypoxantine aurait un effet direct sur l'arrière goût amer du poisson altéré; par contre, l'IMP est responsable du goût recherché du poisson frais qui n'existe que dans les produits de la mer de première qualité (Hughes & Jones, 1966).

Chez certaines espèces (encornets, harengs), les altérations enzymatiques précèdent les autres altérations et par conséquent, elles dominent la détérioration du poisson réfrigéré (Huss,1999)

2.2.2. Altérations microbiennes

Immédiatement après capture, la chair du poisson est stérile, les régions contaminées sont les branchies, le mucus qui recouvre la peau et le tube digestif (Baross & Liston , 1970;Shewan, 1977). Les réactions d'autolyse des muscles du poisson favorisent la diffusion de liquides biologiques et la progression des bactéries (Baird-Parker, 2000 ; Gram & Dalgaard, 2002). L'altération bactérienne prend le pas sur les dégradations enzymatiques et la conséquence en est une accélération de la dégradation du poisson même pendant le stockage et la transformation.

De nombreux facteurs conditionnent les modalités de l'altération microbienne: variété de poisson, pH de la chair, richesse en graisse, habitat du poisson, type et étendue de la contamination microbienne et les conditions de la pêche et de stockage. La microflore contaminante du poisson est fortement influencée par celle du milieu aquatique (Diop, 2008).

Beaucoup de poissons marins contiennent dans leur chair de l'oxyde de triméthylamine (OTMA) que certaines bactéries (*Photobacterium phosphoreum*, *Vibrionaceae*) sont capables d'utiliser sous conditions anaérobies, entraînant la libération d'amines comme la triméthylamine (TMA) responsable de mauvaises odeurs ; mais elle est peu présente chez les poissons gras (Gram & Dalgaard, 2002 ; Eymard, 2003). L'activité bactérienne aboutit aussi à la libération d'ammoniac, d'H₂S, de diméthylsulfure, de méthyl mercaptan et autres composés nauséabonds. De plus, les acides aminés peuvent être soit désaminés en acides gras inférieurs, soit décarboxylés en amines toxiques (histamine...) (Guiraud, 1998).

2.2.3. Altérations chimiques (oxydation)

Les processus d'altération chimique les plus importants sont les modifications qui se produisent dans la fraction lipidique des poissons. Les processus d'oxydation, ou autooxydation, sont une réaction où n'interviennent que l'oxygène et les lipides insaturés. Une première étape conduit à la formation d'hydroperoxydes, qui sont sans saveur mais peuvent entraîner le brunissement et le jaunissement de la chair de poisson.

La dégradation des hydroperoxydes donne lieu à la formation d'aldéhydes et de cétones, Ces composés dégagent une forte odeur de rance. L'oxydation peut être déclenchée et accélérée par la chaleur, la lumière (et notamment les rayons UV) et plusieurs substances

organiques et minérales (par exemple le cuivre et le fer). On connaît également un certain nombre d'antioxydants qui ont l'effet inverse (alpha-tocophérols, acide ascorbique, acide citrique et caroténoïdes)(Huss 1998).

2.2.4. Altérations sensorielles

L'altération des aliments leur donne un mauvais goût et une odeur désagréable (d'acide, de pourri, de moisi, etc.) et transmet des germes pathogènes.

La chair de poisson ne présente pas d'odeur désagréable quand le poisson est très frais, mais cette chair s'altère très rapidement. Chez les poissons gras, les principaux composés responsables des mauvaises odeurs sont des composés carbonylés issus de l'oxydation des lipides. La triméthylamine (TMA), issue de la dégradation des oxydes de triméthylamine (TMAO) est responsable aussi de mauvaises odeurs mais elle est peu présente chez les poissons gras. Chez le poisson, les phénomènes d'apparition et de résolution de la rigidité cadavérique sont rapides.

Les caractéristiques du poisson altéré par rapport au poisson frais sont les suivantes :

-) Odeurs et de saveurs désagréables, de production de gaz
-) des branchies rouge foncé et visqueuses, au lieu de branchies rouge vif
-) une chair molle avec traces de sang de couleur brune, au lieu de chair ferme avec sang rouge
-) des pupilles rouges laiteuses, au lieu de pupilles claires,

Ces changements sensoriels caractéristiques chez les produits de pêche en état *post mortem* varie considérablement suivant les espèces et la méthode de conservation (Huss, 1999).

Tableau 2 .Types et signes d'altération sensorielles de la chair du poisson (la sardine)

Types Signes	Types			
	microbiologiques	Chimiques	Autolytiques	Physique
Odeur / saveur anormales	+	+	+	-
Formation d'une couche poisseuse	+	-	-	-
Formation de gaz	+	-	-	-
Changements de couleurs	(+)	+	+	+
Changement de texture	(+)	-	+	+

2.3. Niveaux et sources de contamination microbienne

Le niveau de contamination des poissons au moment de la capture dépend de l'environnement et de la qualité bactériologique de l'eau dans laquelle ils ont été pêchés.

Beaucoup de facteurs influent sur la microflore des poissons ; les plus importants sont la température, la teneur en sel, la proximité des régions de pêche avec les habitations humaines, la quantité et l'origine de la nourriture consommée par les poissons, ainsi que les méthodes de pêche.

Il y a deux groupes de bactéries qui peuvent contaminer les produits de la pêche:

- ✓ Ceux qui sont normalement présents dans l'environnement aquatique (microflore indigène), par exemple : *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* (Huss et Peterson, 1980).
- ✓ Ceux qui sont introduits par la contamination de l'environnement par les déchets souvent domestiques ou industriels, par exemple : Les Enterobacteriaceae telles que *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, et *Yersinia enterocolitica*.
- ✓ Le personnel peut servir de vecteur ou apportant des risques hygiéniques (germes fécaux, *Staphylococcus*, *Clostridium*) (Delarras, 2007).

2.4. Les indicateurs microbiens

2.4.1. *Salmonella spp*

Les Salmonelles appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae et, l'on connaît plus de 2000 sérovars. *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium sont deux sérotypes responsables de salmonelloses transmises de l'animal à l'homme, provoquant des gastroentérites, et de toxi-infections alimentaires (WEILL, 2009).

2.4.2. *Escherichia coli*

E. coli est une bactérie qui fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, germe que l'on trouve le plus communément dans les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud. Le plus souvent les souches d'*E. coli* qui colonisent l'appareil gastro-intestinal sont des commensaux inoffensifs. Toutefois à l'intérieur de l'espèce on trouve au moins quatre types de souches pathogènes :

- *E. coli* entérotoxigène (EPEC).
- *E. coli* entérotoxinoxigène (ETEC).

- *E. coli* entéroinvasif (EIEC), *E. coli* de type de dysenterie à bacille de Shiga la dose infective est faible (100 bactéries vivantes).

- *E. coli* entérohémorragique (EHEC).

-*E. coli* producteur de vérocytoxine (VTEC) ou *E. coli* O157 H :7 (JOLY & REYNAUD, 2002).

2.4.3. *Shigella sp*

Le genre *Shigella* fait partie de la famille des Enterobacteriaceae. Sa présence dans le milieu naturel étant liée à une contamination fécale. Les shigelles sont responsables de la shigellose qui est une infection de l'intestin. L'alimentation, y compris les produits de la mer, est la cause d'un certain nombre de poussées épidémiques de shigelloses. Dans la majorité des cas il s'agit de contamination d'aliments crus ou précédemment cuits au cours de leur préparation par un porteur asymptomatique infecté ne respectant pas les règles d'hygiène (SUTRA *et al.*, 1998).

Les Enterobacteriaceae (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli...etc.*) se manifestent toutes sur les produits de la pêche par suite de contamination à partir du réservoir animal/humain. Cette contamination est associée à la contamination fécale ou à la pollution des eaux, ou à la contamination directe des produits au cours de la préparation. Il en résulte que la lutte contre les maladies provoquées par les Enterobacteriaceae passe nécessairement par une bonne hygiène personnelle et de l'éducation sanitaire du personnel chargé de manipulation des aliments.

2.4.4. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques fait partie de la famille des *Micrococcaceae*, sont des germes ubiquistes. Le principal réservoir et habitat est constitué par la voie nasale des animaux/humain. Devriese *et al.*, 2005). Les produits de la mer peuvent être contaminés par les staphylocoques soit par l'intermédiaire de manipulateurs infectés, soit par l'environnement. Lorsqu'il se multiplie dans les aliments, *S. aureus* produit un certain nombre d'entérotoxines. Ces toxines sont thermostable et très résistantes aux enzymes protéolytiques (Vincenot *et al.*, 2008).

2.4.4. *Clostridium botulinum*

C. botulinum est extrêmement répandu dans le sol (végétaux, épices, sel marin), présence normale l'environnement aquatique et les poissons. Le botulisme humain est une maladie grave relativement rare, considérée comme la plus dangereuse. Il s'agit d'un empoisonnement provoqué par une toxine préformée dans l'aliment.

Tous les produits frais de la pêche constituent un milieu très favorable à la croissance de *C. botulinum* et à la production de toxine thermolabile par les souches non protéolytiques et psychrotrophes (type E, D, F). La vitesse de la synthèse des toxines augmente en fonction de la température quand celle-ci dépasse + 3,3°C, atteignant une production maximale à 25-30°C (Bourgeois, 1990).

2.4.5. *Vibrio* sp

Le genre *vibrio* fait partie de la famille des *Vibrionaceae* et comprend 34 espèces dont 13 espèces sont pathogènes pour l'homme. D'origine marine et se multiplient qu'en présence de 2 à 3% de sel (halotolérant). Ces espèces pathogènes sont mésophiles ubiquistes, des eaux tropicales, ainsi que dans des eaux tempérées. Les plus importantes sont : *V. paraheamolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus*. (Hellal, 2011)

➤ ***Vibrio cholerae*** : La bactérie peut contaminer les fruits de mer et l'intestin des poissons, des eaux d'estuaire dans les zones chaudes, eau de mer. *V. cholerae* est considéré comme témoin de contamination récente. Elle survit pendant 50 jours dans l'eau de mer à 5-10°C, et 10 à 12 jours à 30°C, expliquant son existence saprophytique. La dose infectante est élevée chez les personnes sans facteur de risque (>10⁸ bactéries). La cuisson des aliments est une protection simple et efficace de propagation de la maladie (Hellal, 2011)

2.4.7. *Listeria monocytogenes*

La bactérie est très répandue dans la nature. On peut l'isoler du sol, de la végétation, des aliments y compris le poisson et les produits de la mer. La listériose est une infection dont le point d'entrée est l'intestin, mais la dose infectante n'est pas connue, la période d'incubation peut varier d'un jour à plusieurs semaines (Hellal, 2011).

2.4.8. Flore mésophile aérobie totale

Elle correspond à des bactéries indicatrices d'hygiène dont le dénombrement permet d'apprécier la qualité microbiologique du poisson et l'application des bonnes pratiques d'hygiène. Une flore mésophile dénombrée en grande quantité indique un début du processus d'altération.

3. Amines biogènes et l'histamine

Dans le domaine alimentaire, les amines biogènes non volatiles proviennent de la décarboxylation des acides aminés par des enzymes bactériennes et tissulaires. L'histamine

appartient aux amines biogènes qui sont des molécules biologiquement actives sur le système nerveux central, sur le système vasculaire et au niveau gastrique. L'histamine, naturellement présente dans l'organisme, est un neuromédiateur largement impliqué dans les phénomènes inflammatoires et allergiques.

Les amines biogènes sont molécules considérées comme des traceurs de la dégradation des aliments, et plus particulièrement des protéines, et traduisent la fraîcheur des aliments (Anses 2012) fig. (03).

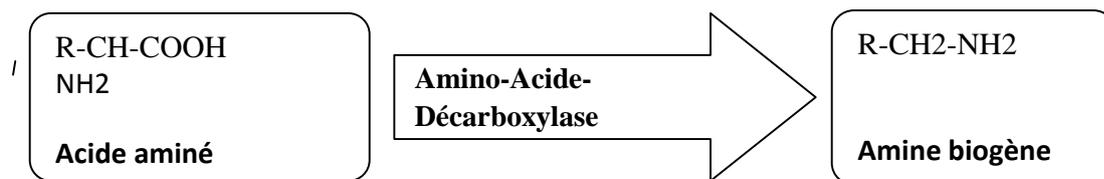


Figure 03: Dégradation enzymatique des acides aminés en amines biogène par décarboxylation.

3.1. Caractéristiques physicochimiques de l'histamine

- Ni la cuisson, ni la mise en conserve, ni la congélation ne détruisent l'histamine car c'est une molécule thermostable.
- Le salage et le fumage n'inhibent pas toujours le développement des bactéries responsables de la formation d'histamine.
- Une fois que l'enzyme favorisant la formation de l'histamine a été libérée par les bactéries, la réfrigération ne diminue pas son activité (d'où l'importance de ne pas rompre la chaîne du froid).

4.2. Facteurs de production d'Histamine

La formation de l'histamine dans les aliments dépend de trois facteurs essentiels : (Anses, 2012)

-) la teneur en histidine libre
-) la présence de bactéries capables de synthétiser l'histidine décarboxylase
-) les conditions permettant leur croissance de ces bactéries et la production d'enzymes actives (température, pH essentiellement).

Le premier maillon de la chaîne est la pêche. Les bateaux ont pour but de collecter de grosses quantités de poisson. Les poissons sont souvent malmenés et abîmés. Le découpage est aussi une étape importante au cours de laquelle les règles d'hygiène doivent être rigoureuses.

Les plus importants des facteurs de production étant la température de l'eau et sa salinité, la proximité des zones de récolte des habitations, la quantité et l'origine des aliments consommés par le poisson, et la méthode de récolte (Codex alimentarius, 2009).

La maîtrise de la contamination bactérienne et la limitation de l'activité enzymatique, l'histidine décarboxylase, peut éviter la production d'histamine (Duflos, 2009).

3.3. Bactéries Histaminogènes

La principale source d'histamine présente dans la chair du poisson correspond à l'activité enzymatique de certaines bactéries dites « histaminogènes » dont la croissance est directement corrélée à la formation de l'amine. La survenue d'une Intoxication à l'histamine tient, par conséquent, à la prolifération excessive de ces germes dans les poissons destinés à la consommation humaine (Arnold & Brown, 1978 ; Duflos, 2009).

La flore histaminogène est différente de la flore de putréfaction puisque très souvent le poisson paraît encore frais alors qu'il contient beaucoup d'histamine. Elle représente 0,1 à 1% des bactéries totales du poisson (Afilal & Zlajji, 1997).

Cette flore est très variée dans sa composition : des bacilles Gram -, des bacilles Gram+, des coques Gram+ mais se sont les *Enterobactériaceae* qui prédominent (Taylor *et al.*, 1982 ; Taylor, 1986) (Tableau 3).

Tableau 3: Microflore produisant de l'histamine (Boulay, 1999)

Types	Entérobactéries	Autres bactéries
Bactéries fortes productrices	<i>Proteus morganii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus sp.</i>
Bactéries faibles productrices	<i>Hafnia alvei</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Serratia spp.</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio spp.</i> <i>Photobacterium phosphoreum</i> <i>Pseudomonas ssp.</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>
Bactéries potentiellement productrices	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Aeromonas sp.</i>

Par ailleurs, des bactéries productrices d'histamine sont détectables quelle que soit la Température de conservation du poisson, puisqu'il existe des espèces mésophiles et d'autres Psychrophiles. De plus, bien souvent ces bactéries peuvent produire d'autres amines biogènes qui potentialisent l'action de l'histamine chez l'homme après ingestion du poisson altéré (Boulay, 1999). L'activité enzymatique demeure même quand les bactéries sont inactives (Klausen & Huss, 1987).

3.4. Intoxication histaminique

L'intoxication histaminique ou syndrome de pseudo-allergie alimentaire s'agit d'une intoxication après consommation d'un poisson dont la chair contient une grande quantité d'histamine obtenue par transformation de l'histidine sous l'effet d'une prolifération bactérienne elle-même secondaire à une rupture de la chaîne du froid. Les poissons concernés peuvent être des poissons scombroïdes comme le thon ou le maquereau mais également d'autres espèces comme la dorade, l'espadon, la sériole ou la sardine (Lavoue *et al.* 2007).

L'ingestion de doses élevées d'histamine conduit à la saturation des enzymes digestives catabolisant l'histamine et à l'intoxication par absorption intestinale de l'histamine non métabolisé. L'ingestion de doses plus faibles d'histamine en combinaison avec d'autres amines biogènes présentes dans l'aliment peut produire le même effet par inhibition compétitrice des enzymes de dégradation de l'histamine (Ansess, 2012).

Chez environ 1 % de la population (surtout des femmes), la consommation d'aliments contenant de faibles quantités d'histamine provoque déjà des réactions pseudo-allergiques en raison d'une intolérance individuelle à l'histamine (Duflos, 2009 ; ALP, 2009).

3.5. Réglementation

La dose seuil entraînant le débordement des systèmes de détoxication est très difficile à déterminer. Elle dépend de multiples facteurs dont la variabilité individuelle. La réglementation (le règlement CE n° 2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires qui définit les limites de concentrations à ne pas dépasser pour l'histamine) fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche comme suit :

Lors d'un plan de surveillance, neuf échantillons sont prélevés sur chaque lot :

- la teneur moyenne ne doit pas dépasser 100 mg.kg⁻¹

- deux échantillons peuvent dépasser 100 mg.kg-1 sans atteindre 200 mg.kg-1
- aucun échantillon ne doit dépasser 200 mg.kg-1.

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

-) **Scombridés** : maquereaux, auxides, thonites, thons, thazards, palomettes, bonites.
-) **Clupeidés** : sardines, harengs, menhadens, ethmaloses, harengules, chardins, sardinelllessardinops, sprats, shadines.
-) **Engraulidés** : anchois.
-) **Coryphaenidés** : coryphènes

Au niveau national: En Algérie, le seuil recommandé est de 10mg/100g (JORA, 2006).

3.5. Utilisation des amines biogènes comme indicateurs d'altération

L'intérêt du dosage des amines biogènes est de mettre en évidence la présence de contaminants microbiens dans les aliments, les amines biogènes pouvant être utilisées comme des indicateurs de la qualité organoleptique des produits alimentaires et en particulier des produits de la mer (Jørgensen *et al.*, 2000a; Veciana-Nogués *et al.*, 1997). Les amines biogènes sont sans saveur particulière, mais sont indicatrices de la présence de bactéries altérantes productrices d'H₂S, TMA et ammoniac. En conséquence, elles peuvent être utilisées dans certains cas comme indicateur de la qualité. En effet, l'histamine et la tyramine ne sont produites qu'à partir du système enzymatique de microorganismes par la dégradation des acides amines libres précurseur. En revanche, la putrescine et la cadavérine sont produites à la fois par les enzymes endogènes de l'aliment et celles des microorganismes.

3.6. Précaution

Pour éviter la formation de l'histamine :

-) saigner et rincer le poisson soigneusement (car le sang contient l'histidine, le précurseur de l'histamine).
-) éviscérer (car de nombreuses bactéries sont présentes dans les viscères) et rincer efficacement le poisson, puis le réfrigérer ou le congeler le plus rapidement possible.
-) ne rompre la "chaîne du froid" à aucun moment aussi bien lors de la capture que lors de la transformation, du conditionnement puis de la commercialisation.
-) respecter de bonnes conditions d'hygiène pour éviter toute croissance des germes naturellement présents dans le poisson et toute contamination extérieure.
-) en cas de congélation : décongeler le poisson rapidement et l'utiliser aussitôt.
-) le mode de conditionnement (notamment l'emballage sous atmosphère modifiée) peut diminuer la formation d'histamine pour quelques espèces de poissons. (Ifremer, 2008).

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

II.1. Période et Lieu de stage

La présente étude est réalisée au centre national de recherche et de développement de la pêche et l'aquaculture (CNRDPA) de BouIsmaïl –Tipaza pour une période de 4mois (du Mars au Juin 2016).

