

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

Ecole doctorale N°495 Végétal, environnement, nutrition, agroalimentaire, mer  
ED VENAM

# Quantification des bactéries histaminogènes et maîtrise de la formation d'histamine dans les produits marins par biopréservation

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Microbiologie

Spécialité : Agroalimentaire

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Gaëtan PODEUR**

*Le 09 Juillet 2014, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs    Marie-Christine CHAMPOMIER-VERGES, Directrice de recherche, INRA  
                     Emmanuel COTON, Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Examineurs    Souad CHRISTIEANS, Docteur-HDR, ADIV  
                     Guillaume DUFLOS, Ingénieur de recherche, ANSES  
                     Joël FLEURENCE, Professeur, Université de Nantes

*Direction de thèse : Françoise LEROI, Hervé PREVOST, Marie-France PILET*



*A ma mère et à mon père,*

*A mes amis et ma famille,*

*Qui m'ont soutenu durant toutes mes études*



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont évalué mon travail de recherche. Plus particulièrement, je remercie Madame Marie-Christine Champomier-Vergès, directrice de recherche à l'UMR 1319 MICALIS et Monsieur Emmanuel Coton, professeur à l'école d'ingénieur en agroalimentaire ESIAB qui ont accepté d'être rapporteurs de thèse.

Ces 3 années (et quelques mois) de thèse ont été parsemées de découvertes, de nouvelles connaissances mais aussi de moments plus difficiles. Ainsi, je tiens à remercier Madame Françoise Leroi, cadre de recherche et récemment directrice du laboratoire EM<sup>3</sup>B à Ifremer, qui a dirigé ce travail de recherche mais qui a aussi su m'apporter une expertise scientifique, un encadrement et un soutien tout au long de ce travail.

Je remercie aussi Monsieur Hervé Prévost, professeur et directeur de l'UMR1014 Secalim, qui m'a accueilli au sein de l'unité SECALIM d'ONIRIS pour mes travaux de thèse. Ses conseils avisés m'ont apporté à la fois des connaissances scientifiques mais m'ont aussi permis d'élargir ma pensée et d'améliorer mon travail de recherche.

Je tiens tout autant à remercier Madame Marie-France Pilet, Maître de conférence à l'UMR1014 SECALIM, qui m'a suivi au cours de ces 3 années, tantôt lors d'un séjour à Ifremer puis au sein de l'unité SECALIM. Ses conseils scientifiques, sa patience, sa pédagogie et son soutien m'ont été essentiels.

Cette thèse m'a aussi permis de voyager et de travailler avec Monsieur Paw Dalgaard, Professeur et directeur du groupe de recherche en microbiologie prévisionnelle à l'Université Technique du Danemark. Je le remercie chaleureusement pour son accueil au sein de son laboratoire, qui a été propice à l'amélioration de ma maîtrise de l'anglais. Il a aussi su partager son savoir et parfaire ma connaissance des bactéries histaminogènes et de leur développement en produits.

Lors de ce projet scientifique, j'ai travaillé tout autant en biochimie, microbiologie et biologie moléculaire. Lors de ces expérimentations, j'ai pu compter sur l'aide des permanents de mes deux laboratoires d'accueil. Je tiens cependant à remercier plus particulièrement Sandrine Bruzac pour le temps passé à la mise au point de la méthode HPLC. Et je remercie aussi Frédérique Gigoult-

Chevalier, avec qui j'ai partagé le laboratoire de microbiologie et qui a supporté mes bactéries et mes poissons.

J'ai pu prendre part lors de cette thèse au projet national Histabio au cours duquel j'ai rencontré de nombreux acteurs scientifiques de la filière des produits marins. Je remercie Madame Hélène Caekebeke, Monsieur Guillaume Duflos, Monsieur Philippe Droin, Monsieur Bruno Le Fur et Madame Sylvie Lorre pour les nombreuses discussions scientifiques entreprises lors de ce projet et pour la découverte de ce secteur industriel qui m'était alors inconnu.

L'avancée de ce travail de thèse a été évaluée par Monsieur Yves Leloir, directeur d'Unité à L'INRA et Mme Gwenaëlle Le Blay, professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, je tiens à les remercier pour leur suivi et leurs conseils lors de mes comités de thèse.

Enfin, il m'était impossible de terminer sans remercier les thésards, permanents et stagiaires, Papa Abdoulaye Fall, Vincent Boursicot, Elodie Cesbron, Agathe Le Guedes, Cécile Le Guillard, Karine Leroux, Sabrina Macé, Anaïs Penven, Mihanta Ramarosson, Taous Saraoui avec qui j'ai passé d'excellents moments tout au long de ma thèse.

J'adresse aussi mes pensées à Christelle Kouakou et Sylvie Hurel qui nous ont quittés bien trop tôt.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>7</b>
1. La famille des thonidés.....	11
1.1. Etymologie et taxonomie.....	11
1.2. Physiologie .....	11
2. Le marché du thon : production, échanges, consommation.....	13
2.1. A l'échelle mondiale .....	13
2.2. A l'échelle française.....	16
3. Les risques liés à la consommation de produits marins.....	19
3.1. Le risque microbiologique dans les poissons marins.....	19
3.2. L'histamine et les amines biogènes.....	22
4. L'intoxication histaminique.....	26
4.1. Symptômes, mécanismes d'actions et dose toxique.....	27
4.2. Poissons impliqués et leurs caractéristiques .....	31
4.3. Données et statistiques des intoxications histaminiques.....	29
4.4. La réglementation Européenne et Américaine .....	33
5. Méthodes de quantification des amines biogènes .....	35
6. Les facteurs de production d'histamine dans les produits marins .....	36
6.1. Les bactéries histaminogènes .....	37
6.2. L'histidine décarboxylase .....	46
6.3. Les conditions nécessaires à la production d'histamine.....	48
7. Les méthodes de détection et de quantification des bactéries histaminogènes .....	52
7.1. Détection par méthode biochimique .....	52
7.2. Détection par des outils moléculaires .....	53

7.3. Méthodes de quantification.....	55
8. Options de gestion du risque de production d'histamine dans les produits marins .....	56
8.1. Ionisation des produits .....	58
8.2. Traitement par pression hydrostatique.....	59
8.3. Application d'additifs ou de conservateurs alimentaires .....	59
8.4. Le conditionnement des produits .....	61
8.5. L'oxydation de l'histamine.....	62
8.6. La biopréservation.....	63
9. Objectifs de la thèse.....	73
<b>RESULTATS.....</b>	<b>75</b>
<b>Chapitre I .....</b>	<b>77</b>
Sélection de souches bioprotectrices pour limiter le développement de bactéries histaminogènes dans des produits à base de thon	
<b>Chapitre II .....</b>	<b>137</b>
Quantification de <i>Morganella morganii</i> et <i>Morganella psychrotolerans</i> par PCR quantitative en temps réel	
<b>Chapitre III .....</b>	<b>161</b>
Etude de l'expression des gènes du cluster de l'histidine décarboxylase chez <i>M. psychrotolerans</i> dans différentes conditions environnementales	
<b>DISCUSSION FINALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>181</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>199</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>247</b>



# Abréviations

ANSES – Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

BIA - Biogenic Amine Index

BIOCOM - Biogenic amines in seafoods - assessment and management of consumer exposure

CDC - Center for Disease Control (centre de contrôle des maladies)

CDS- Séquence Codante

DAO - Diamine Oxydase

EFSA - European Food Safety Authority

FDA - Food and Drug Administration

GRAS - Generally Recognized As Safe

HNMT - Histamine N-methyl transférase

HPLC - Chromatographie Liquide à Haute Pression

IA - Index d'Amines

IATTC : Commission Inter-Américaine du Thon Tropical

ICCAT - Commission Internationale pour la Conservation du Thon Atlantique

IOTC - Commission du Thon de l'Océan Indien

IUCN - Union Internationale pour la Conservation de la Nature

MAO - MonoAmine Oxydase

MAP - Modified Atmosphere Packaging (conditionnement sous atmosphère protectrice)

*Mr* - Résonance Magnétique

ORF - Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)

ORPG - Organisation Régionale de Gestion des Pêches

OTMA - Oxyde de TriMéthylAmine

PCR - Réaction de Polymérisation en Chaîne

qPCR - Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative

QPS - Qualified Presumption of Safety

RT-qPCR - Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative après Transcriptase Reverse

EM<sup>3</sup>B - Ecosystèmes Microbiens et Molécules Marines pour les Biotechnologies

SV - Conditionnement Sous-Vide

UFC - Unités Formant Colonies

WoK - Web of Knowledge

## Milieu de culture

VRBG	Violet Red Bile Glucose Agar
MRS	Man Rogosa & Sharpe
ELK	Elliker
BHI	Brain Heart Infusion
TS	Tryptone-Sel
JT	Milieu à base de Jus de Thon

## Bactéries

<i>C. alterfunditum</i>	<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	Ca
<i>C. jeotgali</i>	<i>Carnobacterium jeotgali</i>	Cj
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ea
<i>H. alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	Ha
<i>L. fuchuensis</i>	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	Lf
<i>L. sakei</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	Ls
<i>L. piscium</i>	<i>Lactococcus piscium</i>	Lp
<i>M. morganii</i>	<i>Morganella morganii</i>	Mm
<i>M. psychrotolerans</i>	<i>Morganella psychrotolerans</i>	Mp
<i>P. damseale</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	Pd
<i>P. phosphoreum</i>	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Pp
<i>R. planticola</i>	<i>Raoultella planticola</i>	Rp
<i>V. fluvialis</i>	<i>Vagococcus fluvialis</i>	Vf