L'objectif de l'étude est l'évaluation et le contrôle de la qualité de la sardine (*Sardina pilchardus*) au niveau de la baie de BouIsmaïl par la détermination des propriétés physico-chimiques, biochimiques et microbiologique ainsi des approches Toxicologiques par l'utilisation des Amines biogènes plus précisément l'histamine pour estimer la qualité de notre espèce cible *Sardina pilchardus* .

II.2. Matériel

Le matériel de laboratoire utilisé lors de nos expériences est présenté avec des illustrations au niveau de l'annexe (1).

2.1. La chair de sardine : *sardina pilchardus* échantillonnée dans la baie de BouIsmaïl, à l'état frais ou après conservation à 4C° dans les conditions expérimentales a fait l'objet du matériel biologique.

2.2. Conservateurs :Un conservateur de synthèse et un bioconservateur ont été utilisés dans le but d'améliorer la durée de conservation par réfrigération.

- L'acide citrique (E330) sous forme de solution à une concentration de 0.4%.
- et l'hydrolat du romarin (eau florale) : extrait de romarin (*Rosmarinus officinalis*) obtenu par la méthode d'hydrodistillation qui permet de récupérer l'huile essentielle dans l'eau d'une concentration de 0.1%.

L'extrait de romarin est autorisé en tant qu'additif (E 392) dans l'Union européenne pour certaines denrées alimentaires, notamment dans les huiles de poisson et huile d'algue et les poissons et produits de la pêche transformés. Il n'est pas autorisé pour les poissons non transformés.

II.3. Echantillonnage et conditionnement

L'échantillonnage est réalisé lors de la criée matinale au niveau du port de pêche Bou Haroun à Bouismaïl. Deux lots d'environ trois kilogrammes de sardine (*Sardina pilchardus*) dont les individus étaient de poids moyen de 20g et une longueur moyenne de 15cm ont été directement collectés après capture à la mer.

Les échantillons réceptionnés dans une glacière sont ensuite acheminés directement au laboratoire de CNDRPA pour faire l'objet des différentes analyses à savoir physicochimiques,

biochimiques, toxicologiques et bactériologiques. Les échantillons ont subi une réfrigération à 4 °C et suivi pendant 12 jours pour faire l'objet de l'étude expérimentale.

Méthodologie

Chaque lot est éviscéré ensuite divisé en deux portions : l'une est considérée comme témoin et l'autre c'est l'échantillon traité par un des deux conservateurs, l'acide citrique et l'hydrolat de romarin. Figure (4)

L'évolution des paramètres ci-dessous a été suivie pendant la période de conservation à l'intervalle de 2 jours :

- paramètres physicochimiques : teneur en eau (H₂O%), matières minérales (MM%), matières organiques (MO%) et le pH.
- Les paramètres biochimiques : protéine, protéase et la catalase
- Les paramètres microbiologiques : recherche et dénombrement de la Flore aérobie mésophile totale, des Coliformes totaux et fécaux, des Clostridiés, de Salmonelle, de Levure et moisissures isolés sur des milieux appropriés
- Paramètres toxicologiques : teneur en azote basique volatil total (ABVT), en fer héminique et en histamine

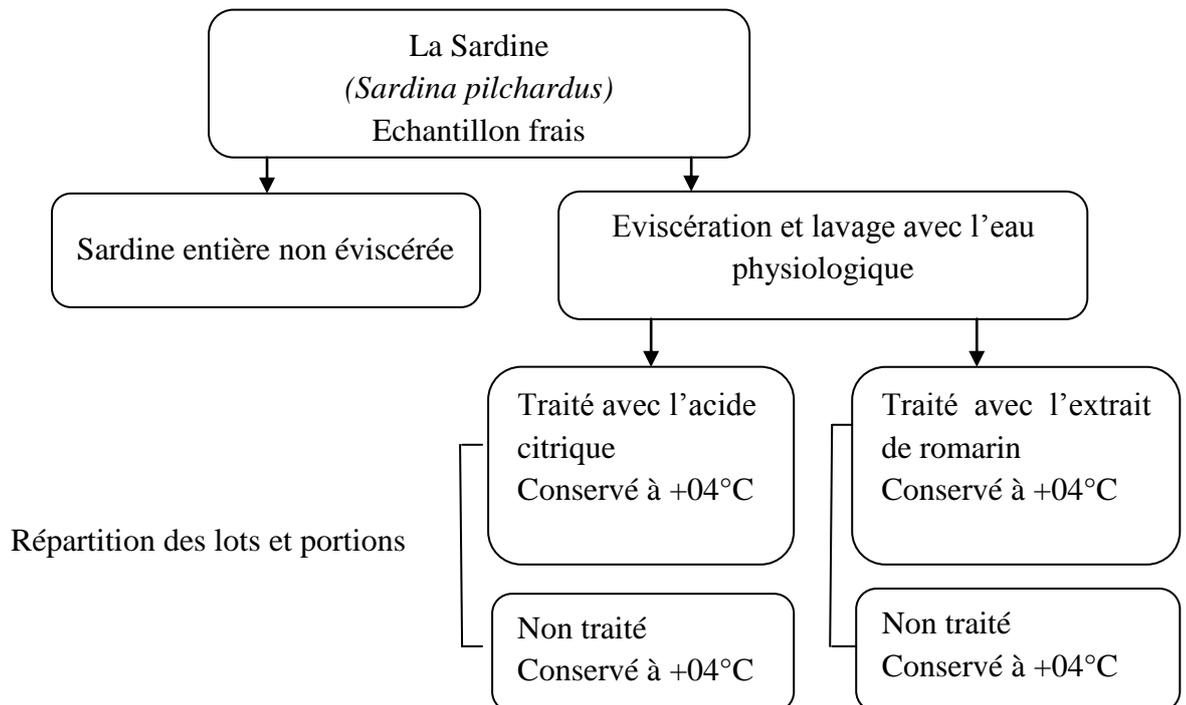


Figure (4) : la répartition des échantillons selon le mode de conservation

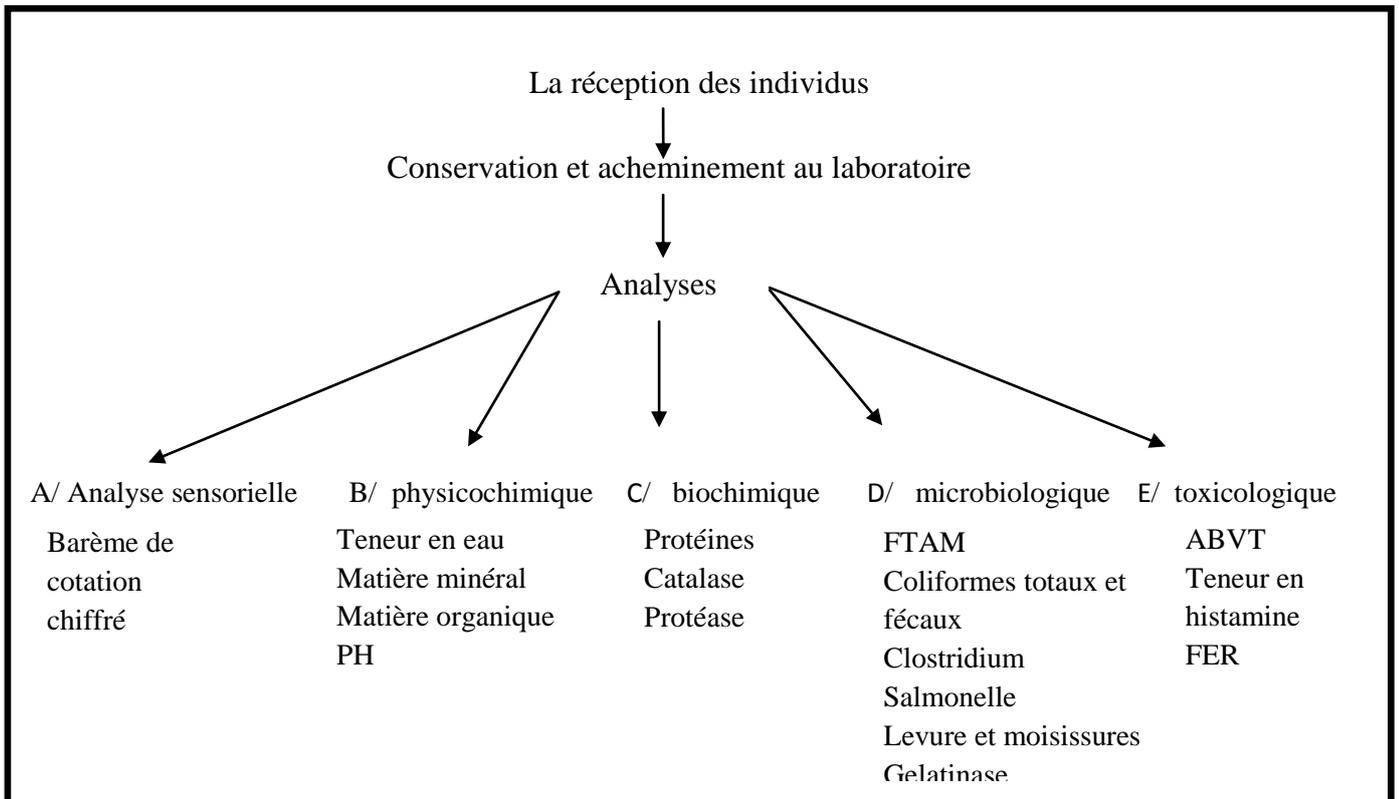


Figure (5) : Plan adopté avec les différents démarches appliquées

II.4. Méthodes

II.4.1. Appréciation sensorielle

L'appréciation sensorielle de l'état de fraîcheur de nos échantillons est basée sur l'observation de chaque lot et à chaque jour de prélèvement, d'un certain nombre de caractères organoleptiques relatifs à la couleur, à l'aspect général et à l'odeur et son intensité. Cette appréciation organoleptique est effectuée afin de déterminer le temps de rejet organoleptique qui correspond au moment où nos échantillons sont jugés impropres à la consommation et de mettre en évidence les changements organoleptiques spécifiques. La méthode utilisée est le système de cotation chiffré de la fraîcheur du poisson défini par le règlement du conseil N°103/76/CEE (Annexe 2).

II.4.2. Analyse physicochimiques

II.4.2.1. Teneur en eau

Le principe repose sur la perte d'eau libre de l'échantillon à l'étuvage. 03 à 05g de la chair sont pesés puis placés à l'étuve à une température de $105 \pm 04C^{\circ}$ pendant 24 h pour séchage. Une deuxième pesée est effectuée pour avoir le poids sec de l'échantillon. La teneur en eau est déduite selon l'équation suivante :

$$\% H2O = \frac{\text{Poids } H2O}{\text{Poids frais}} \times 100$$

$$\text{Teneur en eau} = \text{poids total humide} - \text{poids total sec}$$

II. 4.2.2. Matière minérale et organique

La teneur de la matière minérale est déterminée selon la méthode standard (AOAC, 1995). Elle obtenu après calcination d'une quantité de 01 à 03g de chair dans un creuset en porcelaine dans un four à mufles à une température de $450C^{\circ}$ pendant au moins 03h. Le taux de cendres (MM : Matière Minérale) contenu dans l'échantillon se calcule de la manière suivante :

$$\% \text{ Cendre} = \frac{m_r}{m_i} \times 100$$

m_r : masse du résidu après calcination

m_i : masse initiale de l'échantillon

La matière organique est déduite selon cette équation :

$$MO = \text{le poids frais} - \text{le poids MM} - \text{le poids d'H2O}$$

$$\% MO = \frac{\text{Poids MO}}{\text{poids frais}} \times 100$$

MO : Matière Organique.

II.4.2.3. Détermination du pH

Le pH est aussi un paramètre important qui montre la diminution de la qualité de la chair durant le stockage. Le principe est basé sur la détermination de la quantité des ions hydronium (H^+) dans une solution.

La mesure du pH a été réalisée selon la procédure de Wang (2002). 10g d'échantillon sont homogénéisés avec 50 ml d'eau. Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre.

II.5. Analyses Biochimiques

L'ensemble de ces procédures se déroulent dans des tampons adaptés. Le tampon dans lequel on homogénéisera devra avoir les propriétés physicochimiques permettant de maintenir la stabilité des molécules ou organites qu'on désire étudier.

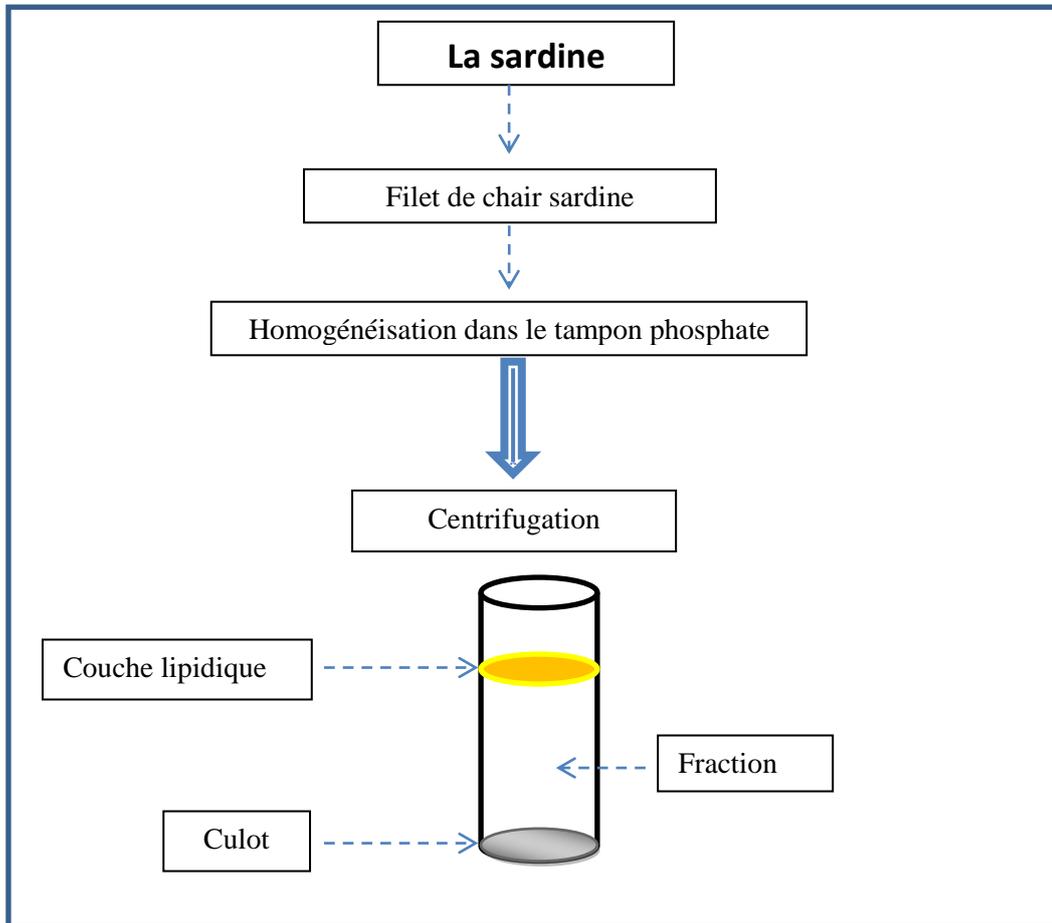


Figure (6) : procédure de l'analyse biochimique

❖ *Homogénéisation de la chair*

05g d'échantillon sont homogénéisés avec 50ml du tampon phosphate (20 mM; pH7.8) à l'aide d'un mixeur déchiqueteur. On effectue ensuite une centrifugation à 6000 g pendant 20 min à 10°C. Le surnageant obtenu (**Fraction S9**) est utilisé pour doser les protéines et comme source d'enzyme pour le dosage de la catalase et la protéase.

II.5. 1. Dosage de la protéase (dans la chair)

❖ *Principe*

L'approche du dosage de la protéase consiste essentiellement à mélanger les composants de la réaction et les incuber durant un certain temps. A la fin de l'incubation (30min à 02h), on prélève les échantillons. On y mesurera alors la quantité des sous-produits issus de la dégradation du substrat (dans le cas de protéases la tyrosine est le sous-produit issu de la dégradation de la caséine).

❖ *Mode opératoire*

Le dosage de l'activité protéase est déterminé selon la méthode décrite par (Ranilson *et al*, 2005). 02ml de la solution de caséine (01% P/V dans le tampon phosphate pH7.2) utilisée comme substrat est incubée avec 02ml de surnageant (source d'enzyme S9), à une température de 50°C pendant 01heure. La réaction est stoppée en ajoutant 01ml du TCA à 10% (Acide trichloroacétique). On laisse reposer pendant 15 min et on effectuera une deuxième centrifugation à 6000g pendant 15min. La lecture de l'absorbance est faite à 280nm. Dans le blanc l'eau physiologique remplace les 02ml du S9.

II.5.2. Dosages des protéines par la méthode de Lowry

❖ *Principe*

C'est une techniques spectrophotométriques basées sur les caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines.

La méthode développée par **Lowry *et al*** combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-*Ciocalteu*. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret.

❖ *Mode opératoire*

Dans des tubes à essais, le surnageant est dilué au 1/2 et 1/8 et complétées à 1 ml avec de l'eau distillée. Le tube de blanc contient 01ml d'eau distillée. Puis 05ml de réactif Lowry (voir annexe) est additionné. On homogénéise et on ajoute après 10min 0,5ml de réactif Folin-*Ciocalteu* dilué au 1/2 (il est important d'agiter juste après l'addition de ce dernier). L'ensemble est mis à l'obscurité pendant au moins 30min. la lecture de l'absorbance est faite à 660nm.

II.5.3. Dosages de la Catalase par mode Cinétique

❖ *Principe*

L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzyme active dans une préparation. L'unité d'activité enzymatique (U) est définie en termes de quantité de substrat disparaissant par unité de temps ou de quantité de produit apparaissant par unité de temps.

L'approche cinétique consiste à suivre en continu la quantité du composé voulu. La méthode consiste à mélanger les réactifs et la préparation enzymatique dans une cuvette de spectrophotomètre puis à suivre la variation temporelle du paramètre mesuré à 240 nm.

Dans notre pratique l'activité catalase est déterminée selon la méthode de Lartilot décrite par Gülüzar *et al* (2007).

❖ *Mode opératoire*

2,5ml du substrat (100µl solution de H₂O₂ à 30% ; 2,4ml tampon phosphate 75mM à pH7) sont placés dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglée sur le mode cinétique. 50µl de la fraction S9 (source d'enzyme) sont ajoutés au mélange, on déclenche le mode cinétique du spectrophotomètre et on suit la décomposition de peroxyde d'hydrogène dans un intervalle de temps de 60s. La lecture de l'absorbance est faite à 240nm.

II.6. Analyses Toxicologiques

II.6.1. Teneur en azote basique volatil total (ABVT)

L'analyse de l'ABVT a été réalisée selon la technique basée sur la distillation proposé par Woyewoda *et al* ; (1986) et modifiée par Uriarte-Montoya et Villalba (2010).

05g de la chair sont homogénéisés avec 300 ml d'eau distillée pendant 2 min. Par la suite 02ml d'huile comestible et 02 g de sulfate de magnésium sont ajoutés au mélange. Le tout est mis dans un ballon à distillation et chauffé jusqu'à ébullition. Le distillat est récolté après 25min dans un bécher contenant 25ml d'acide borique à 2% (P/V). Additionné à une goutte de rouge de méthyle, le filtrat récupéré est titré directement avec l'acide sulfurique à 0,05 N.

Les données sont exprimé en mg d'ABVT/100g d'échantillon selon l'équation suivante :

$$mg\ ABVT = \frac{((V1 - V2) \times N2 \times 100 \times 14)}{W2}$$

- V1 : quantité (ml) de H₂SO₄ utilisés pour l'échantillon.
- V2 : quantité (ml) de H₂SO₄ utilisé pour le témoin.
- N2 : normalité de H₂SO₄.
- W2 : poids de l'échantillon.