# Table des illustrations

## Figures

<b>Figure 1</b> : Publications sur les intoxications histaminiques disponibles sur le Web of Knowledge entre 1968 et 2013.....	9
<b>Figure 2</b> : Photographie d'un thon albacore dans la zone de pêche du Costa Rica ( <i>T. albacares</i> ) (www.queposfishadventure.com).....	11
<b>Figure 3</b> : Production mondiale de thon par espèces (FranceAgriMer, 2011) .....	13
<b>Figure 4</b> : Voies d'approvisionnement principales en thon (Garrett and Brown, 2009).....	14
<b>Figure 5</b> : Principales espèces vendues en 2008 par tonnes et par valeurs (ANSES, 2012).....	16
<b>Figure 6</b> : Distribution des toxi-infections alimentaires liées à la consommation de produits marins en Europe en 2011 (EFSA, 2013).....	20
<b>Figure 7</b> : Synthèse de l'histamine, tyramine et d'autres amines biogènes (putrescine, spermidine, spermine) (Prester, 2011) .....	23
<b>Figure 8</b> : Schématisation des symptômes provoqués par l'histamine (Maintz and Novak, 2007) .....	25
<b>Figure 9</b> : Eruptions cutanées chez un patient victime d'une intoxication histaminique.....	27
<b>Figure 10</b> : Variation de la concentration en histidine dans la chair d'un thon (Borrensen, 2008).....	32
<b>Figure 11</b> : Résultat positif et négatif du kit Neogen Reveal ( <a href="http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/R-Hist.pdf">http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/R-Hist.pdf</a> ) .....	37
<b>Figure 12</b> : Taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ) observé (Avg $\pm$ SD, n=2) pour <i>M. psychrotolerans</i> (triangle ouvert, Mix-Mp) et <i>M. morganii</i> (cercle plein, Mix-Mm.) (Emborg and Dalgaard, 2008a)....	41
<b>Figure 13</b> : Bioluminescence de <i>Photobacterium phosphoreum</i> sur un milieu Marine agar ( <a href="http://exploringtheinvisible.files.wordpress.com/2013/05/img_0116-e1367752538636.jpg?w=300&amp;h=294">http://exploringtheinvisible.files.wordpress.com/2013/05/img_0116-e1367752538636.jpg?w=300&amp;h=294</a> ).....	44
<b>Figure 14</b> : Principe de la décarboxylation de l'histidine libre chez des bactéries à Gram positif (Landete <i>et al.</i> , 2008).....	46
<b>Figure 15</b> : Organisation génétique de la région codant le gène de l'histidine décarboxylase chez les bactéries à Gram négatif. Les régions hdc de <i>M. morganii</i> AM-15 (J02577), <i>R. planticola</i> strain T2 (M62746), <i>E. aerogenes</i> ATCC 13124 (M62745), <i>P. phosphoreum</i> RHE01 (AY223843), du plasmide pJM1 de <i>Listonella anguillarum</i> 775 (AY312585) et <i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS374 (Y09356) sont représentées. Les flèches indiquent des COL (Cadre ouvert de lecture), les gènes codant pour l'HDC sont représentés en noir (Landete <i>et al.</i> , 2008).....	47

<b>Figure 16</b> : Synthèse des données sur la formation d'histamine dans des produits riche en histidine naturellement et artificiellement contaminés à différentes températures (Dalgaard <i>et al.</i> , 2008) .....	49
<b>Figure 17</b> : Croissance de <i>M. psychrotolerans</i> d'après le Seafood Spoilage and Safety Predictor dans différentes conditions. a) Croissance dans du thon avec une concentration initiale à 10 UFC/g à 4°C et 2 °C pendant 28 jours. b) Croissance dans du thon à 2°C avec une concentration de 10 UFC/g ou 1000 UFC/g pendant 28 jours .....	51
<b>Figure 18</b> : Alignement de séquences protéiques de l'histidine décarboxylase de différentes espèces bactériennes. EAR : <i>E. aerogenes</i> ; ECA : <i>Enterobacter cloacea</i> ; RPA : <i>R. planticola</i> ; ROR : <i>R. ornithinolytica</i> ; MMO : <i>M. morgani</i> ; PPH : <i>P. phosphoreum</i> ; PDA : <i>P. damsela</i> ; PFL : <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Landete <i>et al.</i> 2008).....	54
<b>Figure 19</b> : Sauce Nuoc-mam fabriquée à partir d'anchois pressés et fermentés (cap-vietnam.com) .	72
<b>Figure 20</b> : Organisation des challenge-tests réalisés au cours de cette thèse.....	90
<b>Figure 21</b> : Evolution de la flore totale et des entérobactéries dans des longes de thon fumées stockées à 15°C et 8°C pendant 2 semaines au-delà de leur DLC .....	98
<b>Figure 22</b> : Challenge-test sur thon appertisé contaminé avec <i>M. psychrotolerans</i> CIP 109403 <sup>T</sup> en co-culture avec une bactérie lactique et conservé sous-vide 72 h à 15°C. Croissance de Mp : <i>M. psychrotolerans</i> pur ; avec BLN : Ferment BLN ; avec Vf : <i>V. fluvialis</i> CD264 ; avec LsS : <i>L. sakei</i> EU2202 ; avec Lp : <i>L. piscium</i> EU2258 ; avec Lc : <i>L. curvatus</i> LHIS2886 et avec Lg : <i>L. gelidum</i> LHIS2959.....	111
<b>Figure 23</b> : Challenge-tests sur thon appertisé artificiellement contaminé avec <i>M. psychrotolerans</i> CIP 109403 <sup>T</sup> conservé sous-vide 72 h à 15°C. Croissance de Mp : <i>M. psychrotolerans</i> pur ; avec Lf : <i>L. fuchuensis</i> EU2256 ; avec Ca : <i>C. alterfunditum</i> EU2257 ; avec Ls : <i>L. sakei</i> LHIS2885 ; avec LfH : <i>L. fuchuensis</i> LHIS2996 ; avec Cj : <i>C. jeotgali</i> LHIS 2995 et avec LsT : <i>L. sakei</i> LHIS3006 .....	111
<b>Figure 24</b> : Croissance de <i>M. psychrotolerans</i> seul ou en présence d'une bactérie lactique dans du thon cuit conservé à 15°C pendant 8 jours : <i>Lc. piscium</i> EU2258, <i>V. fluvialis</i> CD264, <i>L. sakei</i> LHIS2885 et le ferment BLN. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types.....	113
<b>Figure 25</b> : Croissance des 4 bactéries lactiques en fonction du temps dans le thon cuit artificiellement contaminé par <i>M. psychrotolerans</i> incubé 8 jours à 15°C après une étape de congélation. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types .....	114
<b>Figure 26</b> : Fréquence des odeurs citées à 4 et 8 jours pour les souches en culture pure.....	118
<b>Figure 27</b> : Fréquence des odeurs citées à 4 et 8 jours pour les souches en co-culture avec <i>M. psychrotolerans</i> CIP 109403 <sup>T</sup> .....	118
<b>Figure 28</b> : Cinétique de croissance de <i>M. morgani</i> CIP A231 sur du thon en boîte en culture pure ou en co-culture avec <i>L. sakei</i> LHIS2885 durant 7 jours de stockage à 15°C, après une étape initiale de congélation. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types .....	122

<b>Figure 29</b> : Suivi de la croissance de <i>P. phosphoreum</i> CCUG 16288 en culture pure (T) et en co-culture(C) avec <i>L. sakei</i> LHS2885 sur du thon en boîte stocké sous-vide à 15°C pendant 8 jours .....	124
<b>Figure 30</b> : Évolution de <i>P. damsela</i> e CIP 102761 <sup>T</sup> en culture pure (T) et en co-culture (C) avec <i>L. sakei</i> LHS 2885 sur du thon appertisé conservé sous-vide à 15°C .....	124
<b>Figure 31</b> : Croissance de <i>M. psychrotolerans</i> en absence ou présence de <i>L. sakei</i> LHS2855 à 4°C pendant 18 jours. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types .....	126
<b>Figure 32</b> : Croissance de <i>L. sakei</i> en absence ou présence de <i>M. psychrotolerans</i> à 4°C pendant 18 jours. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types.....	127
<b>Figure 33</b> : Cinétique de croissance de la flore totale (L&H) et des entérobactéries (VRBG) sur des tranches de thon fumé conservées sous-vide pendant 4 semaines à 8°C. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types .....	128
<b>Figure 34</b> : Suivi de la croissance de <i>L. sakei</i> LHS2885 dans le thon fumé conservé sous-vide à 8°C en culture pure (T) ou en co-culture avec un cocktail de bactéries psychrotolérantes ( <i>M. psychrotolerans</i> et <i>P. phosphoreum</i> ) (PC) ou de bactéries mésophiles ( <i>M. morgani</i> i et <i>P. damsela</i> e) (MC). Les barres d'erreur représentent les écart-types.....	129
<b>Figure 35</b> : Suivi de la croissance du cocktail de souches psychrotolérantes fortement productrices d'histamine <i>P. phosphoreum</i> et <i>M. psychrotolerans</i> en culture pur (T) et en co-culture avec <i>L. sakei</i> (C) sur des tranches de thon fumé conservées sous-vide à 8°C pendant 4 semaines. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types.....	130
<b>Figure 36</b> : Suivi de la croissance du cocktail de souches mésophiles fortement productrices d'histamine <i>P. damsela</i> e et <i>M. morgani</i> i en culture pure (T) et en co-culture avec <i>L. sakei</i> (C) sur des tranches de thon fumé conservées sous-vide à 8°C pendant 4 semaines. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types .....	131
<b>Figure 37</b> : Droite d'étalonnage développée pour <i>M. morgani</i> i (A) et <i>M. psychrotolerans</i> (B) sur du thon en boîte.....	148
<b>Figure 38</b> : Croissance de <i>M. morgani</i> i (A) et <i>H. alvei</i> en milieu MoE sans colistine et avec 32 mg/kg de colistine. Les lignes pleines correspondent au milieu MoE sans la colistine et les lignes en pointillées sont pour le milieu avec 32 mg/kg de colistine. ....	149
<b>Figure 39</b> : Croissance de <i>M. morgani</i> i (A) et <i>M. psychrotolerans</i> (B) à 37°C et 10 °C respectivement en milieu MoE suivie par énumération sur gélose TSA en fonction du temps. La droite en ligne pleine représente le modèle mathématique employé pour déterminer le taux de croissance de chaque espèce. ....	151
<b>Figure 40</b> : Gammes d'étalonnage développées sur milieu MoE avec des cultures pures de <i>M. morgani</i> i (A) et <i>M. psychrotolerans</i> (B).....	152

**Figure 41** : Protocole de quantification par qPCR en temps réel de *M. psychrotolerans* et *M. morganii* avec ou sans étape d'enrichissement en milieu MoE.....153

**Figure 42** : Catégorie fonctionnelle des protéines prédites *in silico*. Les couleurs représentent différentes espèces : en bleu *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> et en rouge *P. mirabilis* HI4320. Les protéines ont été organisées par le programme d'annotation RAST. Les protéines codant pour des métabolismes secondaires ou des régulateurs n'ont pas été représentées sur l'histogramme car absentes du génome de *M. psychrotolerans*. .....171

**Figure 43** : a) Représentation schématique du cluster de l'histidine décarboxylase de *M. psychrotolerans* U6/1, *M. morganii* DSM30164, *P. phosphoreum*, *R. planticola*, *E. aerogenes*, *P. damsela*, *L. anguillarum* et *L. buchneri*. Les flèches indiquent les ORFs. Les gènes codant pour l'histidine décarboxylase sont colorés en noir, en gris pour les perméases et en blanc pour l'histidyl-ARN-t synthétase. b) Relation phylogénétique entre les séquences nucléotidiques de plusieurs gènes *hdc*. Les distances entre les séquences ont été calculées par Clustal W et le dendrogramme a été dessiné par la méthode du Neighbor Joining selon 1000 itérations (Bootstrap x 1000) avec un outgroup correspondant à *L. sakei* 30A. Des séquences *hdc* de bactéries à Gram positif ont aussi été incluses dans cette étude phylogénétique (Ferrario *et al.*, 2014).....172

**Figure 44** : Alignement des séquences *hisRS1* de *M. morganii* DSM30164T, *K. oxytoca* 10-5246, *E. aerogenes* KTCT2190, *P. damsela* CIP102567 et *M. psychrotolerans* CIP109403<sup>T</sup>. Les domaines conservés parmi les protéines aminoacyl-ARNt synthétase de classe II sont entourés en noir (motif 1, 2 et 3). Les étoiles noires et la boîte grise indiquent les zones de fixation de l'histidine avec la protéine. Les étoiles grises indiquent les résidus de fixation de la synthétase aux molécules d'histidyl-ARNt définies chez *E. coli*. .....173

## Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Liste et caractéristiques physiologiques des espèces de thon du genre <i>Thunnus</i> sous-groupe <i>Thunnus</i> (IUCN, 2013) .....	15
<b>Tableau 2</b> : Destination selon les espèces de thon pour la transformation en conserves .....	17
<b>Tableau 3</b> : Dangers bactériens associés aux produits marins (Børresen <i>et al.</i> , 2008).....	22
<b>Tableau 4</b> : Aperçu des épidémies (n = 142) et des cas (n = 1998) d'intoxications histaminiques en fonction de la concentration en histamine dans différents poissons (Emborg <i>et al.</i> , 2005) .....	29
<b>Tableau 5</b> : Données statistiques internationales sur les intoxications histaminiques de 1950 à 2011 (Dalgaard <i>et al.</i> , 2008).....	30
<b>Tableau 6</b> : Liste des poissons riches en histidine sous la réglementation EC 1441/2007 (Guillier <i>et al.</i> , 2011) .....	34
<b>Tableau 7</b> : Liste de bactéries histaminogènes mésophiles et psychrotolérantes fortement productrices, leurs origines et références .....	40
<b>Tableau 8</b> : Souches de <i>M. morgani</i> isolées sur différentes matrices .....	42
<b>Tableau 9</b> : Souches de <i>M. psychrotolerans</i> isolées sur différents poissons .....	42
<b>Tableau 10</b> : Détection de bactéries histaminogènes à l'aide de paires d'amorces développées pour une méthode PCR .....	54
<b>Tableau 11</b> : Liste des amorces et des sondes utilisées pour détecter ou quantifier les bactéries histaminogènes par PCR et PCR en temps réel .....	56
<b>Tableau 12</b> : Réduction de la synthèse d'amines biogènes par des additifs alimentaires.....	60
<b>Tableau 13</b> : Liste des principales bactéries lactiques isolées de poissons (Leroi <i>et al.</i> , 2010) .....	65
<b>Tableau 14</b> : Liste des travaux récents sur la biopréservation des produits marins .....	71
<b>Tableau 15</b> : Souches de bactéries potentiellement histaminogènes obtenues auprès de la CRBIP ...	81
<b>Tableau 16</b> : Souches de bactéries lactiques issues de la souchothèque Ifremer .....	81
<b>Tableau 17</b> : Produits marins riches en histidine, ou responsables d'intoxication histaminique utilisés pour l'isolement de bactéries histaminogènes .....	83
<b>Tableau 18</b> : Produits riches en histidine dans différentes conditions de stockage utilisés pour l'isolement de bactéries lactiques. ....	86
<b>Tableau 19</b> : Flore totale et entérobactéries (log UFC/g) des produits conservés sous-air à 4°C et 20°C .....	96
<b>Tableau 20</b> : Identification des bactéries histaminogènes ayant produit des concentrations en histamine supérieures à 500 mg/kg en milieu de Maijala. Le gène HDC a été recherché à l'aide des amorces de Takahashi <i>et al.</i> (2003) .....	97
<b>Tableau 21</b> : pH et teneur en histamine dans les longes de thon fumé lors de leur incubation à 15°C et 8°C.....	99

<b>Tableau 22</b> : Collection de bactéries histaminogènes constituée pour cette étude.....	101
<b>Tableau 23</b> : Potentiel d’inhibition de bactéries lactiques, isolées de produits marins riche en histidine, contre 4 bactéries histaminogènes ( <i>M. morganii</i> , <i>H. alvei</i> , <i>M. psychrotolerans</i> et <i>P. phosphoreum</i> ) par la méthode en double couche de Matamoros <i>et al.</i> (2009) sur jus de thon gélosé .....	104
<b>Tableau 24</b> : Potentiel d’inhibition de bactéries lactiques issues de la collection Ifremer/Oniris et de 2 ferments contre 4 bactéries histaminogènes ( <i>M. morganii</i> , <i>H. alvei</i> , <i>M. psychrotolerans</i> et <i>P. phosphoreum</i> ) par la méthode en double couche de Matamoros <i>et al.</i> (2009) sur jus de thon gélosé .....	105
<b>Tableau 25</b> : Liste récapitulative des bactéries lactiques bioprotectrices et halos d’inhibitions contre 4 bactéries histaminogènes .....	106
<b>Tableau 26</b> : Sélection de 12 bactéries bioprotectrices pour les challenge-tests.....	108
<b>Tableau 27</b> : Concentration en histamine, mesurée par le kit Veratox (Neogen), dans les lots de thon cuitensemencés par <i>M. psychrotolerans</i> CIP 109403 <sup>T</sup> en co-culture avec une bactérie lactique inhibitrice à différents temps de stockage.....	112
<b>Tableau 28</b> : Mesure de la concentration en histamine dans le thon par HPLC au cours du stockage du thon cuit à 15°C en présence de <i>M. psychrotolerans</i> et d’une des 4 bactéries lactiques. Les écart-types sont présentés entre parenthèses. ....	115
<b>Tableau 29</b> : Notes sensorielles et caractérisation par attributs dans les lots témoins et bactéries lactiques à 4 et 8 jours de stockage à 15°C. BLN : Ferment BLN, <i>Lp</i> : <i>Lactococcus piscium</i> EU2258, <i>Ls</i> : <i>Lactobacillus sakei</i> LHS2885, <i>Vf</i> : <i>Vagococcus fluvialis</i> CD264, <i>Mp</i> : <i>Morganella psychrotolerans</i> CIP 109403 <sup>T</sup> .....	116
<b>Tableau 30</b> : Notes sensorielles et caractérisation par attributs dans les lots du challenge-test. BLN : Ferment BLN, <i>Lp</i> : <i>Lactococcus piscium</i> EU2258, <i>Ls</i> : <i>Lactobacillus sakei</i> LHS2885, <i>Vf</i> : <i>Vagococcus fluvialis</i> CD264, <i>Mp</i> : <i>Morganella psychrotolerans</i> CIP 109403 <sup>T</sup> .....	117
<b>Tableau 31</b> : Mesure de la production d’histamine à 4 et 8 jours de stockage dans les 8 lots de thon cuit. Les écart-types sont représentés entre parenthèses.....	119
<b>Tableau 32</b> : Concentration en histamine en mg/kg dans la chair de thon artificiellement contaminée par <i>M. morganii</i> CIP A231 en culture pure ou en co-culture avec <i>L. sakei</i> LHS2885, après une étape de congélation et 7 jours de stockage à 15°C .....	123
<b>Tableau 33</b> : Concentration en histamine en mg/kg, dosée avec le kit Veratox, dans la chair de thon artificiellement contaminée par <i>P. phosphoreum</i> CCUG 16288 ou <i>P. damsela</i> CIP 102761 en culture pure ou en co-culture avec <i>L. sakei</i> LHS2885, après 7 jours de stockage à 15°C. ....	125
<b>Tableau 34</b> : Concentration en histamine en mg/kg, dosée par HPLC, dans la chair de thon cuite artificiellement contaminée par <i>M. psychrotolerans</i> CIP 109403 en culture pure ou en co-culture avec	