II.6.2. Détermination de la teneur en histamine

La détermination de la teneur en histamine est réalisée selon la méthode colorimétrique proposée par Patange *et al*. (2005). Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe coloré entre le noyau imidazole de l'histamine et le *p*-phenyldiazonium sulfonate (réactif).

L'histamine est extraite de l'échantillon de la sardine à l'aide d'une solution saline (NaCl 0,85%) : 05g de chair de sardine est homogénéisés avec 20ml de NaCl 0,85% suivi d'un broyage et d'une centrifugation pendant 10 minutes à 4 C°. Le surnageant récupéré est mit dans des tubes sec à lesquels sont ajoutés 01ml de surnageant, 02 ml solution saline et 0,5 g de mélange de sel (6,25g de sodium sulfate anhydrideet 1g de trisodium phosphate). Après une agitation vigoureuse, 02ml du butanol sont additionnées à chaque tube suivi d'une agitation puis centrifugation pendant 10 minutes.

La couche butanolique supérieure qui renferme l'histamine est reprise dans un tube pour l'évaporation et le résidu est dissous avec 01ml l'eau distillée.

Dans des tubes propres sont mélangés 05ml de carbonate de sodium à 1,1% (p/v) avec 02 ml du réactif *p*-phenyldiazonium sulfonate. Le mélange est ensuite ajouté au tube contenant 01ml de la solution du résidu recueilli dans le processus d'extraction.

L'absorbance de la couleur produite par le complexe est mesurée après 5min à $\lambda=496$ nm dont le blanc est l'eau distillé.

La concentration de l'histamine dans l'échantillon est obtenue en faisant référence à l'équation de la droite du courbe d'étalonnage.

Cette méthode possède un seuil de détection de 01mg/100g (1 μ g/ml). Toutes les concentrations en dessous de cette limite sont considérées comme des traces d'histamine.

II.6.3.Mesure du taux de fer

Une pesée de 01g de chair de sardine est bien homogénéisée avec 20 ml de l'eau distillé. On laisse reposer environ 04 minutes avant filtration du mélange sur du papier filtre. La lecture de l'absorbance est faite à 410 nm.

II.7. Analyses bactériologiques

II.7.1.Echantillonnage

Le contrôle de la qualité et de la salubrité du poisson s'effectue par sondage. La méthode d'échantillonnage utilisée est celle préconisée par La Commission Internationale des Normes Microbiologiques Relatives aux Denrées Alimentaires ou ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), qui a défini des méthodes d'échantillonnages pour l'analyse systématique des produits alimentaires. La chair du poisson est prélevée aseptiquement.

II.7.2.Traitement des échantillons

Pour un contrôle bactériologique, toutes les manipulations doivent se faire dans des conditions d'asepsies les plus strictes. Le matériel nécessaire pour les analyses programmées doit être stérilisé et préparé avant le début des analyses.

II.7.3.préparation de la solution mère

L'analyse microbiologique des échantillons s'effectue à partir d'une solution mère dans la composition est 100 g de chair de la sardine homogénéisé dans trois fois le poids de la chair en solution TSE. Broyer à l'aide d'un broyeur homogénéisateur pendant 60 secondes : on obtient la solution mère à 10^{-1} à partir de laquelle sont préparées les autres dilutions décimales (10^{-2} et 10^{-3}). (Afnor, 1988 ; Larpent, 1997).

II.7.4. Numération de la flore aérobique mésophile totale.

Le milieu préconisé pour ce test est le Plate Count Agar le (PCA), proposé en 1973 par l'AFNOR (association française de normalisation).

❖ *Méthodologie*

Deux dilutions décimales successives sont utilisées. 01ml de chaque dilution est réparti en goutte au fond de la boîte correspondante (pour chaque dilution, deux boîtes de Pétri sont utilisées). Les gouttes sont ensuite recouvertes d'une couche de gélose PCA en surfusion (45-47°C), et le tout est homogénéisé avec des mouvements circulaires. Une fois la gélose refroidie, elle est recouverte d'une seconde couche de gélose PCA, ce qui a pour effet d'immobiliser les bactéries, et de former des colonies bien définies. Les boîtes de Pétri ainsiensemencées sont incubées à 30°C pendant 72h.

Les colonies sont dénombrables si leur nombre est compris entre 30 et 300. Au-dessus de 300, elles sont indénombrables, et en dessous de 30 on considère qu'elles sont trop rares pour être dénombrées. La formule mathématique suivante est utilisée :

$$N = \frac{\Sigma \text{ colonies}}{V_{ml} \times (n_1 + 0,1 n_2) \times d_1}$$

Où : N : nombre d'UFC par gramme de produit initial ;

Σ Colonies : Somme des colonies de boîtes interprétables ;

Vml: Volume de la solution déposé (1ml) ;

n1 : Nombre de boîtes considérées à la première dilution retenue ;

n2 : Nombre de boîtes considérées à la seconde dilution retenue ;

d1 : Facteur de la première dilution retenue.

- Flore mésophile : incubation à 30°C pdt au moins 3 jours
- Flore psychrophile : incubation au froid pdt au moins 5 jours

II.7.5. Numération des coliformes totaux, des coliformes fécaux et thermotolérants

Ils sont réalisés suivant la norme AFNOR V45- 110 JUIN 81 (Benmoukhtar, 2000). La méthode appliquée pour le dénombrement et la recherche des coliformes fécaux est la méthode du nombre le plus probable (NPP) par lecture sur table de Mac Grady.(voir annexe) (AFNOR ,1988).

❖ *Mode opératoire*

La technique en milieu liquide (VBL) fait appel à deux tests consécutifs, à savoir :

- test de présomption, réservé à la recherche des coliformes totaux.
- test de confirmation, appelé encore test de Mac Kenzie, réservé à la recherche des coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

❖ *Test de présomption*

La technique NPP consiste à préparer dans un portoir une série de 9 tubes contenant le milieu (VBL) avec une cloche de Durham à raison de trois tubes pour chaque dilution. Alors, 1ml de chaque dilution décimale 10^{-1} à 10^{-3} , est transféré aseptiquement dans chacun des trois

tubes. En prenant soin de chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham en mélangeant le milieu et l'inoculum.

Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les tubes positifs sont ceux qui présentent à la fois : Un dégagement gazeux (supérieur au 1/10^{ème} de la hauteur de la cloche) et un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune.

❖ *Test de confirmation ou test de Mac Kenzie*

Les tubes de (VBL) positifs, trouvés lors du dénombrement des coliformes totaux, feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une pipette stérile dans deux autres tubes l'un contenant le milieu (VBL) avec cloche et l'autre de l'eau peptonée exempte d'indole (EPEI). Les tubes seront maintenus à l'étuve à 44°C pendant 24 heures.

Le résultat est considéré comme positif, seulement s'il y a un virage du (VBL) au jaune avec dégagement de gaz, au moins 1/10^{ème} de la cloche de Durham, et formation d'un anneau rouge après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs au tube de l'eau peptonée exempte d'indole.

II.7.6. Numération de levures et moisissure

Le milieu utilisé pour ce test est (OGA), proposé en 1973 par l'AFNOR (association française de normalisation).

On effectue deux dilutions décimales. On prend 1ml de chaque dilution et on les répartit à l'aide d'un râteau sur la gélose (pour chaque dilution 2 boîtes sont utilisées). On incube les boîtes à 25C° pendant 5 jours. Les boîtes dénombrables sont comprises entre 30 et 300.

II.7.7. Numération des Streptocoques fécaux ou thermotolérants

➤ **Etape 1 ou test présomptif**

Ce test est effectué par ensemencement d'un milieu de Rothe S/C (AFNOR, 1960). Ce milieu contient de l'azide de sodium (NaN₃) qui inhibe la plupart des microorganismes. Il est peu favorable à la croissance des Streptocoques fécaux et la plupart des autres bactéries ne s'y cultivent pas. Le milieu de Rothe est cependant moins sélectif que le milieu de Litzky, ce qui nous mène d'abord à l'utiliser dans la première étape, et les germes adaptés à l'effet inhibiteur de l'azide de sodium s'adaptent à la présence d'éthyl violet.

1 ml de la suspension mère et des dilutions décimales de cette dernière sont ensemencé dans 9 ml de milieu. Après 24 heures à 48 heures d'incubation à 37°C, sont considérés positifs les tubes présentant un trouble bactérien. Ces tubes sont soumis au test confirmatif.

➤ **Etape 2 ou test confirmatif**

L'addition d'Ethyl violet au milieu de Rothe le rend sélectif et spécifique des seuls streptocoques fécaux.

Ce milieu est ensemencé à partir des tubes positifs du milieu de Rothe. Après 24 h à 48 h d'incubation à 37°C, sont considérés positifs les tubes présentant un trouble bactérien avec parfois formation d'un culot violet.

- ✓ Le nombre de Streptocoques fécaux est exprimé par le NPP selon la table de Mac Grady.

II.7.8. Numération des clostridium sulfito-réducteurs (Dellaras, 2000)

Parmi les *Clostridium* sulfito-réducteurs, *C. perfringens* occupe une place très importante. En effet, ce germe est très souvent à l'origine de toxi-infections d'origine alimentaire.

On porte aseptiquement 5ml de la solution mère dans 3 tubes. Après avoir soumis les tubes à un choc thermique (10min dans un bain marie à 80°C en suite trempage dans un bain froid), on ajoute 15 ml de gélose viande - foie sulfité (sulfite de sodium) et 4 à 5 goutte d'Alun de fer. On couvre les tubes avec une couche de vaseline pour empêcher l'introduction de l'oxygène.

Les tubes sont alors incubés à 37°C pendant 24 à 48heures avec une première lecture à 16 heures.

Les colonies de Clostridium sulfito-réducteurs, sont des colonies noires d'un diamètre supérieur à 0,5mm.

II.7.9. Recherche des salmonelles

Il s'agit d'un problème très important en microbiologie alimentaire. La transmission s'effectue par des voies multiples et parfois complexes. Le nombre de germes pouvant provoquer une maladie infectieuse est parfois très faible (de l'ordre de 1 à 50 par 100 g produit) et dépend de l'espèce et du consommateur. La recherche de ces germes s'effectue par des tests de présence ou d'absence et la norme est de 0 germe par g (AFNOR V 08 013).

La recherche de ces germes s'effectue par un test de présence ou absence suivant la norme AFNOR V 08 013 (Benmokhtar, 2000).

Elle consiste à faire un pré enrichissement, dans un milieu non sélectif mais qui permet le développement des bactéries, avant de procéder à l'enrichissement et l'isolement en deux phases. Le mode opératoire comporte :

❖ Pré-enrichissement

Le pré enrichissement s'effectue, dans un flacon stérile, en mélangeant 25g de chaire avec 75ml de milieu TSE (Tryptone Sel Eau). L'incubation sera maintenue à 37°C pendant 24heures.

❖ Enrichissement primaire

Ce dernier consiste à mélanger 10ml de milieu de pré-enrichissement avec 100ml de bouillon Sélinite-Cystéiné (Flacon SFB supplémentée avec son additif). L'incubation est faite à 37°C pendant 18 à 24heures. Le contenu du flacon vire en rouge brique en présence de salmonelles.

❖ *Enrichissement secondaire et isolement*

Le bouillon Sélinite-Cystéiné incubé la veille coloré en rouge brique fera l'objet : d'une part, d'un enrichissement secondaire sur bouillon Sélinite-Cystéine en tube de 10ml à raison de 0,1ml par tube et d'autre part, d'un isolement sur gélose Hektoen (H1). Dans les deux cas, l'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

II.7.10. Recherche de l'activité gélatinolytique

Les bactéries qui ont une activité protéolytiques forte, produisent en général une gélatinase. La gélatinase est une protéase qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides.

Cette activité est recherchée par la technique de Frazier (1950) et modifiée par Feuer (1996)., ce test nous permet de déterminer s'il existe une relation entre cette activité et la concentration brute en protéines ainsi que la structure de la chair de poisson. Une gélose nutritive ordinaire est additionnée de 4% de gélatine et répartie en boîte de Pétri qui sont ensuiteensemencées en touche. L'incubation est faite à 30°C.

La présence de zones de lyse confirme la présence de bactéries gélatinolytiques. Elle est mise en évidence par vaporisation de quelques ml de réactif de Frazier. Un précipité opaque se produit sauf aux endroits où la gélatine est hydrolysée.

A

ABABOUCHE L.H., Afilal M.E., Rhafiri S. & Busta F.F., 1991. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25°C).

ABABOUCHE L.H., Souibri L., Rhaliby K., Ouahdi O., Battal M. & Busta F.F., 1996. Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and ambient temperature.

ABAD R., MIQUEL J., IGLESIAS M., ALVAREZ F., 1998. Acoustic estimation of abundance and distribution of sardine in the Northwestern Mediterranean. *Fisheries research*, 34: 239-245.

ACKMAN R.G, 1995. In: Ruiter A. (Ed.), Fish and Fishery Products. CAB International, Oxon UK. pp. 117-156.

ADOLPHE Y., 2006. Etude du fonctionnement du système lactoperoxydasique et validation de son effet inhibiteur vis-à-vis de flores du poisson. *Thèse de Doctorat en procédés biotechnologiques et alimentaires*. Institut National Polytechnique de Lorraine, 132p.

AFILAL M.E, Zlaji E, 1997. Isolement de bactéries mésophiles productrices d'amines biogènes dans *Sardina pilchardus*. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 114(5): 274-277.

AFILAL M.A, Daoudi H. Jdaine S., Asehrou A. & Bouali A, 2006. Study of the histamine production in the red flesh fish (*Sardina pilchardus*) and a white flesh fish (*Dicentrarchus*).

AGUILAR.R., LUGO-Sanchez M.E. & Robles-Burgueno M.R., 2001. Post-mortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0 °C. *Journal of Food Science*, 65(1): 40-47.

ALP, STATION DE RECHERCHE AGROSCOPE LIEBEFELD POSIEUX., (2009). Importance des amines biogènes dans l'alimentation et présence dans les différents fromages. Groupe de discussion Gruyère. N° 73 f. ISSN 1661-0814 / 27.10.2009

ALVAREZ P, Motos L, Uriarte A, Egaña J, 2001. Spatial and temporal distribution of european hake, *Merluccius merluccius* (L.), eggs and larvae in relation to hydrographical conditions in the Bay of Biscay. *Fisheries Research* 50: 111-128.

AMENZOU K, FERHAN-TACHINANTE F, YAHLAOUI A, MESFIOUI A, KIFANI S, 2005. Etude de quelques aspects de la reproduction de *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) de la région de Laâyoune (Maroc). Bulletin de l'institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie, n° 26-27, 43-50.

ANSES, 2012. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments.

AOAC, 1995. Histamine in seafood: fluorometric method. Sec. 35.1.32, Method 977.13. *In*: Cunniff P.A. (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD. pp. 16-17.

ARCHIBALD F, 2000. The presence of coliform bacteria in Canadian pulp and paper mill water systems - a cause for concern. *Water Qual Res J. Canada*, 35:1-22.

ARNOLD S.H. & Brown W.D., 1978. Histamine toxicity from fish products. *Advances in FoodResearch*, 34: 113-154.

B

BAIRD P, 2000. The production of microbiologically safe and stable foods. *In*: Lund B.M., Baird Parker T.C. & Gould G.W. (Eds), the microbiological safety and quality of food. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc. pp. 3-18.

BAKUN.A, 1996. Patterns in the Ocean Processes and Marine Population Dynamics. University of California sea Grant, Sand Diego, California, Usa, in cooperation with centro de Investigaciones Biologicas de Noroeste, La Paz, Baja California Sur, Mexico, 323p.

BACH B., (2011) .Composés naturels présents dans le vin et les aliments, les amines biogènes peuvent provoquer des allergies et des mauvais goûts. Pour mieux les connaître, le Service technique d'Inter Rhône a participé au programme européen de recherches Biamfood. Bilan.,septième programme-cadre de la convention de subvention KBBE-211441-BIAMFOOD. N° 771

BEGGE. G.A, WALDMA.J.R, 1999. An holistic approach to fish stock identification *.Fisheries Research* 43(1999) 35-44.

BENMOUKHTAR. R, 2000. Contrôle de qualité, maîtrise des techniques d'analyses microbiologique et chimique. Programme boursier Algéro-Française. Année 2000-2001.46p.

BONNIN-JUSSERAND M., 2011. etude du metabolisme des amines biogenes chez les bacteries lactiques du vin. these d'universite de bourgogne.

BOUDRAY. P, COLLET. B., CORNETTE.F, HERVOUET.V, BONHOMME.F, 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* 204 : 283-296.

BOURGEOIS. C.M., MESCLES .J.F. & ZUCCA .J. 1990. Microbiologie Alimentaire. Tome I: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. *Technique et documentation, 1er Edition, Lavoisier, Paris*

BOULAY. C, 1999. Intoxications histaminiques : poissons en cause, conditions de survenue et mécanismes pathogéniques actuellement connus. *Thèse de doctorat*. Ecole nationale de vétérinaire de Nantes. 122p

BROCHIER T, Colas F, Lett C., Echevin V., Cubillos L. A., Tam J., Chlaida M., Mullon C., Fréon P. Small pelagic fish reproductive strategies in upwelling systems: a natal homing evolutionary model to study environmental constraints *Progress in Oceanography Journal*.ss press.

BURGUENO. T, PEDRO J-N. , 2000. ¹³C NMR substituent chemical shifts in hydroxy-*p*-benzoquinones. *Magnetic resonance in chemistry-Volume 38, issue 5*, p390-393.

BURTON R.S, 1996. Molecular tools in marine ecology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 200: 85-101.

C

CEAEQ, 2000. Recherche et dénombrement des coliformes totaux; méthode par filtration sur membrane. *Centre d'expertise en analyse environnementale, Gouvernement du Québec*, p 25.

CENDRERO O., 2002. Sardine and anchovy crises in northern Spain: natural variations or an effect of human activities, *ICES Marine Science Symposia* 215: 279-285.

CORRAZE G. & KAUSNIK S. 1999. Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *Oléagineux, Corps gras, Lipids*, 6 (1), 111-115.

CHAABOUNI M., 2011. L'Histamine dans les produits de la pêche. Bulletin d'information des Services Veterinaires n° 7. DGSV pp.,1-8.

CHAN .B.K.K., MORRITT. D, WILLIAMS. G.A, 2001. The effect of salinity and recruitment on the distribution of *Tetraclita squamosa* and *Tetraclita japonica* (*Cirripedia; balanomorpha*) in Hong-Kong. *Marine Biology* 138: 999-1009.

CHAVEZ F.P., RYAN J, LLUCH-COTA S.E., ÑIQUEEN N., 2003. From anchovies to sardines and back: multidecadal change in the Pacific Ocean. *Science*, 299: 217-221.

CHERET R., 2005. Effet des hautes pressions sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson. Thèse de doctorat. Université de Nantes. 176p.

CLAUDE .J.Q., JAKUES .V.,2005- Les poissons de mer des françaises .Paris.P :96-97.

CODEX ALIMENTARIUS, 2009. .HYGIÈNE DES DENRÉES ALIMENTAIRES (TEXTES DE BASE). Quatrième édition.

CURY P., ROY, C., 1991.Pêcheries Ouest Africaines; Variabilité, Instabilité et Changement. *ORSTOM Editions.ISBN 2-7099-1040-3.525p*.

D

DARLEY, B, 1992. Poissons des côtes Algériennes OPU collections de cours d'agronomie.

DECKER E. A. & Hultin O. H, 1992. Lipid oxidation in muscle food via redox: iron. In A. S. Angelo (Ed.), Lipid oxidation in food. Washington, DC: American Chemical Society. 6, 33 - 54.

DEVRIESE L.A, VANCNNAYT M., BAELE M., VANEECHOUTTE M., DE GRAF E., SNAUWAERT C., CLEENWERCK I., DAWYNOT P., SWINCS J., DECOSTRE A. & HAESBROUCK F. 2005. *Staphylococcus pseudodintemedius* sp; a coagulase positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 1569-1573.