<i>L. sakei</i> LHS2885, après congélation et 14 jours de stockage à 4°C. Les écart-types sont indiqués entre parenthèses.....	127
<b>Tableau 35</b> : Concentration en histamine dans le thon fumé en présence de <i>L. sakei</i> en culture pure ou en co-culture avec <i>M. psychrotolerans</i> (Mp) et <i>P. phosphoreum</i> (Pp) ou avec <i>M. morganii</i> (Mm) et <i>P. damsela</i> (Pd). Les écart-types sont indiqués entre parenthèses pour les échantillons analysés en triplicat. ....	132
<b>Tableau 36</b> : Liste des souches de bactéries productrices ou non d'histamine utilisées dans ce chapitre .....	141
<b>Tableau 37</b> : Liste des produits marins utilisés pour la recherche des 2 espèces de <i>Morganella</i> par la méthode de qPCR en temps réel .....	146
<b>Tableau 38</b> : Antibiotiques utilisés pour le développement du milieu d'enrichissement spécifique. La concentration minimale inhibitrice pour chaque paire d'antibiotiques et de bactéries productrices d'histamine est indiquée entre parenthèses (mg/kg).....	150
<b>Tableau 39</b> : Dénombrement de la flore totale et des entérobactéries sur 6 types de produits achetés au Danemark .....	154
<b>Tableau 40</b> : Taille des gènes cibles, séquences des amorces et taille du produit d'amplification ....	167
<b>Tableau 41</b> : Test de spécificité des amorces réalisées sur des gènes de ménage, de biosynthèse et du cluster HDC de <i>M. psychrotolerans</i> CIP 109403 <sup>T</sup> face à <i>L. sakei</i> LHS 2885.....	175



## **INTRODUCTION GENERALE**



Dix à vingt pour cent des toxi-infections alimentaires sont attribuées à la consommation de produits de la mer. Parmi celles-ci, l'intoxication histaminique est la première cause de toxi-infection alimentaire liée à la consommation de poisson à l'échelle mondiale (Dalgaard *et al.*, 2008).

Les intoxications histaminiques concernent principalement la famille des thonidés, famille de poisson pêchée majoritairement dans le monde à hauteur de 4,4 millions de tonnes par an et en France avec 91 282 tonnes par an (FAO, 2013). La famille des Thonidés regroupe comme espèces principales le thon rouge, le germon, l'albacore, le thon obèse et le listao. Mais la consommation d'autres pélagiques comme le maquereau ou la sardine peut également conduire à des intoxications histaminiques. Le marché du thon se caractérise par des échanges extrêmement importants, tant en matières premières (produits congelés) qu'en produits semi-finis (longes de thon) ou en produits finis (conserves). Ce marché équivaut à environ 3 millions de tonnes (soit les trois quarts des captures) pour une valeur de 10 milliards de dollars (Garrett and Brown, 2009).

La maîtrise de la formation d'histamine dans ces produits est donc très importante, tant en termes d'amélioration de la sécurité sanitaire liée à la consommation de poisson, qu'en termes d'économie pour l'industrie des produits de la pêche.

Dans les aliments, l'histamine se forme par décarboxylation de la L-histidine libre par une enzyme d'origine bactérienne : l'histidine décarboxylase. Après la mort du poisson et dans certaines conditions de stockage, notamment à partir de 7/8°C, les bactéries produisant l'histidine décarboxylase peuvent se multiplier, conduisant à la formation d'histamine, qui peut être très rapide à partir de 12/15°C.

La formation d'histamine dans les poissons dépend de deux facteurs essentiels : la teneur en histidine du poisson et la présence de bactéries capables de synthétiser l'histidine décarboxylase. Ces bactéries responsables de la formation d'histamine peuvent être à la fois mésophiles (*Morganella morganii*, *Hafnia alvei*) ou psychrotolérantes (*Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium phosphoreum*). Les conditions d'hygiène à bord et à terre, lors des manipulations liées à la préparation et à la transformation du poisson sont donc très importantes dans la mesure où elles peuvent contribuer à une contamination du produit par une de ces espèces.

L'histamine est une amine biogène thermostable, elle ne peut pas être détruite par cuisson, ni par appertisation, fumage ou encore congélation.

Actuellement, les deux principaux moyens de limiter la formation d'histamine dans le poisson sont la maîtrise de la chaîne du froid et l'application stricte des règles d'hygiène.

Le froid permet de limiter le développement des bactéries histaminogènes voire de l'arrêter si le poisson est congelé. L'action du froid présente cependant des limites. En effet, certaines bactéries

sont capables de se développer à 0/4°C et de synthétiser l'histidine décarboxylase à basse température. Par ailleurs, le respect de la chaîne du froid est un point critique qui n'est pas toujours maîtrisé.

Éviter la contamination bactérienne des poissons par de bonnes conditions d'hygiène est également nécessaire pour empêcher la formation d'histamine. L'application des règles d'hygiène doit intervenir dès la capture et se poursuivre tout au long du circuit de conservation, de transformation et de commercialisation des poissons. Toutefois, malgré ces moyens mis en œuvre, la fréquence des intoxications histaminiques reste stable ces dernières années.

Dans ce contexte, un projet pour maîtriser la formation d'histamine dans le thon par biopréservation a vu le jour. Ce procédé consiste à inoculer dans un aliment un microorganisme sélectionné pour ses capacités à inhiber la croissance de microorganismes indésirables, sans modifier les caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques du produit initial.

Une partie de cette thèse s'est inscrite dans le cadre du projet « Histabio » financé par FranceAgrimer en relation avec des industriels de la conserverie. Ces industriels rencontrent des problèmes avec l'histamine et ont souhaité développer une méthode de biopréservation en complément de celles utilisées actuellement pour empêcher la formation d'histamine dans leurs produits.

La thématique de biopréservation est développée au laboratoire des Ecosystèmes Microbiens et de la Biomasse Marine pour les Biotechnologies d'IFREMER (EM<sup>3</sup>B) et par l'UMR 1014 Secalim INRA-Oniris. Des stratégies de biopréservation sur du saumon fumé ou de la crevette cuite face à une bactérie pathogène *Listeria monocytogenes* et des bactéries altérantes ont donné des résultats favorables à l'application du procédé de biopréservation sur des produits marins (Brillet *et al.*, 2005a; Fall *et al.*, 2010a, 2010b; Matamoros *et al.*, 2009b). Les recherches menées dans le cadre de cette thèse, se sont donc appuyées sur les connaissances déjà acquises ces 10 dernières années. Cependant, des aspects nouveaux ont été développés tels que l'inhibition de bactéries histaminogènes mésophiles et psychrotolérantes sur de nouvelles matrices : thon cuit et thon fumé, mais aussi par le développement d'outils de biologie moléculaire pour quantifier ces bactéries dans des poissons riches en histidine.

Ce manuscrit débute par une étude bibliographique qui décrit le contexte économique des pêches en se focalisant sur les différentes espèces de thon. L'intoxication histaminique et ses mécanismes sont ensuite décrits plus en détails. Puis les différentes méthodes pour inhiber les flores histaminogènes sont présentées, ainsi que les méthodes d'identification et de quantification par biologie moléculaire.

A la suite de cette étude, les résultats de la maîtrise de la formation d'histamine dans des produits marins vous seront présentés. Dans un premier temps, une collection de bactéries histaminogènes et de bactéries lactiques isolées de produits riches en histidine a été créée. Ces isolats ont ensuite été utilisés pour effectuer un criblage afin de sélectionner des flores bioprotectrices intéressantes.

Plusieurs souches ont été retenues et leur potentiel de biopréservation a été testé sur du thon stérile, du thon cuit et du thon fumé contaminés artificiellement par des bactéries histaminogènes mésophiles et psychrotolérantes. Des analyses microbiologiques, sensorielles et biochimiques ont été effectuées pour déterminer l'efficacité de ces souches face à 5 espèces de bactéries histaminogènes. En parallèle, la méthode HPLC de référence utilisée par l'ANSES pour quantifier la concentration d'histamine a été mise en place au laboratoire EM<sup>3</sup>B.

Dans un deuxième temps, une méthode de quantification sensible et spécifique par PCR temps réel de *M. morgani* et *M. psychrotolerans* avec une étape d'enrichissement a été mise au point en collaboration avec le laboratoire de l'Université Technique du Danemark (DTU Food).

En dernier lieu, des travaux ont été initiés pour comprendre les mécanismes moléculaires de formation de l'histamine chez *M. psychrotolerans* par transcriptomique dans différentes conditions environnementales.





## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE



## Préambule

Dans les années 1950 à 1960, les premières études sur l'intoxication histaminique ont vu le jour. Elles ont porté principalement sur des épidémies survenues en France et au Japon (Boyer *et al.*, 1956; Ferencik *et al.*, 1961; Geiger, 1955; Parrot and Nicot, 1965; Sapin-Jaloustre and Sapin-Jaloustre, 1957).

Les publications scientifiques sur l'intoxication histaminique et la mise en évidence du rôle des bactéries dans cette intoxication ont débuté seulement en 1968 (Fields and Richmond, 1968). Fields a ainsi mis en évidence la relation entre la présence d'histamine et la synthèse d'une enzyme bactérienne par des micro-organismes. La première intoxication histaminique dans le thon fut officiellement reconnue 2 ans plus tard par Ferencik (1970).

Cette problématique est restée peu étudiée entre 1970 et 1990. Seulement 18 articles ont été référencés dans le Web of Knowledge (WoK) avec les mots clés : histamine, fish, bacteria. Les recherches sur l'intoxication histaminique ont réellement commencé à s'accélérer à partir de 1991 jusqu'en 2001, 86 articles ont été publiés en se focalisant sur les poissons impliqués dans des épidémies et l'identification des bactéries histaminogènes.

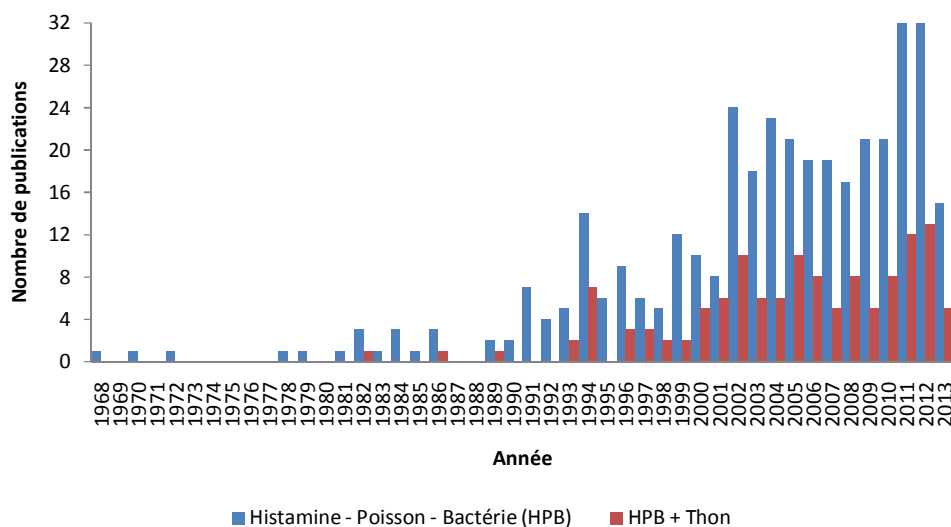


Figure 1 : Publications sur les intoxications histaminiques disponibles sur le Web of Knowledge entre 1968 et 2013

A partir de 2002-2003, les études sur les bactéries histaminogènes se sont intensifiées avec l'utilisation de nouveaux outils moléculaires destinés à leur détection et à leur quantification (Kanki *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003). Ainsi jusqu'en 2010, en moyenne 20 publications/an sont disponibles sur ce sujet. Enfin, une forte production scientifique a pu être observée ces 3 dernières

années avec 32 publications en 2011 et 2012. De même en 2013, 15 publications sur cette problématique sont déjà accessibles (Figure 1).

L'intoxication histaminique reste malgré tout un sujet modérément étudié par rapport à d'autres toxi-infections alimentaires. Au total, 369 publications sont actuellement disponibles sur le WoK sur cette thématique tandis que *Listeria monocytogenes* comptabilise 2280 publications rien qu'en 2012.

Le thon est un mot-clé récurrent dans les publications sur les intoxications histaminiques. En moyenne, 35% des articles y font référence (Fig. 1). Les autres produits impliqués dans les intoxications histaminiques sont les produits fermentés tels les sauces de poisson (nuoc-mâm, rihaakuru). Enfin, entre 1990 et 2013, les travaux dans cette thématique ont été principalement publiés dans Journal of Food Protection (21 articles) puis Food Control (14 articles) et Food Chemistry (13 articles). Le thon reste donc un des vecteurs majeur des intoxications histaminiques.

# Etude bibliographique

## 1. La famille des thonidés

### 1.1. Etymologie et taxonomie

Le terme thon provient du latin *Thunnus*, qui lui-même dérive du grec ancien : θύννος (*thynnos*). Les thons sont de grands poissons pélagiques des eaux chaudes et tempérées. Ils sont classés dans la famille des *Scombridae* qui regroupe 15 espèces divisées en 5 genres (Block and Stevens, 2001) (Tableau 1) :

- Genre *Thunnus* avec 2 sous-groupes :
  - ✓ *Thunnus*
  - ✓ *Neothunnus*
- Genre *Allthunnus*
- Genre *Auxis*
- Genre *Euthynnus*



Figure 2 : Photographie d'un thon albacore dans la zone de pêche du Costa Rica (*T. albacares*) ([www.queposfishadventure.com](http://www.queposfishadventure.com))

### 1.2. Physiologie

Les thons sont des poissons élégants et épurés, taillés pour la nage à grande vitesse. Ils possèdent deux nageoires dorsales étroitement espacées. La première nageoire peut être repliée dans une rainure qui longe le dos (Fig. 2). Sept à dix pinnules jaunes dorsales relient les nageoires à la queue d'une forme semi-lunaire avec des pointes coniques. Le pédoncule caudal auquel est rattachée la queue est très fin avec 3 quilles de stabilisation. Généralement, la partie dorsale revêt une teinte d'une couleur bleue foncée avec des reflets métalliques, tandis que le ventre et les flancs sont

argentés ou blanchâtres. Ces couleurs sont utilisées comme camouflage face aux grands prédateurs comme les requins ou les orques (Block and Stevens, 2001).

Les caractéristiques morphologiques des thons décrites dans le tableau 1 sont très différentes entre les espèces mais aussi au sein d'un même sous-groupe. Par exemple dans le sous-groupe *Thunnus*, le thon rouge de l'atlantique peut atteindre une taille de 4 m de long et peser jusqu'à 700 kg alors que le thon germon a une taille de 1,4 m et un poids maximum de 60,3 kg. Les espèces les plus connues telles que le thon albacore, le thon rouge ou encore le thon blanc, sont regroupées dans le genre *Thunnus*.

Les espèces de thon sont réparties dans tous les océans du monde, généralement dans les eaux tropicales et tempérées à 45 degrés nord et sud de l'équateur. Ces poissons pélagiques sont poïkilothermes et possèdent un système métabolique, appelé *rete mirabile*, qui leur permet de maintenir leurs muscles, leurs yeux et leur cerveau à une température supérieure au milieu environnant. Le *rete mirabile* est un système anatomique de veines et d'artères intimement associées. Ce système fait office d'échangeur thermique, les veines transportent le sang chaud en provenance des muscles et les artères captent la chaleur dissipée par les veines pour réchauffer le sang froid en provenance du cœur et des branchies. Ce système peut aussi faciliter la dissipation thermique et les échanges gazeux. Le maintien d'une température plus élevée pour les organes cités précédemment permet aux thons d'accroître leur vitesse de nage et de réduire les pertes d'énergie, ce qui leur permet de vivre dans de multiples environnements.

A la différence d'autres poissons à la chair blanche, le tissu musculaire du thon est d'une couleur rouge à rouge foncé. Cette différence est liée à la forte vascularisation des muscles et à la production intensive de myoglobine qui permet une oxygénation optimale des muscles. Ces caractéristiques physiologiques font des thons d'excellents migrants mais aussi des sprinters avec des pointes de vitesse pouvant atteindre 80 km/h. Le thon se nourrit de petits poissons de fourrage (ou *mange*), ainsi que d'invertébrés tels des calamars ou des crevettes. Ce poisson se reproduit l'été en pleine eau. Les thons ont un comportement de "homing", c'est à dire qu'ils se reproduisent sur leur lieu de naissance (Block and Stevens, 2001). Les thons sont consommés partout dans le monde et la pêche n'a cessé de croître depuis plusieurs années.

## 2. Le marché du thon : production, échanges, consommation

### 2.1. A l'échelle mondiale

La pêche mondiale de thon a représenté 4,4 millions de tonnes en 2009. Elle est répartie entre 5 grandes espèces (FAO, 2013):

- thon listao (skipjack tuna) : 2 600 000 tonnes
- thon albacore : 1 100 000 tonnes
- thon obèse (bigeye tuna) : 405 000 tonnes
- thon germon : 256 000 tonnes
- thon rouge (bluefin tuna) : 21 tonnes

Les premiers producteurs mondiaux sont l'Indonésie (476 000 tonnes), le Japon (463 000 tonnes), les Philippines (412 000 tonnes) et Taïwan (326 000 tonnes). Depuis le début des années 1950, les captures de thon ont été multipliées par 9 (Fig. 3), grâce au développement des pêcheries d'albacore et de listao, notamment philippines et taïwanaises, ainsi que des pêcheries tropicales des pays européens. Le Japon, même s'il n'est qu'en deuxième position depuis 2009, est le pays incontournable des captures de thon depuis 1950. Il a connu une croissance considérable entre les années 50 et 80, à la faveur du développement industriel du pays. Depuis les années 1990, ses captures se réduisent, du fait de l'essor spectaculaire des pêcheries de Taïwan, Indonésie, Philippines, Corée du Sud et des autres pays asiatiques (FranceAgriMer, 2011).

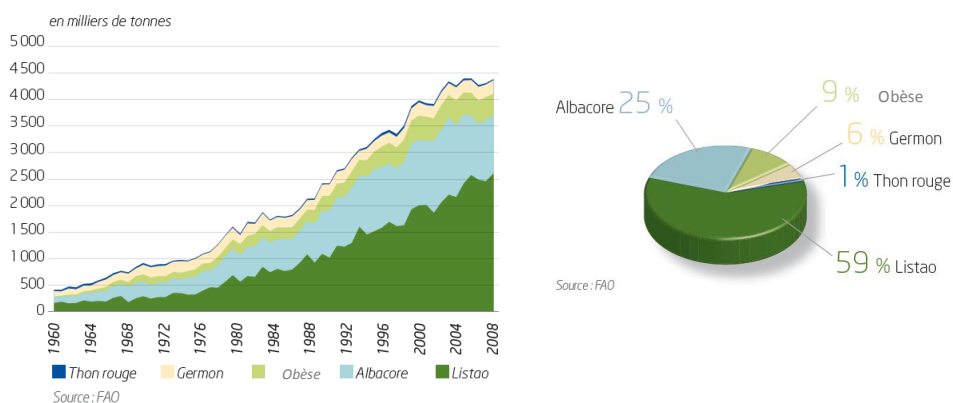


Figure 3 : Production mondiale de thon par espèces (FranceAgriMer, 2011)

Le développement des pêcheries thonières est principalement fondé sur l'essor des captures d'albacore et de listao qui représentent 84 % des volumes pêchés en 2009. Le germon ne représente plus que 6 % des captures (contre 25 % en 1950) et le thon rouge moins de 1% (contre 6 % en 1950) (Fig. 3).