DIOP M.B, 2008. Sélection et caractérisation de souches bactériennes aptes à améliorer la technique de conservation du poisson par salaison au Sénégal, Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. 213p.

Dunajsky E., 1979. Texture of fish. *Journal of Texture Studies*, 10: 301-318.

DJABALI F, BRAHMI B ET MAMMASSE M, 1993. Poissons des côtes Algériennes I.S.M.A.L. Alger P58.

DUFLOS G., 2009. Histamine risk in fishery products. Bull. Acad. Vét. France (2009) .Tome 162 - N°3 <http://www.academie-veterinaire-defrance.org>

DULLARAS, 2003. microbiologie de l'environnement avec législation .GETAN MORIN édition. 2ème semestre .travaux pratique .231p.

DUMAY, J, 2006 . Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combine à l'ultrafiltration : application à valorisation de coproduits de poisson (*Sardinapilchardus*). Thèse de Doctorat label Européen. P284

E

EDBERG, RICE, KARLIN & ALLEN, 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 106-116.

EL MARRAKCHI A., BOUHRITI N., BENNOUR N., HMAMA A. & TAGAFIT H., 1990. Sensory, chemical and microbiological assessment of moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *J. Food Prot.* 53: 600-605.

EYMARD S. 2003. Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des procédés. Thèse de Doctorat en Génie des procédés (Ecole Doctorale en Génie des Procédés: Spécialité Biochimie. Nante. France.

ETTAHIRI O., BERRAHO A., VIDY G., RAMDANI M., DO CHI T., 2003. Observation on the spawning of *Sardina* and *Sardinella* off the south Moroccan Atlantic coast (21-26°N). *Fisheries Research* 60: 207-222.

F

FAO, 2001. La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture.

F.A.O.,2003. Assurance de qualité dans les produits de mer. *In: Huss H.H. (Ed.), FAO Fisheries Technical Paper No. 334. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome, Italy.*

FAO.,2004. Report of the working Group on the assessment of small-pelagic fish off northwest Africa. *FAO Fish. Rep.*, 762, 135 pp.

FAO, 2005. L'état des ressources halieutiques marines mondiales .services des ressources marines.

FAO, 2006. Report of the working Group on the assessment of small-pelagic fish off northwest Africa. *FAO Fisheries Report*, 811,181pp.

FAO, 2007. Report of the working Group on the assessment of small-pelagic fish off northwest Africa. *FAO Fisheries Report*, 849,3pp.

FAO, 2008. Report of the working Group on the assessment of small-pelagic fish off northwest Africa. *FAO Fisheries and Aquaculture N ° Report*, 882,117-118pp.

F.A.O., 2009. The State of World Fisheries and Aquaculture-2008. *In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.*

F.A.O. 2011. The State of World Fisheries and Aquaculture. *Table 1. Rome, FAO. 2011. 197p.*

FISCHER W., BAUCHOT M.L. ET SCHNEIDER M., 1987. Fiches F.A.O d'identification des espèces méditerranée et Mer noir (zone de pêche 37)" Révision 1 tome II : Vertébrés. FAO, Rome. P761, 1530.

FOREST, A., 2001. Ressources halieutiques hors quotas du Nord Est Atlantique : bilan des connaissances et analyse de scénarios d'évolution de la gestion. Ifremer Eds, tome 2 : 215 pp.

FRÉON ,P.,CURY P.,SHANNON L.,& ROY ,C.,2005. Sustainable exploitation of small pelagic fish stocks challenged by environmental and ecosystem changes : A review .*Bulletin of marine science* .76(2):385—462.

FREON P., STEQUERT B. 1979. Note sur la présence de *Sardina pilchardus* (Walb.) au Sénégal : Etude de la biométrie et interprétation. *Cybium* 6: 65-90.

FURNESTIN (J) ET FURNESTIN M.L., 1959. La reproduction de la sardine et de l'anchois des côtes atlantiques du Maroc (Saisons et aires de ponte) .*Rev. Trav Inst Pêches Martimes.*, 3(1),79,104.

G

GAGGIOTTI O.E., VETTER R.D., 1999. Effect of life history strategy, environmental variability, and overexploitation on the genetic diversity of pelagic fish populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56: 1376-1388.

GRAM L. & DALGAARD P., 2002. Fish spoilage bacteria B problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 262-266.

GRIMES S., BOUTIBA Z., BAKALEM A., BOUDERBALA M., BOUDJELLAL B., BOUMAZA S., BOUTIBA M., GUEDIOURA A., HAFFERSSAS A., HEMIDA F., KAIDI N., KHELIFI H., KERSABI F., MERZOUG A., NOUAR A., SELLALI B., SELLALIMERABTINE H., SEMROUD R., SERIDI H., TALEB M Z., TOUABRIA T., 2004. Biodiversité marine et littorale-Ed.SONATRACH-Ed.DIWAN, Alger-362p.

GUIRAUD J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. *In: Microbiologie des poissons et produits aquatiques*. Dunod, Paris, FR.

GUISANDE C., Cabanas J.M., Vergara A.R., Riveiro I., 2001. Effect of climate on recruitment success of Atlantic Iberian sardine, *Sardina pilchardus*, *Marine Ecology Progress Series* 223: 243-250.

GULUZAR A., OZLEM A., SEYHAN T., MUSTAPHA C., 2006. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 143, 218-224. Elsevier.

H

HELLAL ZAHRA ,2011. contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus application sur la sardine (*sardina pilchardus*).

HUGHES R.B. & JONES N.R., 1966. Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material, with a comment on the flavor relations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17: 434-436.

HURLEY M.J., LARSEN L.B., KELLY A.L. & MC SWEENEY P.L.H., 2000. Cathepsin D activity in Quarg. *Int. Dairy J.*, 10 : 453-8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HUSS H.H., 1986. Fresh fish: quality and quality changes. A training Prog. On fish technology and quality control. FAO/DANOA/ Rome, 131 p.

HUSS H.H.,1988. Le poisson frais : qualité et altérations de la qualité. Manuel de formation préparé pour le programme de perfectionnement F.A.O./DANIDA sur la technologie du poisson et le contrôle de qualité. F.A.O., Rome, Italie. *Pêche*, 29. 119 p.

HUSS H.H., 1999. Qualité et son évolution dans le poisson frais. Laboratoire de technologie Ministères de l'agriculture et des pêches Danemark. In : F.A.O. Document Technique sur les Pêches - 348 FAO. L'Organisation des Nations Unies pour L'Alimentation et L'Agriculture.

I

ICES. 2005. Report of the Working group on the assessment of mackerel, horse mackerel, sardine and anchovy. *ICES*, 7-16 September 2004

IFREMER., 1991. Connaissance de la matière première et étude des barèmes de traitement thermique de cuisson sous vide du poisson en cycle court Etude et expérimentation d'un pasteurisateur industriel pour la préparation de plats cuisinés en cycle court. Convention: Afrem – Ifremer. Rapport final.

IFREMER, 2008.fiche synthèse histamine réalisée pour bibliomer et le centre veille des produits aquatiques.

IFREMER., 2009 .Principales méthodes d'évaluation de la fraîcheur des produits de la mer. Département STAM. Brest, France : 64, 32-51

J

JIANG S.T., 2000. Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. *Food Science and Agricultural Chemistry*, 2 : 55-74.

JOLY B. & RENAUD A. 2002. Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic. Edition Lavoisier.

JORGENSEN L., HUSS H. & DALGARD P., 2000. The effect of biogenic amine production by single bacteria cultures and metabolism on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 56: 920-934.

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE, 2006. Arrêté du 12 Jomada Ethania 1427 correspondant au 8 juillet 2006 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en histamine dans les produits de la pêche par chromatographie liquide haute performance. *J.O.R.A.* N°58. pp. 19-20.

K

KLAUSEN N.K. & HUSS H.H., 1987. Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **5**: 147-156.

KODO J.L., 1990. L'ionisation des produits de la pêche. Collection « Valorisation des produits de la mer ». *Ifremer*, France. 171p.

KORSAN N., KLINQUART A. & DAUDE G. 2004. Salmonella sp. Dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **148**, 174-193.

KOUTRAKIS E.T., KALLIANOTIS A.A., TSIKLIRAS A.C., 2004. Temporal pattern of larval fish distribution and abundance in a coastal area of northern Greece. *Scientia marina*, **68** (4): 585-595. Bibliographie 203

L

LACHOWICZ K. J. , JONES G. P., BRIGGS D.R., BIENVENU F.E., WAN J. , WILCOCK A., COVENTRY M.J., 1998. The synergic presentative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L) against acid-tolerant food microflora. *Letter applied Microbiology*, Vol.26, N° 3, p.p.209- 214

LAUREC A ET LE GUEN J.C., 1981. Dynamique des populations marines exploitées, Tome 1, *Concepts et modèles*, 116p., CNEXO/ Centre Océanologique de Bretagne. Documentation

LAVOUE S., MIYA, M., SAITOH K., ISHIGUR, N.B., NISHIDA M., 2007. Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives (Clupeiformes), inferred from whole mitogenome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**(2007)-1096-1105.

LEDUC F, 2011. Evaluation de la qualité du poisson frais par des approches chimiques. Thèse de doctorat université Lille 1.

LLUCH-BELDA D., CRAWFORD R.J.M., KAWASAKI T., MCCALL A.D., PARRISH R.H., SCHARTZLOSE R.A., SMITH P.E., 1989. World-wide fluctuations of sardine and anchovy stocks: the regime problem. *South African Journal of Marine Sciences* **33**: 195-205.

LOVE R.M., 1980. The Chemical Biology of Fishes. Vol.2. *Academic Press London*. 1968-1977.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR N.J., RANDALL R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* **193**, 265-275.

M

MEDALE F., 2005. Caractéristiques nutritionnelles des poissons et facteurs de variations. *Aquaculture*, **79**: 87-93.

M.L. NUNES, I. BATISTA, R. MORAO DE CAMPOS, 1992 .Physical, chemical and sensory analysis of sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59 37-43.

MPRH, 2014.Appui à la formulation de la stratégie nationale de développement de la pêche et de l'aquaculture 2015 -2020(avec une attention particulière sur la pêche artisanale).

MUUS B.J,NEILSON J.C,DAHSTROM P ET OLESEN NYSTROM B.,1998.Guide des poissons de mer et pêche .5ème édition Delachaux et Neistlé .Paris.PDivision des ressources halieutiques, Département de la pêche des FAO. FAO document techniquesur les pêches N0 457, Rome.23P.

O

OLAFSDOTTIR G., & FLEURENCE J., 1997. Evaluation of fish freshness using volatile compounds-classification of volatile compounds in fish. *Methods to determine the freshness of fish in research and industry In Proceedings of the final meeting of the concerted action Evaluation of fish freshness AIR3CT94 2283, Nantes, France.*

OLIVAR M.P., SALAT J., PALOMERA I., 2001.Comparative study of spatial distribution patterns of the early stages of anchovy and pilchard in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* 217: 111-120.

P

PARRISH R.H., BAKAUN A., HUSBY D.M., NELSON C.S., 1983. Comparative climatology of selected environmental progresses in relation to eastern boundary current pelagic fish reproduction.In *Proceedings of the expert consultation to examine changes in abundance and species composition of neretic fish resources, FAO Fish, Bull.Rep.*, 291 (3), 731-777.

PATANGE S.B., MUKUNDAN M.K. & ASHOK KUMAR K., 2005. A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. *Food Control*, 16(5): 465-472.

PENFIELD M.P. & CAMPBELL A.M., 1990. Fats and their lipids constituents. Chemical reactions of lipids eds. *Experimental food science*, 3e ed. San Diego: Academic Press, p 3407.

PEREZ-VILLAREAL B. & POZO R., 1990. Chemical composition and ice spoilage of albacore(*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Science*, 55(3): 678-682.

PICLET G., 1987. Le poisson aliment. Composition et intérêt nutritionnel. *Cahiers de Nutrition et Diététique*, XXII. pp. 317-335.

PIVNICKA ., CENRY .K.,1996 .Poissons .pp:80.

PLANQUE B., FRÉDOU T., 1999. Temperature and the recruitment of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56 (11): 2069-2077.

R

RACHIDI A., 1997. Evaluation des critères d'appréciation de l'état de fraîcheur et de la qualité hygiénique du poisson. Faculté des Sciences Semlalia.

RACHIDI H., 1998. Mise au point d'un système de cotation pour l'appréciation sensorielle de la fraîcheur des produits de la pêche. *Mémoire de fin d'étude halieutique. Inst. Agro. Vet. Hassan II. Rabat, Maroc.*

RAMIREZ T., CORTÉS D., GARCIA A., 2001. Growth of North Alboran Sea sardine larvae estimated by otolith microstructure, nucleic acids and protein content. *Journal of Fish Biology* 59: 403-415.

RANILSON S., EDUARDO J.,RODRIGO B., PATRICIA M., MARIA E., LUANA C., COELHO L,2005. Alkalineproteinasefromintestine of Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*). *ProcessBiochemistry* 40, 1826-1834.Elsevier.

ROCHET M.-J., 2000. A comparative approach to life- history strategies and tactics among four orders of teleost fish.*ICES J.Mar.Sci.*, 57,228-239.

ROSE, K.A., COWAN JR., J.H., WINEMILLER, K.O., MYERS, R.A., HILBORN, R., 2001.compensatory densitydependence in fish populations: importance, controversy, understanding and prognosis.*fishfis* . , 2, 293-327.

S

SAMUEL A., BOYER J., CARBONNEAU M-É., COULOMBE F., COULOMBE N., DESBIENS M., LECLERC L., MARTIN C. & MORIN R., 2002. Guide Élevage des Salmonidés, Fascicule 12, Transformation. Ministère de l'agriculture Québec, des pêcheries et de l'alimentation, *ISBN.*, 133 p.Santé canada, 2005

SANCHEZ-ESCALANTE A., DJENANE D., TORRESCANO G., BELTRAN J.A. & RONGALES P. 2001. The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmospher. *meat science*,58, 421-429

SANTOS M.H.S., 1996. Biogenic amines: their importance in foods, *Int. J. Food Microbiol.* 29 213–231.

SCHWARTZLOSE R.A., ALHEIT J., BAKUN A., BAUMGARDTNER T.R., Cloete R., Carwford R.J.M., Fletcher W.J., Green-ruiz Y., Hagen E., Kawasaki T., Lluch-Belda D., Lluch-Cota S.E., Mac Call A.D., Matsuura Y., Nevarez-Martinez M.O., Parrish R.H., Roy C., Serra R., Shust K.V., Ward M.N., Zuzunaga J.Z., 1999. Worldwide large-scale fluctuations of sardine and anchovy populations. *South African Journal of Marine Sciences* 21: 289-347.

SHALABY A.R., 1996. significance of biogenic amines to food safety and human health, , food research international, 29: 675-690.

SHEWAN J.M., 1977. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. *In: Sutcliffe P. & Disney J. (Eds.), Proceedings of the Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish. Tropical Products Institute, London.* pp. 51-66.

SIEGEL D.A., KINLAN B.P., GAYLORD B. ET GAINES, S.D., 2003. Lagrangian descriptions of marine larval dispersion. *Marine Ecology-Progress Series* 260, 83–96.

SILVA A., 2003. Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the north-eastern Atlantic and the western Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science* 60,1352-1360.

SIMEONIDOU, S., A. GOVARIS, AND K. VARELTZIS, 1997. Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*trachurus trachurus*) and mediterraneanhake (*merluccius mediterraneus*). *zeitschrift für lebensmitteluntersuchung und -forschung a* **204**(6): 405-410.

SOUALILI S, 1997. Exploitation de la sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) pêchée au chalut dans la Baie de Bousmail par l'analyse des cohortes. Mémoire d'ingénieur d'état en Biologie Marine. ISMAL. Alger. P64.

SUTRA L., FEDERIGHI M. & JOUVE J.L. 1998. Manuel de bactériologie alimentaire. *Polytechnica*, Paris.

T

TAYLOR S.L., KEEFE T.J., WINDHAM E.S. & HOWEL J.F., 1982. Outbreak of histamine poisoning associated with consumption of Swiss cheese. *Journal of Food Protection*, 45: 455-457.

U

URIARTE-MONOTOYAM.H.,VILLALBA-VILLALBAA.G.,PACHECO-AGUILAR*R.,RRAMIREZ-SUAREZJ.C.,LUGO-SANCHEZ M.E., GRACIA-SANCHEZ G.,CARVALLO-RUIZ M.G.,2010.changes in quality parametrs of montrey sardine (*sardinops sagax caerulea*) muscle during the canning process. *food chemistry*,2010,vol 122(3),p.482-487.

V

VECIANA-NOGUES M.T., MARINE-FONT A. & VIDAL-CAROU M.C., 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna: relationships with microbial counts, ATP related compounds, volatile amines and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6): 2036-2041.

VINCENOT F., SALEH M. & PREVOST G. 2008. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 407, 61-69.

W

WALBUM, 1792. Fiche de description de la sardine (*Sardina pilchardus*).

WANG B., PACE R.D., BOVELL-BENJAMIN A. & PHILLIPS B., 2002. Modified extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values in meat with increased specificity and simplicity. *Journal of Food Science*, 67:833-2836.

WEILL F.X. ,2009. *Salmonella*: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. Supplément au N°409, 25-35.

WOYEWODER A.D., SHAW S.J., & BURN B.G., 1986. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. *Canadian technical report of fisheries and aquatic Sciences*, N°1448.

Z

ZAMBONELLI A., D'AURELIO A.Z. SEVERI A., BENVENUTI E., MAGGI L., BIANCHI A., 2004. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *thymus vulgaris* L. *Journal of essential oil research*, vol.16, n° 1, p.p.69-74.

III. Effet de conservation

III. 2. Résultats de Test de conservation

Dans notre étude les échantillons de la sardine ont été conservés à +4°C, avec l'utilisation de l'extrait de Romarin à 0, 1% et l'acide citrique à 0.4% comme des agents conservateurs.

III.2.1. Qualité Sensorielle et Organoleptique

Pendant le stockage des prélèvements de sardine sont effectués en vue d'une évaluation sensorielle selon le barème de cotation de fraîcheur du poisson défini par le règlement du conseil N103/76/CEE afin de prendre en compte l'appréciation de l'altération de la sardine.

L'altération des lipides conduit, ainsi à une altération des propriétés technologiques et organoleptiques de la chair de poisson (couleur, odeur, texture), rendant ce dernier impropre à la consommation.

Afin de limiter ces altérations, on a souvent recours à la conservation par le froid ou à l'utilisation de divers conservateurs afin d'améliorer la durée de conservation des poissons tels que: l'extrait de romarin.

Au troisième jour de conservation J3 à 4C° la peau commence à se ternir, se dessécher et la chair perd légèrement son élasticité, la découpe des filets est facile, les mêmes observations pour le lot traité avec l'extrait du romarin plus présence d'une forte odeur du romarin.

Au sixième jour J6 quelque soit pour le lot non traité ou traité avec l'extrait de romarin la peau est desséchée et la chair est molle et pâteuse, une pression du doigt laisse un creux dans la chair. En effet l'odeur perçue s'intensifie et devient aigre et rance, les filets se détachent avec difficulté, il ya toujours présence d'une odeur du romarin mais avec une faible intensité.

Au dixième jour J10 de conservation, c'est l'avant dernier prélèvement on rapproche plus en plus à l'altération de notre produit, dans cette étape de changement des propriétés sensorielles on a observé une peau d'une couleur grise, avec une odeur désagréable, la chair a perdu son élasticité et son consistance, les petite morceaux du muscle sont très facile à découpé.

Au douzième jour J12 dernier jour de conservation pour tous les lots : la sardine est en stade d'altération, l'odeur est insupportable (odeur ammoniacale), la peau est totalement décolorée et la chair a perdu complètement son élasticité, les filets se détachent difficilement et une pression du doigt laisse un creux dans la chair ; la sardine est donc impropre à la consommation.