Le marché du thon se caractérise par des échanges extrêmement importants. Il est approvisionné par différents types de pêche : la senne, la palangre, la pêche à la ligne et la madrague (pêche traditionnelle en Méditerranée).

L'approvisionnement du marché en thon est assuré par la distribution de produits frais ou réfrigérés, de produits congelés et de produits à base de thon transformés et conditionnés. Ces produits ont respectivement des valeurs marchandes décroissantes (Fig. 4).

Actuellement, la tendance générale du marché thonier se dirige vers une stabilisation des quantités de pêche, ceci étant lié à l'état du stock et aux possibilités limitées de capture de la ressource. Les stocks de thon sont actuellement entièrement exploités ou même surexploités pour certaines espèces (Tableau 1).

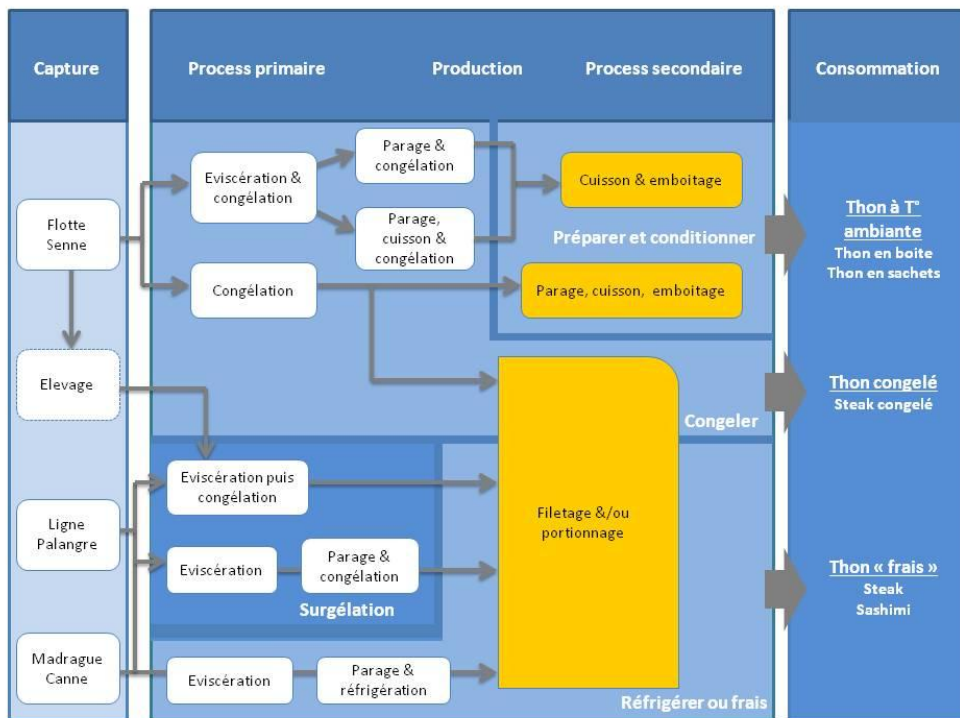


Figure 4 : Voies d'approvisionnement principales en thon (Garrett and Brown, 2009)

La gestion de cette ressource est compliquée car le thon est une espèce migratrice souvent capturée en haute-mer. La régulation de l'exploitation thonière est au-delà de la juridiction d'une nation et se trouve gérée par des organisations régionales de gestion des pêches (ORPG). Les ORPG responsables de la gestion du thon comprennent : La commission Internationale pour la conservation du Thon



Atlantique (ICCAT), la Commission Inter-Américaine du Thon Tropical (IATTC) et la Commission du Thon de l'Océan Indien (IOTC).

Tableau 1 : Liste et caractéristiques physiologiques des espèces de thon du genre *Thunnus* sous-groupe *Thunnus* (IUCN, 2013)

Nom commun	Nom scientifique	Taille maximum	Poids maximum	Age	Niveau trophique <sup>a</sup>	Statut IUCN
<b>Espèces de thon du genre <i>Thunnus</i> sous-groupe <i>Thunnus</i></b>						
Thon germon	<i>Thunnus alalunga</i>	1,4 m	60,3 kg	9 - 13 ans	4,31	NT
Thon rouge	<i>T. maccoyii</i>	2,45 m	260 kg	20 - 40 ans	3,93	CR
Thon rouge du Pacifique	<i>T. orientalis</i>	3,0 m	450 kg	15 - 26 ans	4,21	LC
Thon rouge de l'Atlantique	<i>T. thynnus</i>	4,6 m	684 kg	35 - 50 ans	4,43	EN
Thon obèse	<i>T. obesus</i>	2,5 m	210 kg	5 - 16 ans	4,49	VU
<b>Espèces de thon du genre <i>Thunnus</i> sous-groupe <i>Neothunnus</i></b>						
Thon à nageoires noires	<i>T. atlanticus</i>	1,1 m	22,4 kg	NC	4,13	LC
Thon à longue queue	<i>T. tonggol</i>	1,45 m	35,9 kg	18 ans	4,50	DD
Albacore	<i>T. albacares</i>	2,4 m	200 kg	5 - 9 ans	4,34	NT
<b>Autres espèces de thon</b>						
Thon mince	<i>Allothunnus fallai</i>	1,05 m	13,7 kg	NC	3,74	LC
Bonitou	<i>Auxis rochei rochei</i>	0,5 m	1,8 kg	5 ans	4,13	LC
Auxide	<i>Auxis thazard thazard</i>	0,65 m	1,7 kg	5 ans	4,34	LC
Thonine	<i>Euthynnus alletteratus</i>	1,2 m	16,5 kg	10 ans	4,13	LC
Listao noir	<i>E. lineatus</i>	0,84 m	11,8 kg	NC	3,83	LC
Thon listao	<i>Katsuwonus pelamis</i>	1,1 m	34,5 kg	6 - 12 ans	3,75	LC

 Menacé
  Danger critique
  Non concerné
  En danger
  Vulnérable

<sup>a</sup>: Le niveau trophique représente le rang qu'occupe un être vivant dans la chaîne alimentaire

Afin d'accroître la production, l'aquaculture pourrait être la solution. Cependant, l'élevage de thon après capture en pleine mer est uniquement pratiqué par l'Australie ou l'Indonésie. L'aquaculture à proprement parler du thon est encore au stade de développement et n'est fonctionnelle qu'en

laboratoire. La mise en place d'un tel procédé devient économiquement intéressante pour les industriels avec l'augmentation de la valeur du thon au fil des années.

## 2.2. A l'échelle Française

En 2008, les filières de la pêche et de l'aquaculture françaises ont produit 707 170 tonnes de produits marins (438 680 tonnes de poissons, 238 750 tonnes de coquillages, 16 200 tonnes de crustacés et 19 540 tonnes de céphalopodes). Ce secteur a une valeur de 1 700 millions d'euros dont 1 060 millions sont associés à la vente de poissons.

Les principaux produits marins vendus et leurs valeurs financières en 2008 sont visibles sur la figure 5.

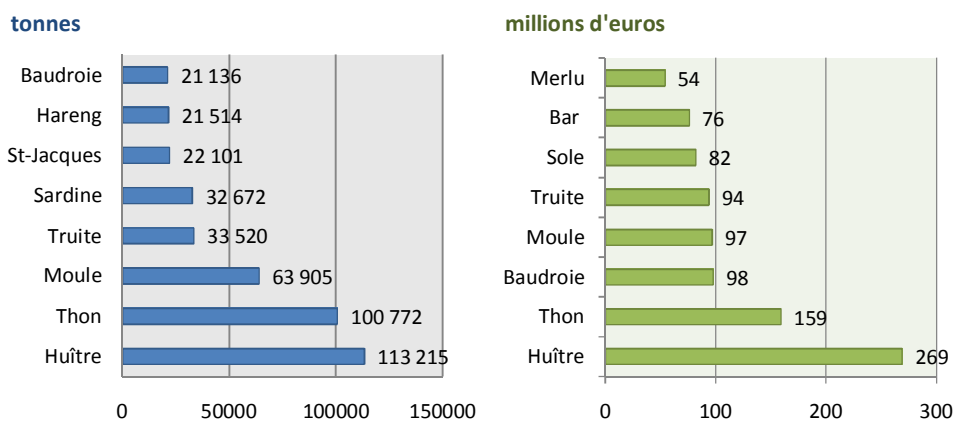


Figure 5 : Principales espèces vendues en 2008 par tonnes et par valeurs (ANSES, 2012)

Le thon est le poisson le plus vendu en France avec 100 772 tonnes en 2008, pour une valeur de 159 millions d'euros.

La production française annuelle de thon se décompose en différents segments :

- ✓ la pêche au thon tropical qui représente 99 720 tonnes sous la forme de :
  - thon tropical congelé et saumuré, destiné à la fabrication de conserves (espèces albacore, obèse, listao et germon)
  - thon tropical congelé non saumuré ou frais (espèces albacore, obèse et listao)
- ✓ la pêche au thon germon frais (900 tonnes)
- ✓ la pêche au thon rouge frais est un segment particulier. La production française représente 30 % de la production mondiale en 2009 (6375 tonnes). Plus de 90 % de cette production est pêchée dans la Méditerranée et exportée au Japon en frais (Ifremer, 2008).

Comme décrit précédemment, la pêche au thon peut être réalisée par différents moyens. La production de thon tropical est assurée par 25 thoniers senneurs congélateurs sous pavillon français, regroupés dans l'organisation de producteurs Orthongel, dans les océans Atlantique et Indien. La très

grande majorité de la production est débarquée directement dans les pays transformateurs, principalement sur le continent africain. La pêche au thon germon est essentiellement pratiquée dans le Golfe de Gascogne et a été marquée par une grande variabilité dans sa production au cours des dernières années.

Les échanges de thon et les principaux débouchés sur le marché français sont associés au thon congelé. Ce thon est représenté par 2 provenances distinctes : le thon tropical et le thon germon. Le thon tropical congelé en saumure a représenté 98 000 tonnes de poisson pour une valeur de 90 millions d'euros en 2010. Cette ressource est exportée vers des pays à proximité des zones de production (Seychelles, Maurice, Côte d'Ivoire) ou transférée vers des pays de l'UE dotés de conserverie comme l'Espagne et l'Italie pour y être emboîtée. Plus rarement, des exportations sont réalisées vers des conserveries en Thaïlande.

En complément, la France importe 100 000 tonnes de conserves par an d'Espagne, de Côte d'Ivoire, des Seychelles et de l'Equateur.

Sept mille tonnes de thon albacore sont importées congelées. Quatre vingt-dix % de ce volume sont destinés à la conserverie, seul 10 % sont destinés aux produits frais ou à la confection de sushis. A ces volumes, s'ajoutent environ 8 000 tonnes de longes précuites congelées en provenance du Ghana, de Thaïlande et d'Equateur qui sont envoyées en conserverie. Enfin, des longes de thon albacore réfrigérées sous vide de 2 à 5 kg sont importées par avion à hauteur de 2 000 à 2500 tonnes par an, pour le rayon frais ou les restaurants sushis.

**Tableau 2 : Destination selon les espèces de thon pour la transformation en conserves**

Espèces + volumes mis en œuvre (eq. entier)	Produits	Marché	Technologie
<b>Germon (3 000 t)</b>	Thon blanc au naturel ou à l'huile d'olive	Français ( <i>Haut de gamme</i> )	NC
<b>Albacore (8 500 t)</b>	Thon au naturel	Français	Emboîté à cru
	Thon à l'huile d'olive	Italien ( <i>Haut de gamme</i> ) Espagnol ( <i>Haut de gamme</i> )	Pré-cuit
<b>Listao (16 500 t)</b>	Salades	Français	Cuit entier, paré, mis en longes puis en conserve
	Miettes	Français	Cuit entier, paré, mis en longes puis en conserve
	Thons à l'huile	Français ( <i>Bas de gamme</i> ) Italien ( <i>Bas de gamme</i> ) Espagnol ( <i>Bas de gamme</i> )	Cuit entier, paré, mis en longes puis en conserve

NC : Non communiqué

Le thon germon congelé produit par la flotte française est destiné majoritairement à la conserverie. Une faible part de la production est livrée fraîche et mise sur le marché national soit pour la

conserverie en particulier le germon pêché par chalut, ou sur le marché du frais lorsqu'il est pêché à la ligne.

Le marché du thon frais représente une part très faible de la production française qui se base principalement sur le marché de la conserverie. L'industrie de transformation thonière est représentée par 13 entreprises qui ont travaillé 28 000 tonnes de poisson brut et qui ont fabriqué environ 177 millions de boîtes de conserve en 2010. La majorité de la matière première arrive sous forme de longes (75%) de l'espèce listao qui possède le rapport qualité-prix le plus faible. Les salades de thon représentent le plus gros segment de la conserverie avec 64 % des volumes, suivies par les hors-d'œuvre avec 18% des fabrications.

Suivant la matière première, différents procédés de transformation sont employés pour obtenir des produits de différentes gammes. Les produits hauts de gamme sont composés de thon albacore ou de thon germon et correspondent à du thon au naturel ou à l'huile d'olive mais sans transformation particulière de la chair. Les produits bas de gamme sont fabriqués à partir de thon listao cuit entier qui sont transformés sous forme de miettes de thon, de salades ou encore en thon à l'huile (Tableau 2).

Le thon est le poisson le plus consommé en France avec environ 220 000 tonnes disponibles en 2010 sur le marché français. Les achats de thon par les ménages sont à 94% associés aux produits en conserves. Les achats en rayon frais représentent 4 % et 2 % pour les surgelés.

La consommation de conserves porte principalement sur du thon au naturel (53 % des parts de marché volume), puis viennent les miettes de thon (21 %) et les salades au thon (15 %).

La consommation de thon frais est très régionalisée et se situe près des zones de pêche. Le coût de ce produit est très élevé, les achats sont donc majoritairement liés à des foyers âgés et aisés. Les achats de thon sont souvent saisonniers avec une recrudescence en été pour la préparation de salade ou la consommation de thon grillé au barbecue.

Les produits marins sont reconnus par la communauté comme des produits nutritifs et bénéfiques pour la santé. Le thon n'y fait pas exception et se révèle être une source de protéines faible en cholestérol. Sa chair regorge d'éléments essentiels dont le phosphore et le sélénium (oligo-élément) et des vitamines A, D et B. Plus particulièrement, le thon rouge possède des teneurs élevées en acide gras polyinsaturés oméga-3 dont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA). Ces acides gras ont un effet reconnu sur la diminution des risques cardio-vasculaires.

L'ANSES a recommandé la consommation de 2 portions de poissons par semaine dont un poisson gras (saumon, sardine, maquereau) afin de varier son alimentation mais aussi afin de réduire les

risques liés aux contaminants chimiques (ANSES, 2013). Malgré cela, les produits marins sont aussi des produits à risque et 10 à 20% des toxi-infections alimentaires leur sont attribuées. Des épidémies d'intoxications alimentaires liées à leur consommation sont très largement répandues à travers le monde. De plus, la consommation de poisson doit rester modérée, pour suivre une alimentation variée, mais aussi pour prévenir le risque de contamination au mercure. En effet, dans certaines régions et plus particulièrement au Japon, le plancton possède de fortes proportions de mercure. Suivant la chaîne alimentaire les petits poissons qui auront consommé ce plancton, seront dévorés par des prédateurs tels que le thon. Ce processus va provoquer une bio-accumulation du mercure qui va alors représenter un risque pour le consommateur.

### **3. Les risques liés à la consommation de produits marins**

De multiples risques ont été associés à la consommation de poissons, crustacés ou mollusques incluant des intoxications liées à la présence de produits chimiques, de toxines biologiques, ou d'allergènes. Cependant, le risque principal relié aux produits marins s'appuie sur la contamination par des agents microbiens. Les virus entériques (*Entérovirus*, *Norovirus*) présents dans les eaux usées sont les principaux contaminants des mollusques bivalves. Pour les poissons, les risques majeurs sont liés à des bactéries pathogènes et des activités bactériennes permettant la formation d'amines biogènes (Børresen, 2008).

#### **3.1. Le risque microbiologique dans les poissons marins**

La chair d'un poisson sain et vivant est considérée comme stérile car le système immunitaire prévient la prolifération des micro-organismes. A la mort du poisson, les bactéries peuvent proliférer librement suite à l'arrêt du système immunitaire. La microflore du poisson en tant que produit alimentaire est donc constituée de sa flore endogène et de celle de l'environnement de transformation du produit. Dans ce cadre, le risque microbiologique est lié à la consommation de produits contaminés par des pathogènes pouvant provenir d'eaux usées, de fèces humains mais aussi de l'environnement.

En 2011, 5648 toxi-infections alimentaires ont été répertoriées en Europe (EFSA, 2013). Dix % de ces toxi-infections alimentaires ont été attribuées à la consommation de poissons marins alors que les mollusques et les crustacés ont été responsables de 6 % des épidémies. La plupart des épidémies liées à la consommation de poisson sont d'origine bactérienne, alors que la majorité des épidémies dans les mollusques sont liées à des virus, en particulier chez les mollusques bivalves qui se nourrissent par filtration (Lee et Rangdale, 2008). Tout comme les autres aliments, les produits de la

mer peuvent être recontaminés au cours du procédé de transformation par des bactéries, telles que *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* entéro-hémorragique, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* ou *Yersinia enterocolitica* (Tableau 3). Certains de ces micro-organismes, notamment les salmonelles et les virus, peuvent aussi être présents dans les eaux côtières et les estuaires souillés par les activités humaines ou dans les bassins d'aquaculture, si la qualité de l'aliment n'est pas contrôlée.

Cependant, des bactéries endogènes présentes dans le milieu marin peuvent être responsables de maladies plus spécifiques. C'est le cas des bactéries productrices d'histamine, de certains *Vibrio*, de *L. monocytogenes*, de *Clostridium botulinum* et d'*Aeromonas hydrophila*. En temps normal, ces bactéries ont une concentration trop faible dans l'aliment pour provoquer une maladie. D'autre part, une cuisson appropriée permet de les éliminer. Par conséquent, le risque porte essentiellement sur les produits dans lesquels la croissance de ces bactéries est possible pendant la période de conservation et qui sont consommés crus ou insuffisamment cuits (Tableau 3).

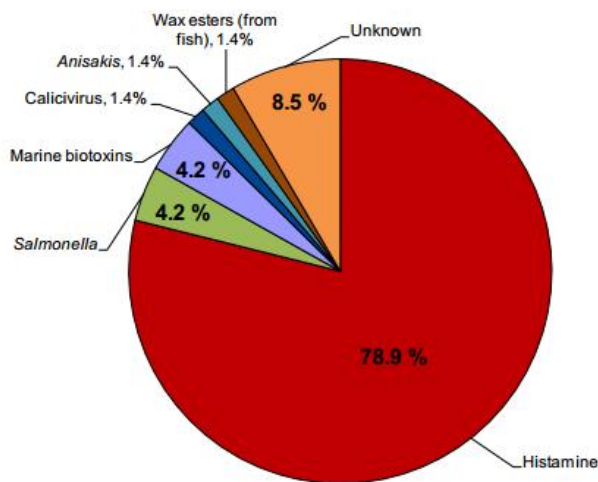


Figure 6 : Distribution des toxi-infections alimentaires liées à la consommation de produits marins en Europe en 2011 (EFSA, 2013)

Les bactéries qui contaminent le poisson après l'abattage et pendant la transformation sont en partie issues de l'animal ou du milieu marin ce qui explique leur caractère psychrotrophe leur permettant de se développer aux températures de réfrigération des produits. Par ailleurs, du fait de son pH élevé ( $\pm 6$ ) et de la disponibilité d'une quantité importante d'azote non protéique (acides aminés libres, nucléotides, OTMA) comme substrat de croissance, le poisson constitue un milieu très favorable au développement des micro-organismes.