Cet additif a par ailleurs, un effet sur le goût et l'odeur de la sardine avec une amélioration prononcée de ces caractéristiques organoleptiques par le romarin

Et concernant le lot traité par l'acide citrique, nous avons remarqué les évolutions d'altération organoleptique de la chair de la sardine *Sardina pilchardus* comme ci-dessous :

Au troisième jour de conservation J3 à 4C° pour le lot non traité la peau commence à se ternir, se dessécher et la chair perd légèrement son élasticité, la découpe des filets est facile, le

même cheminement est observé concernant le lot traité avec l'acide citrique la peau commence à perdre sa brillance et la chair devient un peu souple et cireuse mais les filets sont coupés facilement, l'odeur est neutre.

Au sixième jour J6 quelque soit pour le lot non traité ou traité avec l'acide citrique la peau est desséchée et la chair est molle et pâteuse, une pression du doigt laisse un creux dans la chair. En effet l'odeur perçue s'intensifie et devient aigre et rance, les filets se détachent avec difficulté.

Au douzième jour J12 dernier jour de conservation pour les deux lots : la sardine est en stade d'altération, l'odeur est insupportable (odeur ammoniacale), la peau est totalement décolorée et la chair a perdu complètement son élasticité, les filets se détachent difficilement et une pression du doigt laisse un creux dans la chair ; la sardine est donc impropre à la consommation.

Les changements des caractéristiques organoleptiques sont présents dans les différents lots réfrigérés Il n'y a donc pas d'effet de réfrigération ni de traitement sur la texture et la couleur par ailleurs, il ya une amélioration d'odeur pour le lot traité avec l'extrait de romarin.

L'altération résultant davantage de la diffusion des bactéries de la cavité abdominales et des branchies plutôt que de celles de la peau, la vitesse d'altération est liée à la nature de ces bactéries et à la spécificité des matrices.

Le poisson s'altère à des vitesses très variables. Certains auteurs expliquent ce fait par des différences dans les propriétés de la surface du poisson. Les peaux des poissons ont des textures très différentes.

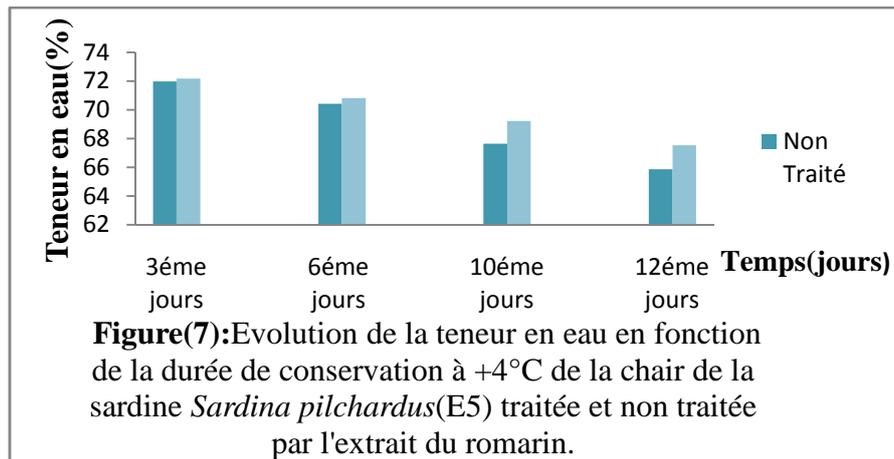
D'une façon générale nous pouvons conclure d'après cette analyse sensorielle que :

- l'additif romarin (*Rosmarinus officinalis*), n'a pas un effet sur l'amélioration de la texture et de la couleur de la sardine, de même l'acide citrique n'a pas un effet sur la qualité sensorielle.

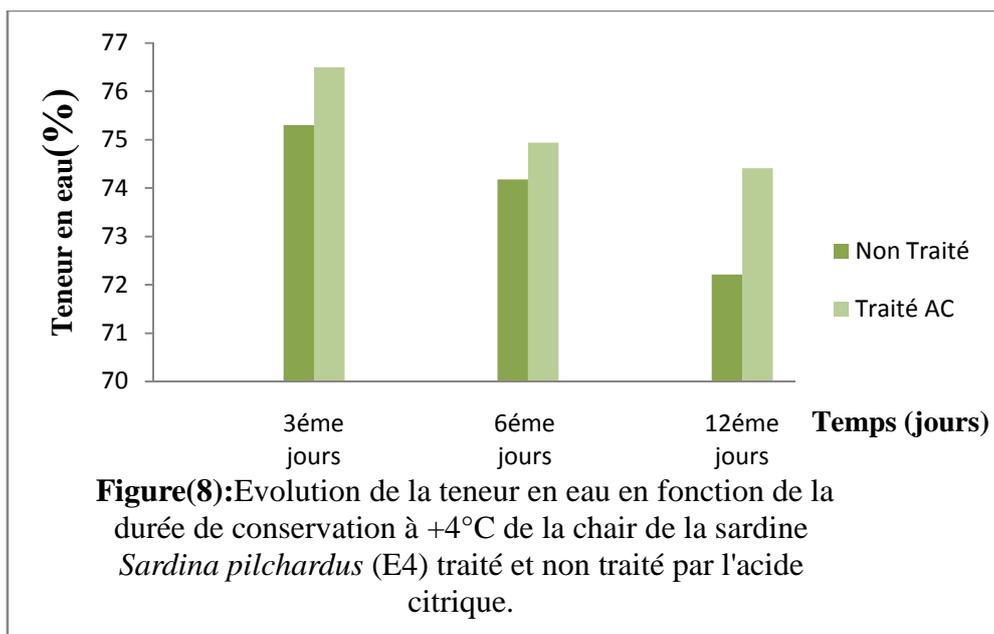
III.2.2. Analyses Physico-chimiques

➤ Teneur en eau

Nous constatons que les teneurs moyennes en H₂O après 12 jours de conservation à +4C° pour l'échantillon E5, traité et non traité figure (7) sont respectivement de l'ordre de 69,28. et 68,67 % correspondant à une réduction de 6,42% contre 8,5 % respectivement. Ceci signifie que l'ajout de l'extrait de romarin a permis une conservation de la teneur en eau d'environ 2 % par rapport au témoin.



Les résultats du suivi de l'évolution de la teneur en eau chez la sardine pour l'échantillon 4 traité avec l'acide citrique sont représentés dans la figure (8). Nous constatons que les teneurs moyennes en H₂O après 12 jours de conservation à +4°C, traité et non traité sont respectivement de l'ordre de 72,21% et 74,41% correspondant à une réduction de 7,2 »% contre 10,03 % respectivement. Ceci implique que l'addition de l'extrait de romarin a permis une conservation de la teneur en eau d'environ 3 % par rapport au témoin



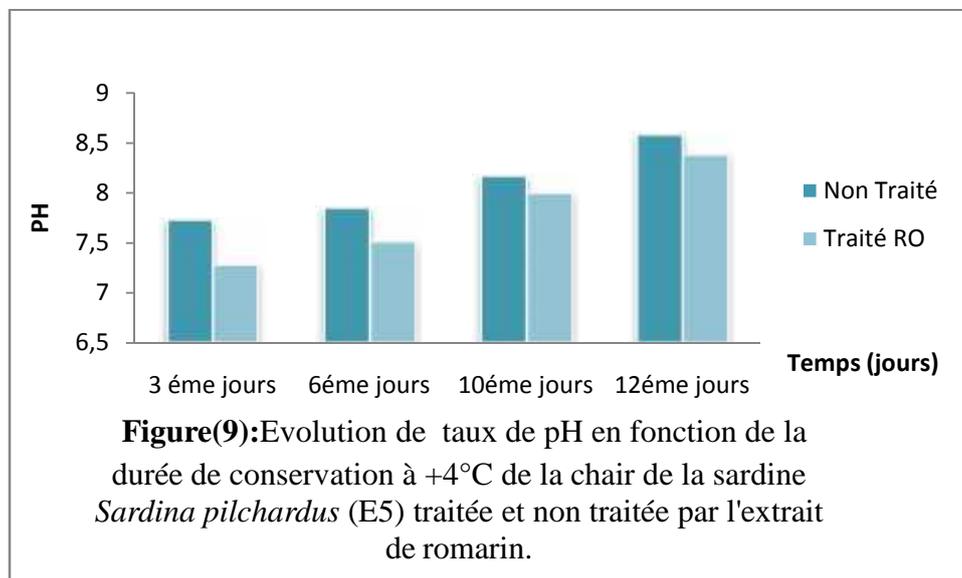
Quel que soit le stockage à température réfrigéré ou bien application de traitement il ya une baisse en teneur en eau une faible perte en eau probablement due au fait que les membranes cytoplasmiques du tissu des poissons perdent leur rôle de barrière. De ce fait, l'accroissement de la concentration des solutés dans l'espace extracellulaire provoque la sortie de l'eau (osmose) puis son évaporation (Eymard, 2003). La capacité de rétention de l'eau est liée également à la capacité des protéines myofibrillaires à conserver leur liaison avec l'H₂O (Savage et al, 1990 ; Bremner, 2002)

De plus les poissons gras présentent une forte proportion de muscle brun. Or ce dernier peut rétrécir jusqu'à 52% alors que le muscle blanc ne perd que 15% de sa longueur (Penfield et Campbell, 1990).

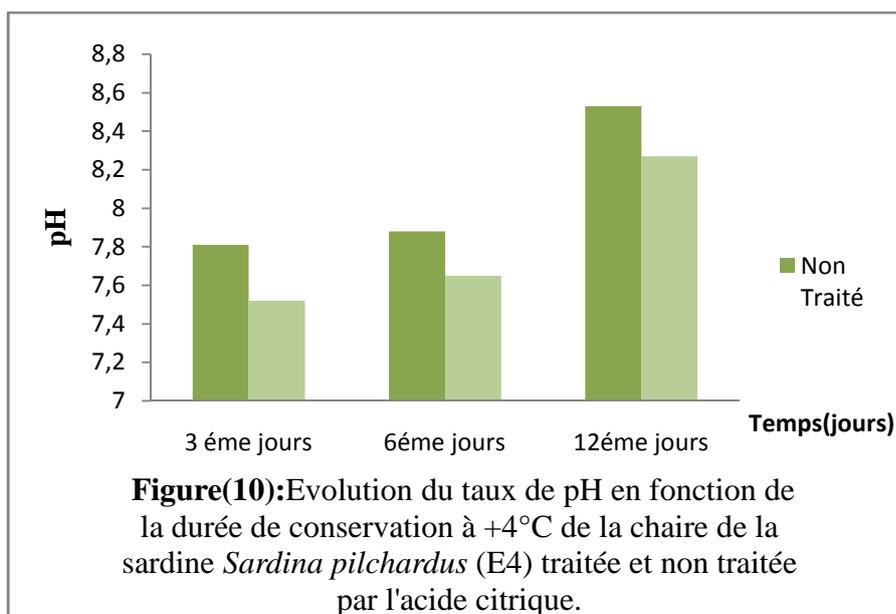
➤ pH

La valeur de pH dans le lot traité par l'extrait de romarin reste ordinaire qui varie de 7,2 à 8,3, une augmentation significative et considérable même remarquable d'une façon continue au cours du (temps) ou des jours des prélèvements est observé dans les deux lots traité et non traité

D'après la figure (9), on remarque que le pH des lots ne cesse d'augmenter durant la conservation des différents échantillons mais il ya une différence significative entre les lots traités et non traités.



D'après la figure (10) ci-dessous, La valeur de pH dans le lot traité par l'acide citrique reste ordinaire qui varie de 7,2 à 8,3, une augmentation significative et continuelle a été observée pendant la durée de conservation dans les deux lots traité et non traité.



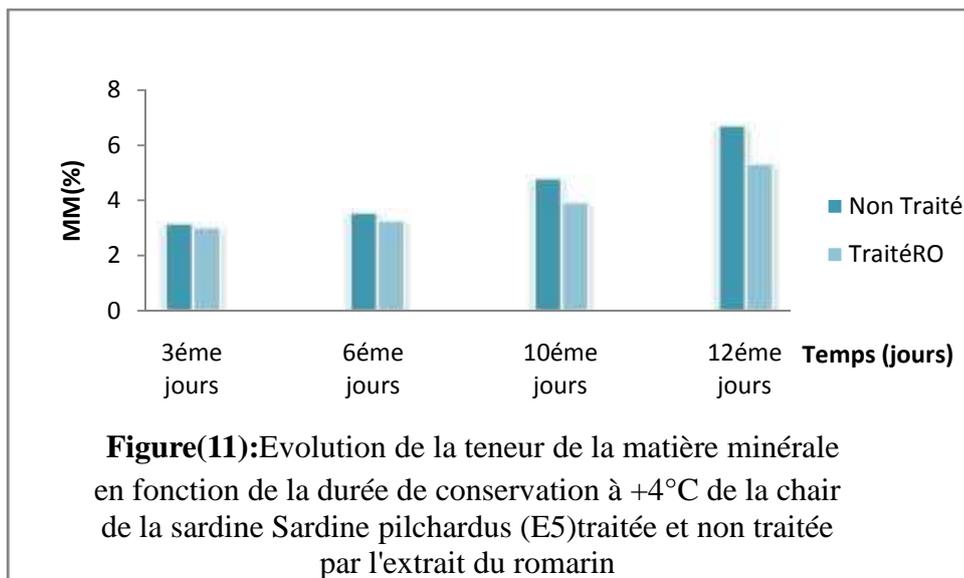
L'augmentation du PH mesurée chez la sardine s'explique probablement par la production de bases volatiles (NH₃ L'ammoniac, la diméthylamine DMA, la triméthylamine TMA) et par l'accumulation de peptides et d'amines dans le muscle (EL Marrakchi et *al.* 1990).

Un pH proche de 7,0 favorise le développement bactérien et augmente l'activité enzymatique. Un pH moyen supérieur à 7,5 indique pour la plupart des espèces, un poisson devient inconsommable (Soudan *et al.*, 1965). Cependant, les variations sont telles que l'exploitation de ce paramètre n'est pas généralisé pour suivre l'altération du poisson.

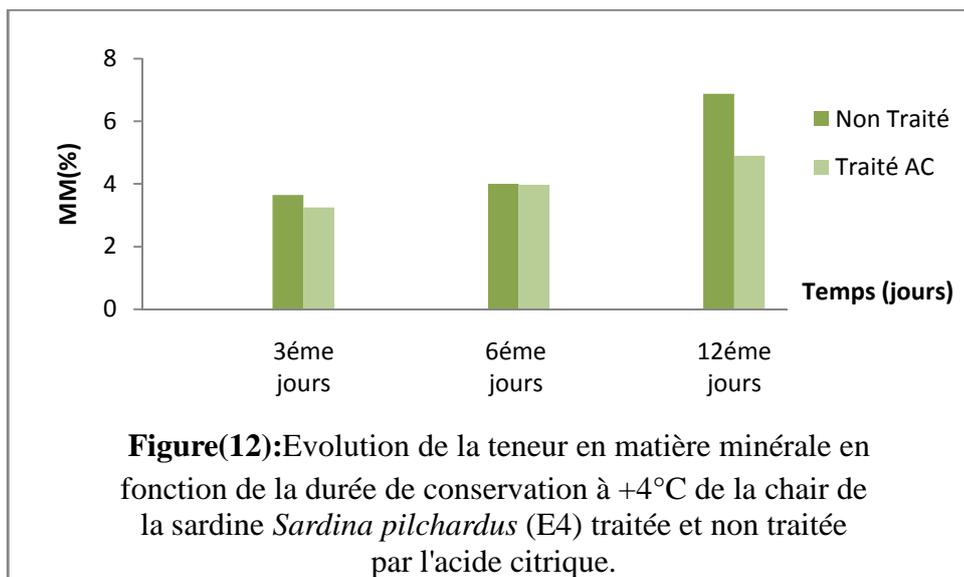
D'après la FAO (1988), le pH final d'un produit post mortem est plus élevé, ce qui rend la chair plus vulnérable à l'attaque microbienne. De cela on peut dire que la réfrigération plus un conservateur est une méthode de conservation meilleure que la réfrigération seule.

➤ Matière minéral

Au cours de la conservation de la sardine traitée par l'extrait de romarin(fig11), la teneur de la matière minérale varie de 2,9à 5,3% par rapport aux valeurs de lot témoin non traité qui augmente avec la durée de conservation et varie de manière significative de 3,0à 6,7.



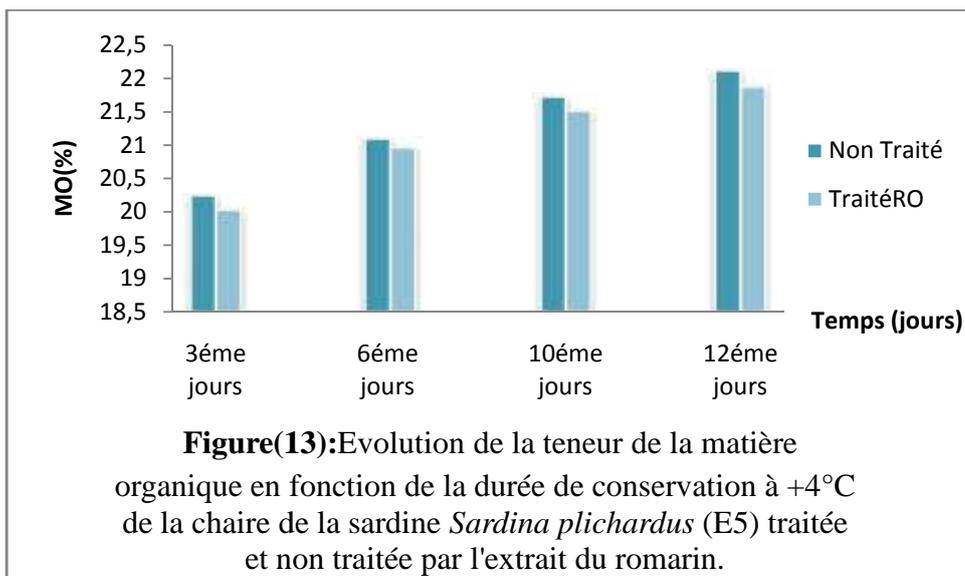
Au cours de la conservation de la sardine traitée par l'acide citrique, la teneur en matière minérale varie de 3,2 à j₀ à 4,9 g /100g à j₁₂ comparativement du lot non traité de 3,65g jusqu'à 6,88 g /100g.fig.12



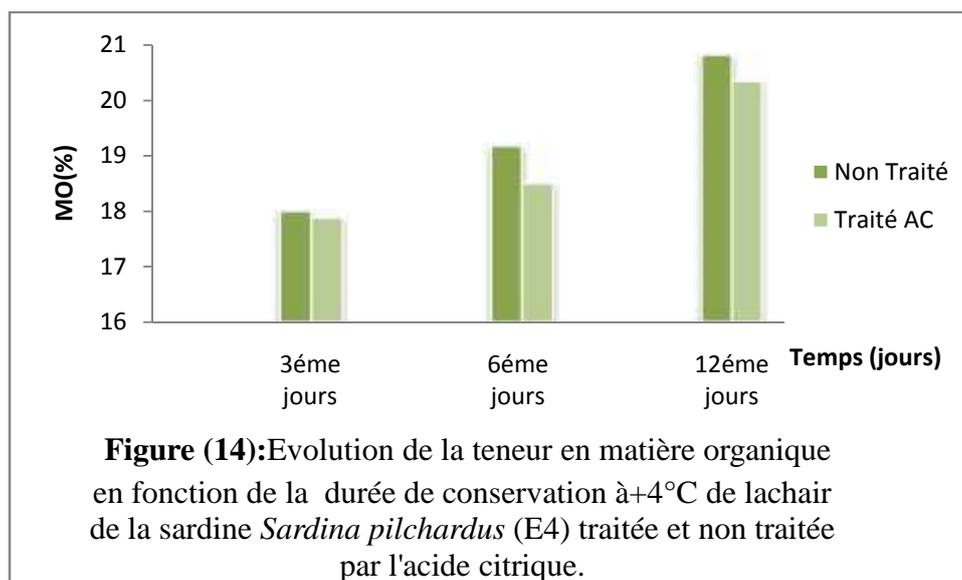
Une augmentation des teneurs en matière minérale implique automatiquement une baisse en matière organique conduisant à une diminution de la qualité du produit.

➤ Matière organique

Au vu des résultats concernant la MO, on peut remarquer que les valeurs augmentent au cours de la conservation pour l'ensemble des lots traités par l'extrait de romarin ou non traité restent largement en deçà des normes fixées par les organismes internationaux. Par conséquent, ce conservateur est déclaré de bonne efficacité.fig.13



De même on peut remarquer que les valeurs de la MO augmentent au cours de la conservation pour l'ensemble des lots traités par l'acide citrique ou non traité.



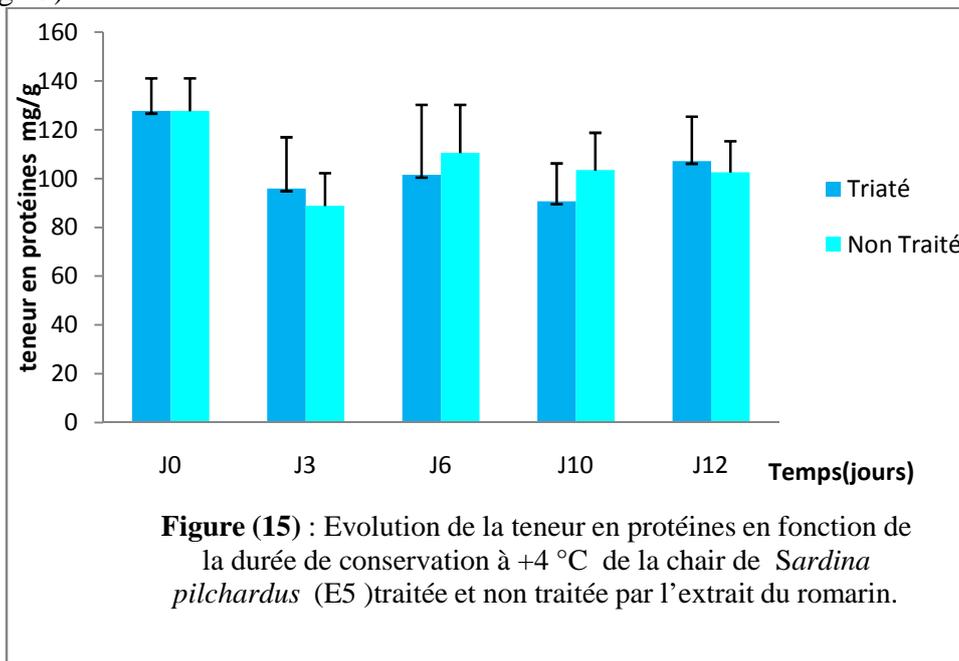
III.2.3. Paramètres d'altération et effet de conservateur

III.2.3.1. Analyses Biochimiques

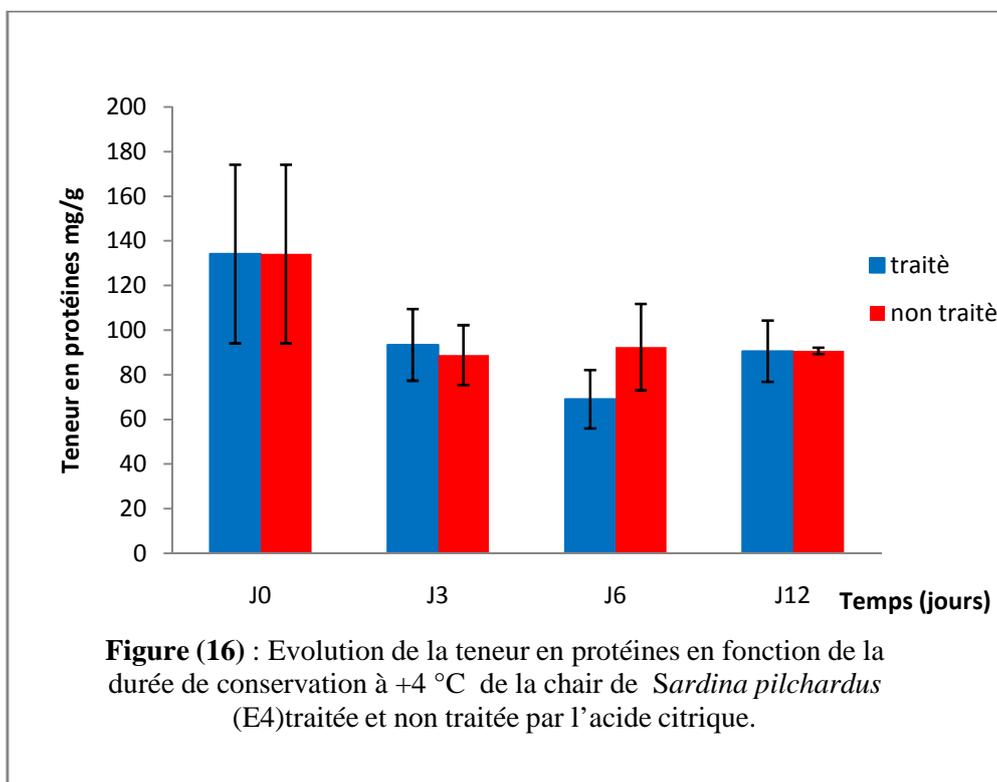
➤ Dosage des Protéines

Au cours de la durée de conservation à +4 °C de la chair non traitée de *Sardina pilchardus*, nous avons remarqué une légère diminution de la teneur en protéines par rapport à T₀ mais qui reste non significative.

La chair traitée par l'extrait de romarin a montré une stabilité relative dans la teneur en protéines avec une différence non significative entre les différents prélèvements traités et non traités (fig.15).



Concernant l'échantillon E4, la teneur en protéines à t_0 avait une valeur de $134,19 \pm 40,03$; une diminution a été enregistrée dans le lot traité et non traité à partir du j6 avec une différence non significative entre j3, j6 et j12. Le lot traité a accusé une décroissance significative entre j0 et j6, une légère augmentation à j12 a été également enregistrée mais qui reste non significative par rapport à j6 fig. (16).

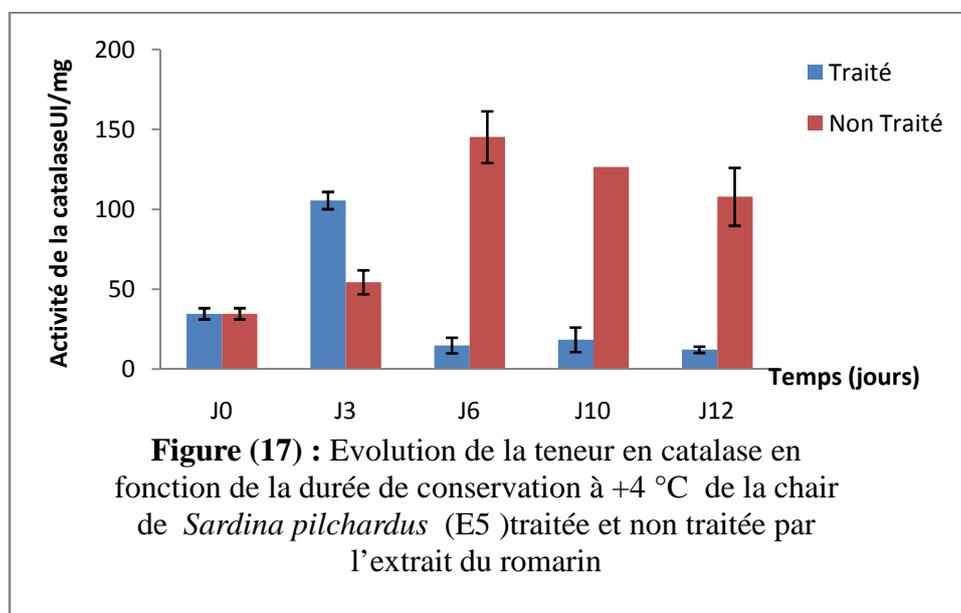


On observe une diminution de la qualité biochimique et des réserves énergétiques traduite par la décroissance des teneurs en protéines mesurées le long de la durée de conservation et ceci par les principales voies d'altération de la chair L'hydrolyse et l'oxydation. La stabilité du muscle vis-à-vis de l'oxydation dépend de la localisation, de la composition, de la concentration et de la réactivité de trois facteurs : les substrats et les catalyseurs de l'oxydation évaluée dans notre étude par le dosage de la catalase et les antioxydants telle que l'acide citrique et les extraits des plantes (Decker et Xu, 1998). Par ailleurs, nous avons constaté que l'utilisation de l'extrait du romarin comme conservateur de la chair de sardine à 4°C a donné un meilleur résultat par rapport à la stabilité de la teneur en protéine, en comparaison avec le conservateur fréquemment utilisé, l'acide citrique.

➤ Dosage de catalase

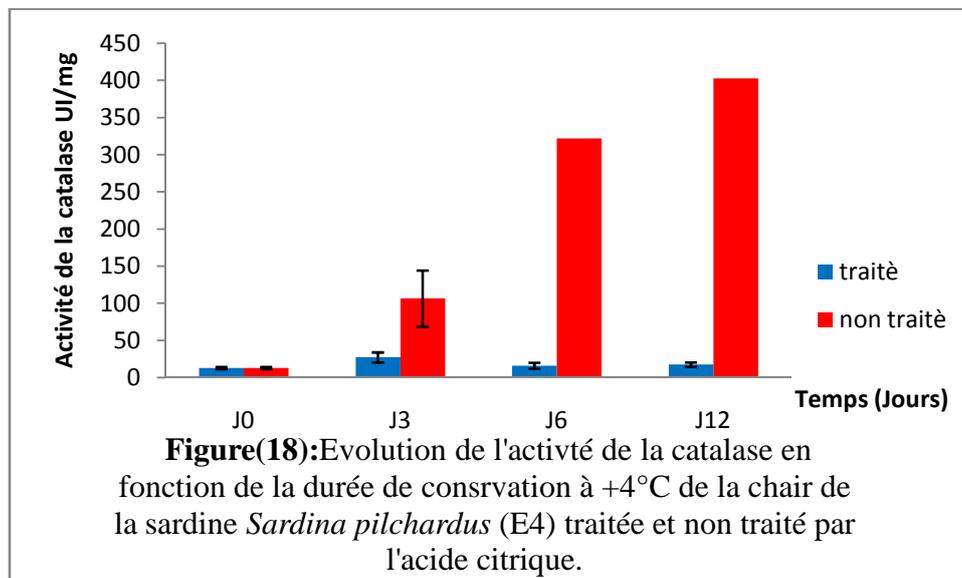
Durant la période de conservation de la sardine *sardina pilchardus* par l'extrait de romarin, une baisse remarquable et très significative de l'activité catalytique de l'enzyme antioxydante Catalase à partir de j6 ($14.74 \pm 4,87 \text{ UI/mg}$). Par contre le lot témoin a accusé une augmentation importante de l'activité de catalase pendant toute la période de conservation (entre $145,22 \pm 16,20 \text{ UI/mg}$ et $107,87 \pm 18,12 \text{ UI/mg}$) par rapport à t_0 ($34,67 \pm 3,49 \text{ UI/mg}$).

Ces résultats montrent l'existence d'un stress oxydant au niveau de la sardine à j3 qui pourra être lié entre autres à une altération causée par la lipolyse et la neutralisation des radicaux libres. L'extrait du romarin semble avoir un effet ralentisseur par rapport à l'activité de la catalase.



Le suivi la variation de l'activité catalase au niveau de la chair de sardine au cours de l'expérimentation par l'acide citrique a révélé un effet inhibiteur significatif de celui-ci où

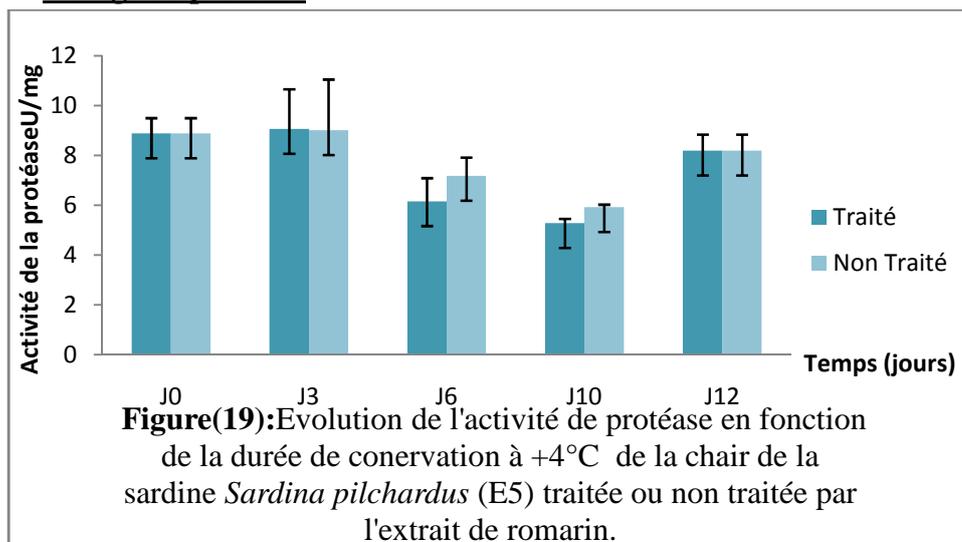
les valeurs mesurées au dernier jour sont proche des valeurs initiales à j0, on ne relevait une très faible activité de la CAT durant tout la période de conservation. (fig.18)



Il est admis que les inductions CAT sont proportionnelles à la formation des radicaux libres issus de l'oxydation des lipides de la paroi cellulaire suite à la dénaturation de la chair des produits de la mer. La catalase est un composant antioxydant primaire de la défense. Elle élimine le peroxyde d'hydrogène, espèce réactive non-radicalaire de l'oxygène, qui peut pénétrer par toutes les membranes biologiques et directement inactiver quelques enzymes. Cette activité pourra être induite en fonction de plusieurs paramètres, notamment l'espèce, la nature ou la concentration du contaminant (Regoli, 2006).

Ces modifications concernent les fractions lipidiques et protéiques du poisson. Les principales transformations de la fraction grasse concernent la lipolyse et l'oxydation susceptibles de provoquer une aversion pour le consommateur. (Simeonido *et al.*, 1997). La chair de poisson riche en acides gras poly insaturés est très sensible aux phénomènes d'autoxydation (ou encore peroxydation). Les réserves lipidiques des poissons varient dans les tissus selon l'âge, l'état physiologique, la saison et l'espèce. Ces dépôts lipidiques sont directement impliqués dans la stabilité *post-mortem* de la chair telle que la peroxydation des lipides (Stéphan *et al.*, 1995).

➤ Dosage de protéase

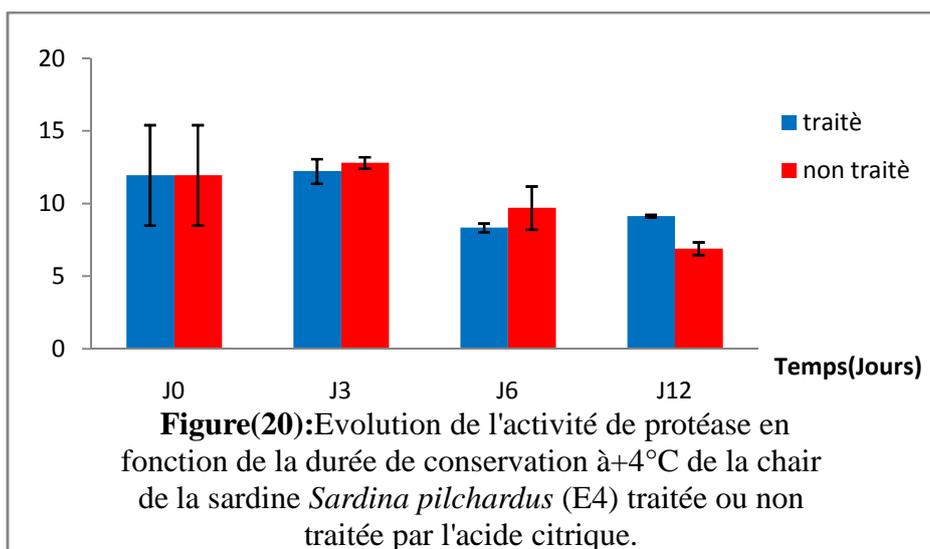


Le suivi de l'activité de l'enzyme protéase pendant la durée de conservation a montré une diminution pour les prélèvements j6 et j10 de lot traité par l'extrait de romarin suivi par une reprise de l'activité protéolytique à j12 et aucune différence significative n'a été enregistrée entre les deux lots traités et témoin à j0 et à j3.

L'activité de la protéase est plus au moins stable, pas d'altération protéolytique confirmée en ce référant aux dosages des protéines.

Dans un travail antérieur sur l'utilisation des biomarqueurs de stress comme indicateur de la qualité de la sardine dans le même laboratoire, il a été démontré que l'organe responsable de l'altération protéolytique est l'intestin où l'éclatement de l'abdomen qui est à l'origine à la libération des enzymes d'altération pour la chair des produits de la pêche. (Naili et Naili, 2015),

Concernant l'échantillon E4 traité par l'acide citrique et d'après la figure (20), on observe une légère élévation de l'activité enzymatique de la protéase à j3 dans le lot traité, par la suite, l'enzyme protéase a montré une diminution progressive de son activité à j6 jusqu'à j12. Par ailleurs, l'activité de la protéase mesurée du lot non traité a suivi la même évolution sauf avec des teneurs plus élevées. Ainsi, l'acide citrique semble avoir un effet inhibiteur sur les protéases.



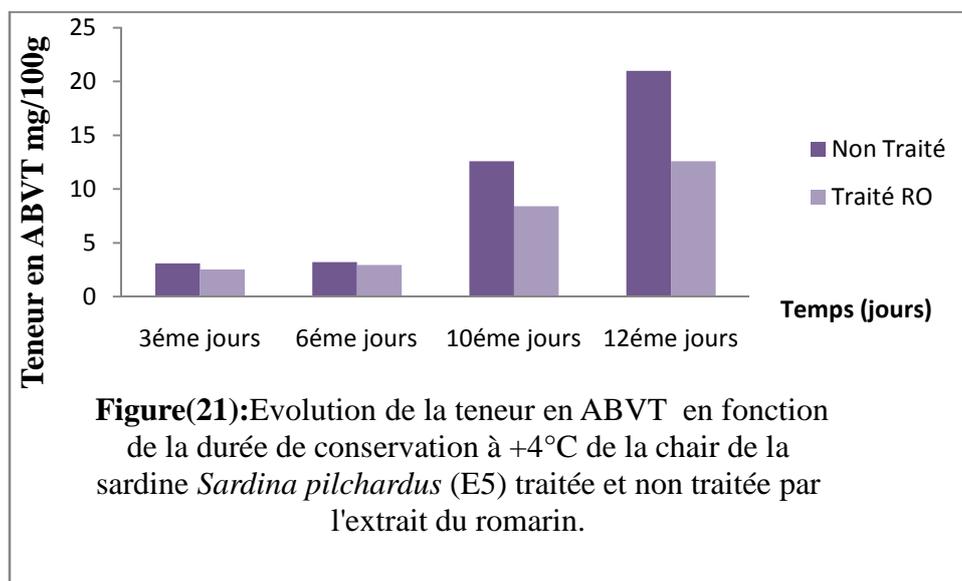
Les principales protéases, les enzymes lysosomales, les calpaine et les cathépsines D (Hurley *et al.*, 2000) jouent un rôle important dans l'évolution dans la qualité post-mortem du poisson.

L'effet des enzymes protéolytiques dans la chair de poisson contribue à dégrader les tissus conduisant au ramollissement du muscle. L'activité de ces enzymes est contrôlée par les inhibiteurs spécifiques et endogènes, par les cofacteurs, par le pH et la température de l'environnement. De plus l'activité protéolytique varie énormément selon les espèces, le sexe, la saison de pêche, la maturité sexuelle et d'autres variables (Jiang, 2000).

III.2.4. Analyses Toxicologiques

L'augmentation de la teneur en lipides dans les aliments entraîne une augmentation des lipides de la chair en relation avec une diminution de la teneur en eau en particulier chez les espèces stockant une proportion importante de lipides dans le muscle (Watanabe, 1982). La dégradation de la chair (également lors de la conservation) peut être évaluée par le degré d'oxydation des lipides mesuré par la quantité de composés carbonyles sensibles à l'acide thiobarbiturique (SRA TB, Substances Réagissant avec l'Acide ThioBarbiturique) ou encore par la mesure et le classement des composés volatils (Olafsdottir et Fleurence, 1997).

➤ **Dosage de l'azote basique volatil total(ABVT)**



Les résultats du suivi de l'évolution de la teneur en ABVT dans la sardine conservée par l'extrait de romarin, et à 4°C (fig.21), Une augmentation progressive a été observé à partir du j10 dans le lot traité et non traité. Cette teneur atteint une valeur maximale de 12,6 mg/100g. Dans la chair de la sardine traitée par contre elle atteint 21,00 mg/100g d'où l'effet bénéfique de la conservation par l'extrait du romarin dans la qualité organoleptique de la sardine.

Les sources de variation de la teneur en ABVT sont multiples et agissent à différents niveaux. Certains facteurs influent sur la quantité de précurseurs des amines volatiles (notamment sur l'oxyde de triméthylamine OTMA) initialement présents tandis que d'autres influencent la réaction de formation de ces amines.

Les valeurs maximales d'ABVT relevées, durant le cycle de conservation, restent cependant en dessous des limites de rejet.

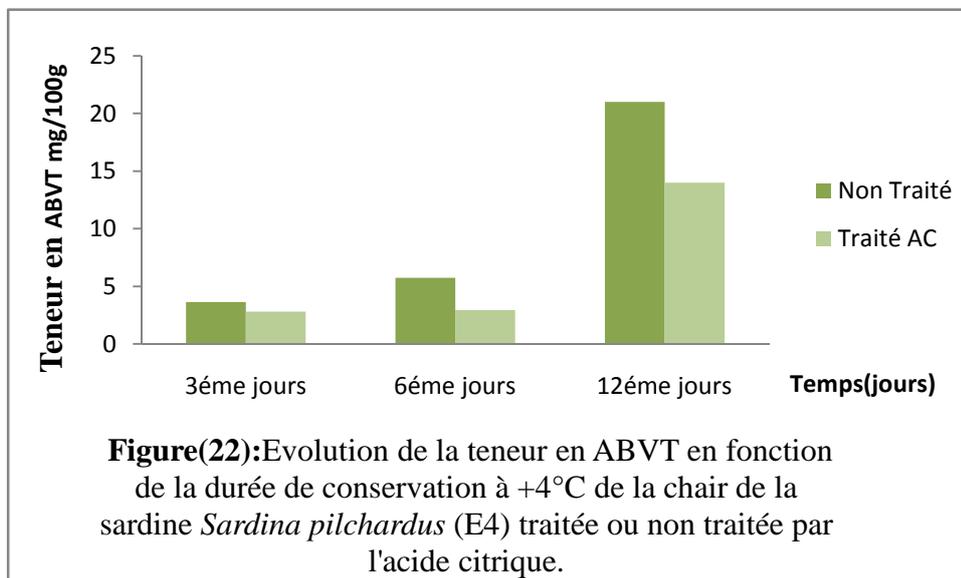
L'augmentation de l'ABVT peut être corrélée positivement à l'augmentation du pH qui a dépassé la valeur de 8 à partir 10ème jours.

Toutefois, l'ajout d'un antioxydant peut offrir une protection suffisante. Vu les valeurs élevées de l'ABVT des témoins par rapport aux échantillons traités avec l'extrait de romarin. **Sanchez-Escalante et al. (2001)** ont signalé l'effet protecteur des extraits de romarin sur l'oxydation des lipides des produits d'origine animale.

Effet de l'acide citrique

De même, l'acide citrique a diminué les taux de l'ABVT en comparaisant de témoin de l'échantillon 4 de environ 1/3 où la valeur maximale ne dépassant pas 14 mg/n comparaison qui atteint 21mg/100g.

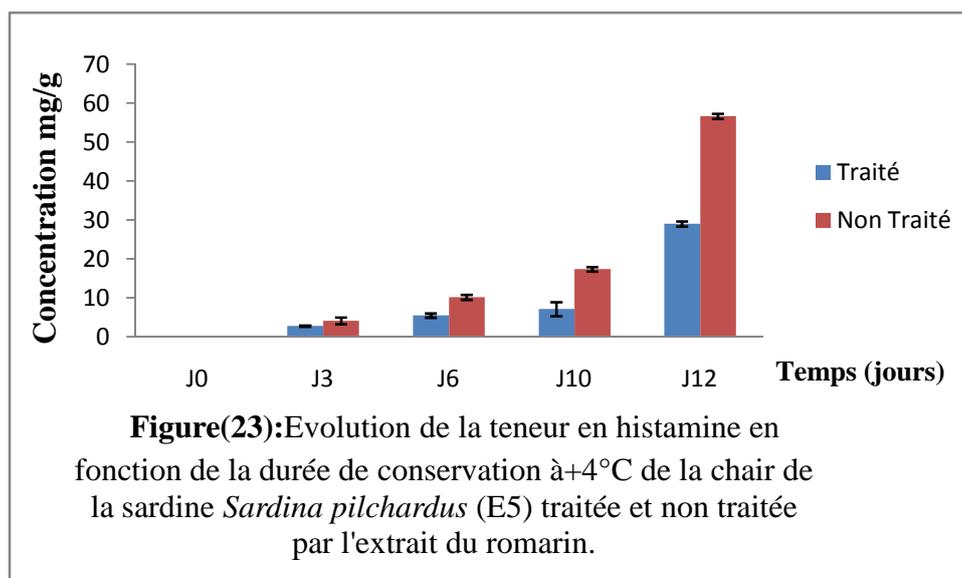
Les valeurs maximales d'ABVT relevées, durant le cycle de conservation, restent cependant en dessous des limites de rejet, L'ABVT a peu évolué durant le stockage, il a été principalement formé par la désamination d'acides aminés.



➤ Dosage de l'histamine

D'après les résultats obtenus sur le dosage de la teneur en histamine, et sous l'effet de l'extrait de romarin (figure23) nous avons constaté la production de l'histamine dans la chair de sardine et l'augmentation de sa teneur de manière continue pendant la période de conservation de mg/g 0 à j₀ jusqu'à 56,65 mg/g à j₁₂.

L'ajout du romarin a entraîné une diminution des taux de l'histamine au cours de la conservation à 4°C où la valeur maximale à j₁₂ n'a pas dépassé 29 mg/g. Cependant ces valeurs indiquent que la sardine est altérée et devenue impropre à la consommation.



Les amines biogène l'histamine proviennent essentiellement de la décarboxylation de l'histidine par des enzymes microbiennes (Santos, 1996; Bonnin-Jusserand, 2011; FAO/OMC, 2011). Ces molécules sont considérées comme des traceurs de la dégradation des protéines, et traduisent la fraîcheur des aliments. (Chaabouni, 2011).

La formation d'amines dépend des conditions du milieu (Bach, 2011). La température idéale est comprise entre 26 et 37°C. Le pH optimal pour les bactéries est situé dans un milieu acide, légèrement acide à basique pour les tissus (Bonnin-Jusserand, 2011).

L'histamine est produite, plus particulièrement, dans les muscles des poissons qui contiennent des taux d'histidine naturellement élevés, notamment les scombridés et certains clupéidés (dont la sardine commune *Sardina pilchardus*). Au niveau Européen, C'est le règlement CE n°2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires qui définit les limites de concentration à ne pas dépasser pour l'histamine. la teneur moyenne ne doit pas dépasser 200mg d'histamine/kg où :

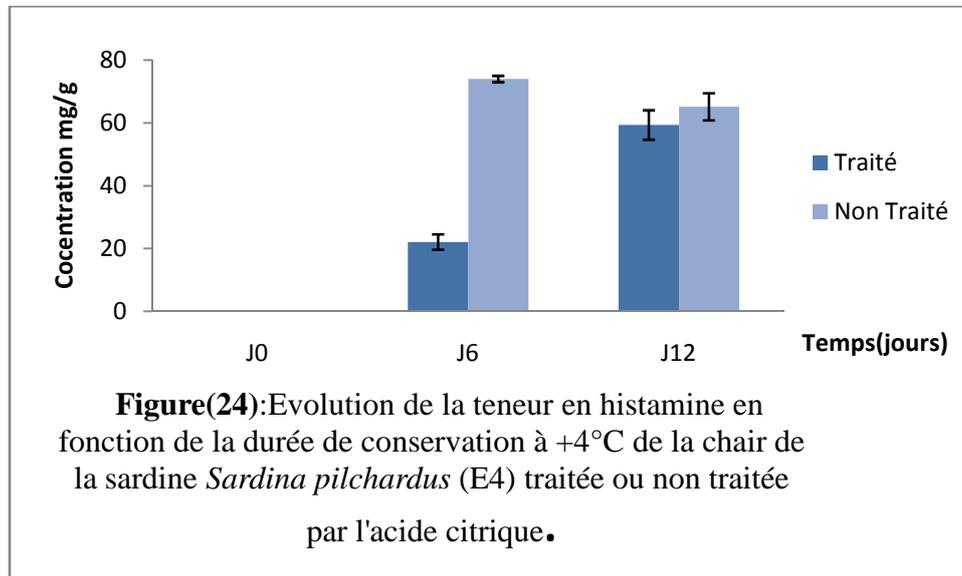
-) Deux échantillons peuvent dépasser 200mg d'histamine /kg sans atteindre 400mg/kg.
-) Aucun échantillon ne doit dépasser 400mg d'histamine/kg.
-) Qualité non satisfaisante : si au moins un des trois critères précédents n'est pas rempli.

Les normes du Codex Alimentarius ont une approche différente et fixent deux seuils :

-) -le premier est un seuil de qualité, indicateur d'altération du produit =100mg/kg.
-) -le second est un critère de santé publique qui ne doit pas être dépassé=200mg/kg.

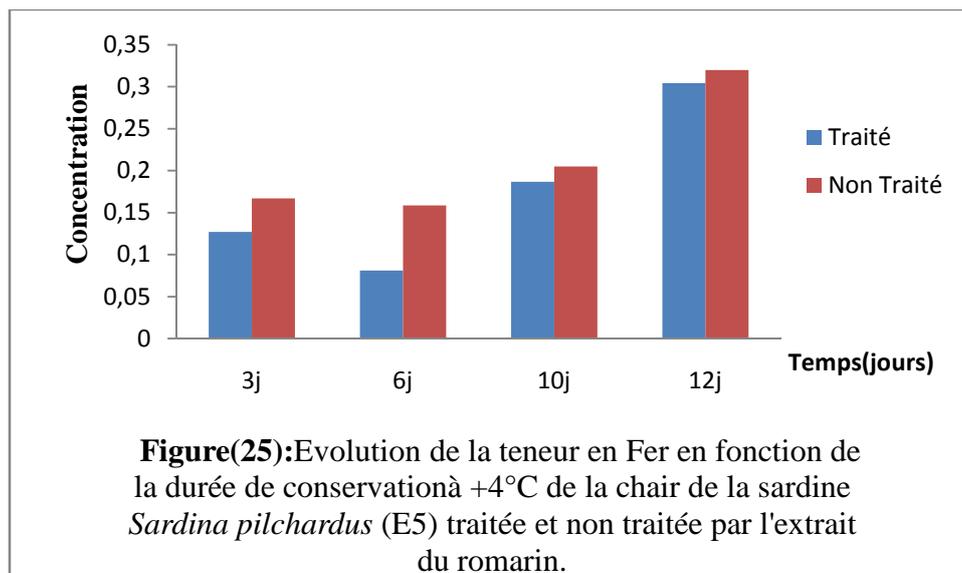
Les amines biogènes sont des substances physiologiquement actives qui exercent une fonction importante dans le corps, mais qui peuvent aussi, à hautes doses, avoir des effets nuisibles pour la santé voire toxiques (Bach, 2011; Chabouni, 2011). Toutes ces molécules sont toxiques à des degrés divers et sont la deuxième cause d'intoxications alimentaires en Europe (Bonnin-Jusserand, 2011),

L'histamine peut être considérée toxique, Le seuil de tolérance pour l'histamine est d'environ 100 mg/kg, les écarts pouvant être très importants selon les personnes. C'est pourquoi on différencie entre intolérance à l'histamine et intoxications graves à l'histamine par rapport aux problèmes de santé engendrés: Intolérance à l'histamine (Duflos, 2009 ; Shalaby, 1996).



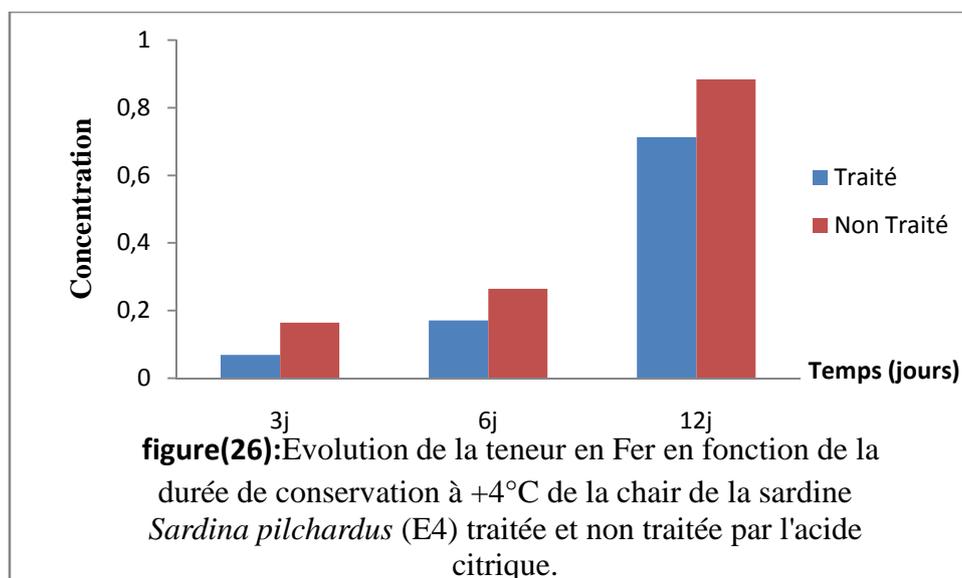
➤ Dosage de Fer hémique

La figure (25) ci dessous présente la variation des teneurs de Fer en fonction de la durée de conservation à + 4C° pour l'échantillon 5.



Les résultats obtenus par ce dosage ont montré une augmentation remarquable non traité 0,33 au j₁₂ et traité 0,30.

D'après la figure (26) nous remarquons qu'il ya une augmentation continue au cours de la période de conservation pour le lot traité et non traité respectivement de l'ordre 0,69 à 0,71 et entre 0,16 et 0,88.



L'augmentation de la teneur en fer traduit la détérioration de la qualité de la chair.

III.2.5. Analyses Bactériologiques

Les échantillons de conservations :

➤ La flore psychrophile

) L'ensemble des résultats des échantillons qui ont subi une conservation quel que soit le conservateur l'acide citrique ou bien l'extrait de romarin obtenu à une température de réfrigération à 4°C° montrent une absence totale de la flore psychrophile pour la chair de la sardine.

➤ **La flore aérobie mésophile totale** : présence de la flore aérobie mésophiles totale FAMT de la sardine conservée à 4°C°

Tableau (9) : résultats de la lyse bactérienne dans les différents échantillons en fonction du temps de conservation sur milieu Gélose-Gélatine.

Jours	Gélose-Gélatine		Gélose-Gélatine	
	Témoin E5	Traité RO	Témoin E4	Traité RO
3 ^{ème}	Absence	absence	absence	Absence
6 ^{ème}	Absence	absence	Présence	Absence
10 ^{ème}	présence	absence	-	-
12 ^{ème}	présence	absence	présence	Présence

Absence=pas de lyse bactérienne, **présence**= y a de lyse bactérienne

D'après les résultats qu'on a obtenus sur l'application de la gélatine sur la gélose nutritive on a observé la présence de lyse bactérienne surtout chez le lot témoin non traité à 30 °C au 6^{eme} jour de conservation.

Par ailleurs, une absence totale de la lyse bactérienne a été constatée chez la sardine traitée par l'acide citrique pendant toute la durée de conservation.

Chez la sardine traitée par l'extrait de romarin a également donné le même résultat, absence de lyse bactérienne au cours jusqu'au dernier prélèvement.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons traité des informations importantes sur l'évolution des paramètres sensorielles, physicochimiques, microbiologiques, biochimiques et toxicologiques intervenant lors de la conservation de la sardine (*sardina pilchardus*) à +4°C pendant une durée de 12 jours.

Le poisson est un système dynamique dans lequel des changements dans le pH, la composition nutritive et la microflore se produisent au fil du temps. La croissance et le métabolisme de microorganismes sont les éléments impliqués dans la manifestation de l'altération sensorielle du produit, le rendant peu convenable pour la consommation humaine.

L'installation de microorganismes accélère la dégradation du poisson et Les conditions de manutention post-mortem influencent directement la fraîcheur du produit (Burgueno, 2000). Les modifications sensorielles affectent l'apparence, la texture, l'odeur et la saveur (Adolphe, 2006). Ces dernières s'installent très rapidement après la *rigor-mortis*.

Notre étude a été menée sur une sardine capturée dans la baie de Bousmail dont la fraîcheur a été vérifiée. Une note de 1,5 a été obtenue lors de l'évaluation organoleptique des échantillons de sardines acheminés au laboratoire dans des glacières. En outre, les analyses physicochimiques (teneur en eau, pH, matières minérale et organique) ont donné des résultats acceptables et conformes aux normes de JORA (1998).

Le suivi de l'évolution de l'altération de la sardine conservée à 4°C a révélé que :

- L'activité des protéases est plus au moins stable dans la chair de la sardine, elle n'est pas responsable de l'activité protéolytique.
- L'estimation de la flore des mésophiles aérobies totaux et les coliformes totaux et fécaux nous renseignent sur l'état hygiénique de l'échantillon. La recherche de germes pathogènes dans nos échantillons nous a révélé leur absence totale correspondant à une bonne qualité microbiologique.
- L'ajout des conservateurs a provoqué un ralentissement de la dégradation autolytique, de l'hydrolyse, de la production de l'histamine, la modification du profil protéique et l'altération microbiologique.
- La production de l'histamine a été évoluée durant la période de conservation de façon continue. En effet, l'histamine n'est produite qu'à partir du système enzymatique de microorganismes par la décarboxylation des acides aminés libres précurseurs.
- les valeurs maximales de l'Azote basique volatil total enregistrées était de l'ordre de 21mg/100g au 12^{ème} jour mais elles restent cependant, en dessous des limites de rejet. une augmentation (entre 145,22±16,20UI/mg et (107,87±18,12UI/mg) qui est proportionnelles à la formation des radicaux libres issus de l'oxydation des lipides de la paroi cellulaire suite à la dénaturation de la chaire des produits de la mer, de même la teneur en fer augmente jusqu'à 0,3 au 12^{ème} jour.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que :

- La sardine réfrigérée conserve une meilleure qualité organoleptique et nutritionnelle lorsqu'elle est conservée étêtée et éviscérée par l'addition des conservateurs chimiques ou naturels comme l'extrait des plantes utilisées dans les plats culinaires.
- Les amines biogènes, sont des indicateurs de la présence de bactéries altérantes productrices d'H₂S, TMA et ammoniac. En conséquence, elles peuvent être utilisées dans certains cas comme indicateurs de la qualité.
- Et que l'extrait de romarin semble être plus approprié comme agent naturel dans la préservation de la qualité des produits de la pêche. Cependant L'utilisation de l'acide citrique a un effet inhibiteur pour l'activité de l'enzyme antioxydant, la catalase.

Il serait intéressant de continuer ces travaux notamment sur :

- Application d'autres agents conservateurs tels que l'acide ascorbique, le thym, l'origan et le laurier.
- Il est très souhaitable que cette étude soit faite en appliquant les conservateurs à des concentrations croissantes durant le stockage.

ANNEXE 1

Matériel du laboratoire

- Glacière
- Réfrigérateur
- Etuve
- Four à mufle
- Distillateur
- pH mètre
- Mixeur
- Bain marie
- Spectrophotomètre
- Centrifugeuse
- Boite de pétrie
- Pipette
- Malaxeur Blider
- Trousse de dissection
- Une balance de précision
- Verrerie (fioles, entonnoirs, des béchers)
- Papier filtre

Barème de cotation chiffré

CARACTÈRES OBSERVÉS SUR LE POISSON		COTATION						
		0	1	2	3	4	5	6
PEAU	I - MUCUS	transparent		laiteux	opaque	grumeleux	jaune épais	
	II - PIGMENTATION	irisée	couleurs chatoyantes	couleurs vives	couleurs ternies	terne	décolorée	grisâtre
ŒIL	III - TEINTE	pupille noire brillante cornée transparente		pupille plus terne à prise cornée opalescente			pupille blanchâtre cornée laiteuse	
	IV - AFFAISSEMENT	bombe		un peu affaissé	plat	concave au centre	très concave	
BRANCHIES	V - TEINTE	colorée brillante pas de mucus		moins colorée, mate	se décolorent	jaunâtre	grisâtre mucus laiteux	
	VI - ODEUR	spécifique	neutre	douceâtre	faiblement rance	légèrement putride	putride (cultures au ammoniacale)	fétide
RIGIDITÉ	VII - CHAIR	ferme translucide, lisse, brillante		élastique veloutée, cirreuse, feutrée	souple	molle	flasque osseux	
	VIII - PARI ABDOMINALE	intacte		détendue	molle	fragile	perforée	
PÉRITOINE	IX - ÉTAT	adhérant totalement		adhérent	peu adhérent	détérioré	lysé	
COLONNE VERTÉBRALE	X - COULEUR DE LA CHAIR AVOISINANTE	Même teinte que le reste de la chair			rose	rouge	brune	
	XI - ADHÉRENCE À LA CHAIR	la colonne se brise au lieu de se détacher		nettement adhérente	peu adhérente			la colonne se détache facilement
EXAMEN APRÈS CUISSON (1)	XII - ODEUR	Algue marine ou spécifique	Neutre	Faible ou désagréable	Alg'ne (acide lactique)	saute (plus ou moins différenc)	Ammoniacale	Putride
	XIII - SAVEUR	Spécifique	Spécifique renforcée	Spécifique atténuée	Papier maché	Douceâtre ou peu amère	Amères, sulfurée ou ammoniacale	Nauséabonde

Correspondance CEE/chiffre:

0,0-----1,3-----2,0-----3,0 non
Extra / A / B / admis

ANNEXE 2

Réactif de Lowry A

{	Na ₂ CO ₃	1g
	NaOH.....	50ml

Réactif de Lowry B

{	CuSO ₄ , 5H ₂ O	5g
	Tartrate de NA et k	10g

Réactif de Lowry

[50ml de Lowry A+ 1ml de Lowry B] = mélangé le jour de manipulation

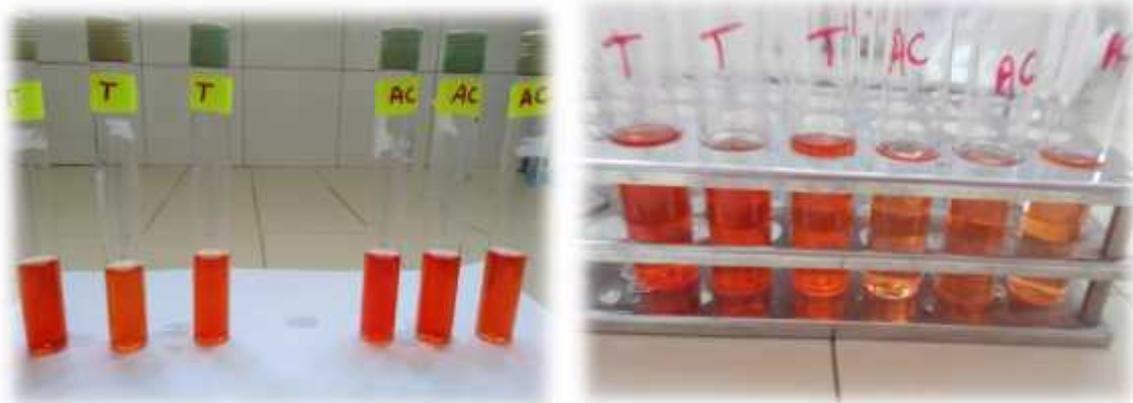


Dosage des protéines

Préparation du Réactif de l'histamine : *p*-phenyldiazonium sulfonate

1. Acide sulfanilique 0,5 ml → réfrigération pendant 5 minutes
2. Sodium nitrite 2 ml → réfrigération pendant 5 minutes
3. Compléter avec l'eau distillée à 16,6 ml → réfrigérations pendant 15 minutes

La préparation du réactif est au jour de manipulation



Dosage de l'histamine



Manipulation microbiologie



Pesé de l'échantillon



Centrifugeuse



PH metre



Agitateur



Étuve



Bain marie



Malaxeur

Extraction du romarin par hydrodistillation



Réfrigérant et chauffe Ballon



Four a moufle



Echantillon après calcination



Sardine fraîche entière



Sardine conservée éviscérée



Présentation du site d'échantillonnage

La Baie de Bou Ismail, anciennement appelée **Castiglione**, est l'une des plus importantes baies de la côte algérienne car elle abrite plusieurs ports d'importance économique notamment le port de Bou Haroun. Elle est située dans la partie centrale du littoral algérien, à 50 km à l'Ouest d'Alger dans la wilaya de Tipaza, entre 2°25' à l'Ouest et à 2°55' à l'Est.

La baie est limitée par la pointe de Cap Caxine (Ras Acrata) à l'Est de Sidi-Fredj, et par le Mont **Chenoua** à l'Ouest, par la plaine de la Mitidja au Sud et la mer méditerranéenne au Nord. L'ouverture de la baie de Bou-Ismaïl est d'environ 40 Km, et s'oriente du Sud-ouest à Nord-Est. Cette baie couvre une surface de l'ordre de 350 Km². (**Braïk, 1989, in Haddouche, 2003**). La baie est le réceptacle d'oueds à régime irrégulier : Mazafran, Nador et Béni-messous. (**Khaoui, 2003**).



Figure: Situation géographique de la baie de Bou Ismail (Google Earth, 2009)

ANNEXES

Tableau :Table NPP à 3 tubes, sources IFREMER

Nombre le plus probable de microorganismes dans g de chair de sardine.

Nombre de tubes positifs			Nombre le Plus probable NPP	Catégorie	Limites de confiance			
1ml	0,1ml	0,01ml			95%		99%	
0	0	0	<90					
0	0	1	90	3	3	285	0	420
0	1	0	90	2	3	300	0	480
0	1	1		0				
0	2	0	186	3	36	510	15	750
0	3	0		0				
1	0	0	108	1	6	510	3	750
1	0	1	216	2	36	510	15	750
1	0	2		0				
1	1	0	222	1	39	600	18	810
1	1	1	330	3	105	1050	54	1380
1	2	0	330	2	108	1050	57	1380
1	2	1	450	3	135	1140	72	1560
1	3	0	480	3	135	1140	72	1560
2	0	0	276	1	45	1050	21	1380
2	0	1	420	2	108	1050	57	1380
2	0	2		0				
2	1	0	450	1	111	1140	60	1560
2	1	1	600	2	135	1140	72	1560
2	1	2		0				
2	2	0	630	1	135	1200	72	1660
2	2	1	840	3	261	2820	153	4260
2	2	2		0				
2	3	0	870	3	251	2820	75	4250
2	3	1		0				
3	0	0	690	1	138	2820	75	4250
3	0	1	1140	1	264	3120	156	4710
3	0	2	1920	3	480	5430	300	7500
3	0	3		0				
3	1	0	1290	1	273	5430	159	7500
3	1	1	2 250	1	510	5970	330	8100
3	1	2	3600	3	1050	10800	630	13200
3	1	3						
3	2	0	2790	1	540	10800	360	12900
3	2	1	4500	1	1050	11400	660	15600
3	2	2	6300	2	1050	12000	750	16600
3	2	3	8700	3	2700	29700	1380	45600
3	3	0	7200	1	1080	29700	780	45600
3	3	1	13800	1	2730	59400	1410	84000
3	3	2	33000	1	5460	121500	3420	171000
3	3	3	>72000					

ANNEXES

--	--	--	--	--	--	--	--	--

Synthèse bibliographique

Matériels et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

CHAPITREIII

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Qualité de la sardine fraîche

III.1.1. Qualité Sensorielle et Organoleptique

L'appréciation de la fraîcheur de la sardine a été faite selon le barème de cotation de la fraîcheur défini par le règlement du conseil de N° 103/76/CEE (voir en annexe1)

L'analyse sensorielles des caractères organoleptiques de la sardine fraîche a permis de relever qu'à l'arrivée au laboratoire au temps (T_0), la sardine est caractérisée par une peau pigmentée et brillante, l'œil est convexe, une pupille noire, des branchies de couleur rouge, une chair brillante, lisse, corps ferme qui revient à son état initial après une pression du doigt et une odeur spécifique d'algues marines. Après éviscération du poisson, les viscères sont intacts et bien distinctes et la colonne vertébrale est solidement rattachée à la chair. Ce qui donne une moyenne de cotation de 0.57 exprimant la qualité extra de la sardine acheminée au laboratoire dans des bonnes conditions. Tableau(4)

Tableau (4) : Cotation des caractères observés de la sardine arrivée au laboratoire selon la norme N° 103/76/CEE en se basant sur une échelle (voir annexe 1)

Caractères observées		Cotation
Peau	Mucus transparente, Couleur irisée	1
Œil	Convexe	0
Branchies	Colorée brillante pas de mucus	1
Chair	Ferme, lisse et brillante	0
Odeur	Spécifique	1
Colonne vertébrale	Nettement adhérente	0
Paroi abdominale	Intacte	1
Moyenne		0.57

III.1. 2. Résultats des paramètres physico-chimiques

Tableau (5) : résultats des analyses physico-chimique de la sardine à l'état frais en fonction des lots réceptionnés au laboratoire.

Echantillons	%H ₂ O	%MM	%MO	pH
E1	77,78	4,405	17,72	7,682
E2	76,32	3,912	18,021	7,774
E3	78,44	2,323	19,239	7,75
E4	77,73	6,847	21,6461	7,344
E5	75,38	2,37	25,90	7,57

La teneur en eau peut constituer un indice pratique dans l'évaluation de la fraîcheur d'un produit donné. Dans la présente étude, les lots de sardine arrivés au laboratoire contiennent en moyen entre 78.44 et 75.38 (tableau5). La composition globale dans la plupart des poissons est principalement de l'eau, des protéines et des lipides ; l'eau représente, généralement de 70 à 80% de la matière fraîche (IFremer, 1991 ; Eymard, 2003). Ces résultats se concordent avec ceux obtenues par Eymard, (2003). La teneur moyenne pour l'ensemble des échantillons traités est de 77, 56. Cette valeur trouvée est un bon indice de fraîcheur pour l'ensemble de nos échantillons.

Par ailleurs, dans les mêmes lots les valeurs de la matière minérale enregistrées ont été comprises entre 2,323 (min) et 6,847 (max) et les valeurs de la matière organiques relevées sont comprises entre 17, 72 (min) et 25, 90 (max). Chez le poisson frais la matière minérale fait partie des constituants mineurs, sa teneur varie entre 1,3 et 2,5 % de la composition musculaire de la chair et la matière organique représente la fraction des réserves énergétiques notamment les protéines et les lipides (IFremer, 1991).

Le pH moyen de nos produits frais est d'une valeur maximale de 7,774 et une valeur minimale de 7,344. Le pH de l'ensemble des lots du produit frais analysé est presque identique et ne dépasse pas la valeur du pH préconisée pour les produits de la mer peu acide variant entre 5,4 et 7,2. La considération de l'espèce, la saison et la zone capturée les valeurs observées dans les lots peut justifier (Love, 1980).

III.1.3. Qualité Microbiologique

Le dénombrement des germes recherchés dans la chair de la sardine (*sardina pilchardus*) sont présentés dans le tableau (6) suivant :

Tableau(6) : résultats du contrôle bactériologique de la sardine fraîche provenant du port de Bouharoun.

Echantillons	E4	E5	Norme JORA(1999)
Levures UFC	310	325	<300
Moisissures UFC	230	192	<300
Flore aérobie mésophile	2550	2659	10 ⁶
Coliformes totaux	absence	absence	10 ³
Coliformes fécaux	absence	absence	10 ⁴
E- coli	absence	absence	< 230
Streptocoques	absence	absence	10 ³
Salmonelles	absence	absence	Absence
Clostridium sulfito-réducteurs	absence	absence	Absence

❖ **Flore aérobie mésophile** : Le dénombrement de la Flore Aérobie Mésophile Totale (FAMT) dans les produits de la mer n'est pas un indicateur de la qualité de ces derniers. Cependant, il peut donner une indication des risques d'altération. Ainsi il a été démontré que les produits de la pêche avec un taux de Flore Aérobie Mésophile Totale supérieur à 10^6 ufc/g sont susceptibles d'être à un stade inacceptable du point de vue microbiologique et peuvent être considérés comme impropres à la consommation humaine (Gram *et al.*, 2000).

❖ La recherche des coliformes totaux et fécaux mit en évidence des teneurs inférieures à la norme (10^3 , 4 UFC/ml respectivement) préconisée par JORA (1999).

❖ **Streptocoque fécaux** : les résultats des échantillons du présent travail montrent une absence de ces germes. La valeur recommandée par JORA N° 35 27 mai est de 10^3 par 100g de chair, de ce fait notre sardine fraîche est conforme à la norme.

❖ **Une absence de Clostridium et Salmonella** : dans tous les échantillons, a été également observée. De ce fait, la sardine analysée est jugée conformes aux normes recommandées (tableau),

❖ **Levure et moisissure** : une présence non significative de levure (310 pour l'échantillon E4 et 325 pour E5) et de moisissures (230 pour l'échantillon E4 et 129 pour E5) a été enregistrée.

De point de vue hygiénique, les résultats microbiologiques pouvant qualifier les échantillons de sardine collectés comme produit salubre et propre à la consommation.

III.1.4. Résultats des analyses Biochimiques

Les résultats des dosages biochimiques des teneurs en protéines et les activités enzymatiques de la catalase et de la protéase dans la chair des sardines analysées sont cosignés dans le tableau(7) ci-dessous,

Tableau (7) : Valeurs moyennes des teneurs de catalase, protéase et en protéines dans la chair des lots de sardine fraîche réceptionnés au laboratoire.

	E3	E4	E5
Protéines (mg/g de chaire)	109,605 ± 15,0824	134,197 ± 40.031	127.736 ± 13,443
Catalase (U/ml)	6.665 ± 0	13,088 ± 1.338	34,67 ± 3,487
Protéase (Unités/mg protéines)	7.913 ± 2.078	11,955 ± 3,464	8,883 ± 0,616

Selon la méthode développée par Lowry *et al.*, (1951), la chair de la sardine fraîche contient des teneurs en protéine solubles oscillant entre $3109,6051 \pm 15,08242$ mg/g et $134,198 \pm 40.031$ mg/g mais nous remarquons une augmentation non significative de ce dernier chez les deux lots de la sardine E4 et E5 conservés par l'acide citrique et l'extrait de romarin respectivement.

La qualité de la chair se définit comme l'ensemble des propriétés et caractéristiques morphologiques, histologiques, biochimiques, rhéologiques et de la composition biochimique qui conditionnent les qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit perçues par le consommateur. Les évolutions *post-mortem* du poisson conduisent à des changements d'odeur, d'arôme et de texture (Regenstein, 1996).

Les notions importantes en termes de qualité sont celles d'un aliment sain et d'un état de fraîcheur du poisson. Les premiers changements survenant sont dus aux enzymes tissulaires et digestives et à l'oxydation des lipides, c'est ensuite le développement bactérien qui est le responsable de la dégradation et de la diminution de la qualité des produits de la mer. L'altération met en jeu un ensemble de processus microbiologiques, chimiques et physiques.

L'activité des protéases est plus au moins stable, pas d'altération protéolytique, résultat confirmé par la mesure des protéines.

III.1.5. Résultats des analyses toxicologiques

A l'issu des résultats du tableau on constate que la teneur moyenne en ABVT ne dépasse pas 4mg /100gde chair pour l'ensemble des échantillons traités. De point de vue normatif les échantillons sont conformes à la norme JORA (inferieur à 20/100g (park et al 1996).

Tableau(8) : résultats du contrôle toxicologiques de la chair de sardine fraiche réceptionnés au laboratoire.

	E4	E5
Histamine	0	0
Fer	0,05430	0,04996
ABVT	2,8	2,94

❖ L'azote basique volatil total est un critère utilisé pour évaluer l'altération des produits de la mer. Il se traduit par l'odeur ammoniacale susceptible de se dégager d'un produit donné. L'ammoniac, les ditriméthylamine ainsi que les amines résultant de la dégradation des protéines constituent l'ensemble de l'ABVT (Knockaert *et al*, 2009).

D'une manière générale, l'état de fraîcheur des poissons frais, réfrigérés est satisfaisant lorsque la teneur en ABVT est inférieure à 25-30 mg/100g chair.

❖ La teneur moyenne en histamine dans le muscle de la sardine est de l'ordre de 0 mg/100 g de muscle.

Ces résultats confirment que la sardine étudiée est fraîche et qu'elle a été acheminée au laboratoire dans de bonnes conditions. La formation d'amines biogène dépend des conditions du milieu (Bach, 2011). La température idéale est comprise entre 26 et 37°C. Le pH optimal pour les bactéries est situé dans un milieu acide, légèrement acide à basique pour les tissus

(Bonnin-Jusserand, 2011). En outre, L'étude de la formation des amines biogènes dans le poisson en fonction de la charge bactérienne a montré que la flore bactérienne joue un rôle important dans la production des amines biogènes, surtout de l'histamine (Rachidi, 1997).

يهدف هذا العمل مراقبة نوعية السردين الطازج على مستوى ميناء بوهارون ودراسة تأثير المواد الحافظة :
الستريك إكليل الجبل عليه زينه لمدة 12 يوم °4 .

أظهرت جميع العينات الطازجة نوعية جيدة على المستويات الفيزيوكيميائية الحسية و الميكروبيولوجية.

تميز سردين تدهور نوعية الحسية . زيادة . هستامين . بين 0.6 ± 56.6
رافقه ظهور البكتيريا الكلية الهوائية أليفة الحرارة المعتدلة. البروتيد نسبيًا و لم يتم
يتأكد تغيير بروتيد محتويات وتبيد .

القيم . . . طيار للعينات المحفوظة 21 . / 100 غ في اليوم
لم تتجاوز القيم المسموح بها, تسجيل السردين في اليوم . يمكن
تغيير الدهون تعديل .

إكليل السردين 4 مئوية . . .
نشاط انزيمات البروتياز تثبيط الأوكسدة المتمثل في . انزيم . 30 . في حين، اظهر .
الستريك تأني البروتيد .

على ضوء هذه النتائج، ينصح إكليل البحرية السردين
مادة حافظة طبيعية.

المفتاحية: السردين , , الطيار, الهستامين, الستريك, إكليل -
الميكروفلورا.