En 2011, l'intoxication histaminique est reliée à 78,9 % des toxi-infections alimentaires liées à la consommation de poissons, Salmonella et les toxines marines n'ont représenté que 4,2 % tandis que 8,5 % des épidémies n'ont pas d'agents identifiés (Fig. 6). *L. monocytogenes* est considéré comme un pathogène majeur dans les produits de la mer légèrement préservés et consommés crus, comme le carpaccio, les poissons fumés ou légèrement marinés ou encore les crevettes cuites emballées sous atmosphère protectrice. La prévalence de *L. monocytogenes* dans ces produits est élevée. Malgré cela, on recense peu de cas de listériose dus aux produits de la mer prêts à être consommés, tel qu'en 2011 où cette maladie a représenté moins de 0,8 % des épidémies. Ce pathogène reste cependant sous haute surveillance et il est inclus dans les critères de sécurité microbiologique qui sont applicables à certains produits de la mer. Concernant les denrées prêtes à être consommées notamment, le règlement (CE) n°1441/2007 indique un seuil inférieur à 100 UFC/g de *L. monocytogenes*. Cette valeur limite est acceptée uniquement s'il est démontré qu'elle sera respectée pendant toute la durée de conservation. Si ce n'est pas le cas, il doit y avoir absence de *L. monocytogenes* dans 25 g de produit.

Le genre *Vibrio* comprend 80 espèces, dont les principales espèces pathogènes sont *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*. Ces espèces bactériennes mésophiles et halophiles sont présentes dans les eaux tropicales et les eaux tempérées à la fin de l'été. A des températures supérieures à 8°C, leur vitesse de croissance est très élevée. Ces espèces dont la dose infectieuse est de l'ordre de 10<sup>6</sup> UFC/g ont été responsables de nombreuses épidémies avec un nombre de cas importants. Cependant, les poissons et crustacés sont moins souvent incriminés que les bivalves filtreurs (Le Fur *et al.*, 2013).

Lors de la dernière décennie, l'intoxication histaminique fut la première cause de toxi-infection alimentaire liée à la consommation de produits marins en étant responsable de plus de 50% des épidémies. Malgré, l'application stricte des critères de sécurité, la production d'histamine est un problème récurrent de ce secteur industriel. La communication sur ce sujet est souvent superficielle et les autorités s'appliquent davantage sur d'autres problématiques tel que *L. monocytogenes* ou *Salmonella* (EFSA, 2011).

Tableau 3 : Dangers bactériens associés aux produits marins (Børresen *et al.*, 2008)

Types de toxi-infections	Agent responsable	Incubation	Signes et symptômes
		Durée	
<b>Toxi-infections</b>	<i>Salmonella</i> spp	1 à 10 J <u>4 semaines</u>	Malaise, maux de tête, fièvre, nausée, diarrhée, douleurs abdominales, selles sanglantes
	<i>Shigella</i> spp.	24 - 72 h <u>5 à 7 J</u>	Douleurs abdominales, diarrhée, selles sanglantes et muqueuses
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2 à 48 h <u>2 à 14 J</u>	Douleurs abdominales, diarrhée, nausée, vomissement, maux de tête, fièvre, frissons, maux de tête
	<i>Vibrio vulnificus</i>	16 h en moyenne <u>2 à 3 J</u>	Malaise, frissons, fièvre, prostration, lésions cutanées, décès
	<i>Vibrio cholerae</i>	1 à 5 J <u>2 à 5 J</u>	Diarrhée liquide, vomissement, douleurs abdominales, déshydratation
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3 à 90 J <u>NC</u>	Fièvre, douleurs musculaires, nausée ou diarrhée, infection du système nerveux central, maux de tête, convulsions
	<i>E. coli</i> O157	6 à 24 h <u>5 à 10 J</u>	Diarrhée hémorragique, crampes abdominales Syndrome hémolytique et urémique (chez les enfants)
	<i>Clostridium perfringens</i>	8 à 22 h < 24 h	Crampes abdominales et diarrhée
	<b>Intoxications</b>	<i>Clostridium botulinum</i>	18 à 36 h NC
<i>Staphylococcus aureus</i>		4 à 6 h NC	Nausée, vomissement et crampes abdominales
<i>Bacillus cereus</i>		6 à 15 h <u>24 h</u>	Diarrhée liquide, Crampes abdominales et douleurs

### 3.2. L'histamine et les amines biogènes

L'histamine qui représente donc la cause majoritaire des toxi-infections liée à la consommation de poissons est une amine biogène.

#### 3.2.1. Définition

Les amines biogènes sont des composés azotés de faibles poids moléculaires formées principalement par décarboxylation d'acides aminés ou par transamination d'aldéhydes ou de cétones (Fig. 7)



(Prester, 2011). Elles peuvent être formées par le métabolisme de végétaux, d'animaux ou encore de micro-organismes.

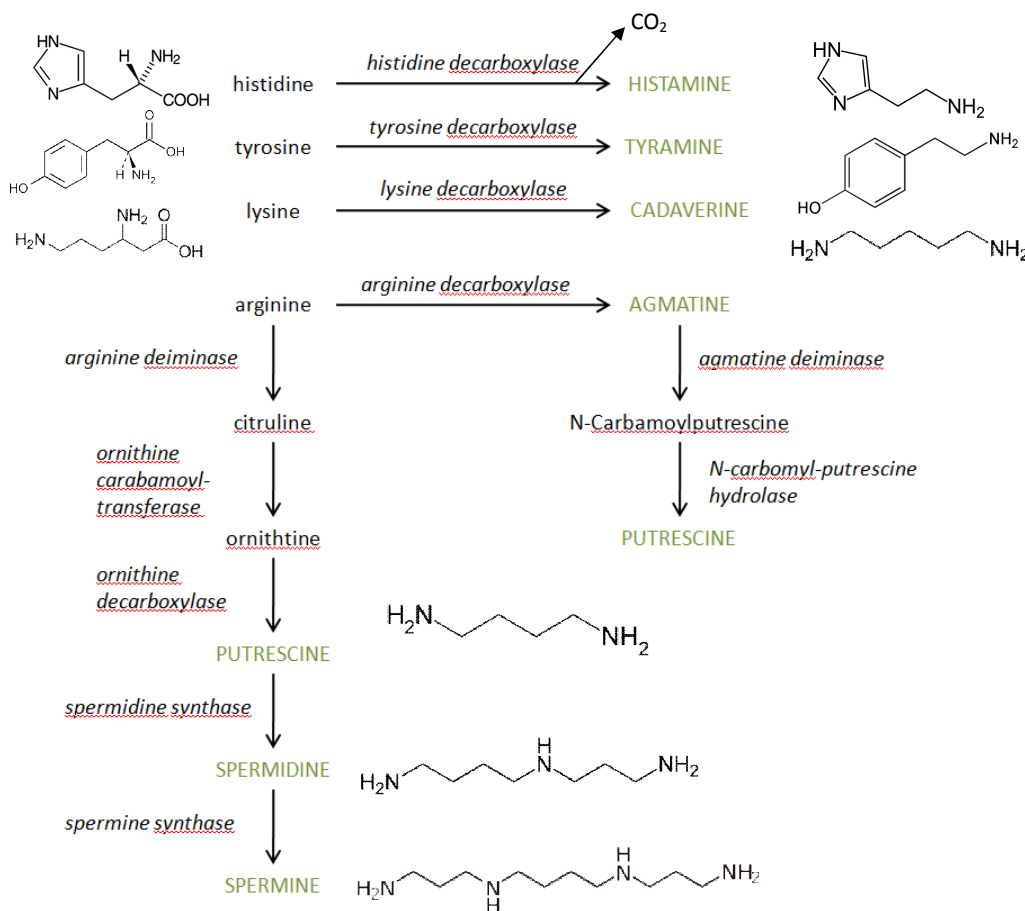


Figure 7: Synthèse de l'histamine, tyramine et d'autres amines biogènes (putrescine, spermidine, spermine) (Prester, 2011)

Cette production d'amines biogènes est liée à 3 principes : la disponibilité d'acides aminés libres, la présence de microorganismes producteurs de décarboxylases et des conditions environnementales propices à la croissance des bactéries, la synthèse et l'activité des décarboxylases. Si toutes ces conditions sont remplies, différentes amines biogènes sont produites.

Elles peuvent être aliphatiques (putrescine, cadavérine, spermine, spermidine), aromatiques (tyramine,  $\beta$ -phényléthylamine), ou hétérocycliques (histamine, tryptamine) (Maijala *et al.*, 1993) (Fig. 7) (Ten Brink *et al.*, 1990). Les amines biogènes sont classées en fonction du nombre de groupements aminés ( $\text{NH}_2$ ) en diamines (histamine, putrescine, cadavérine), en monoamines ( $\beta$ -phényléthylamine, tyramine, tryptamine) ainsi qu'une polyamine (agmatine). Les amines biogènes

jouent un rôle important dans la physiologie des animaux ou de l'homme. Elles interviennent dans la régulation de la température corporelle, du volume et du pH de l'estomac, ainsi que dans la régulation du système nerveux central et de la pression sanguine. D'autre part, la spermine, spermidine et putrescine sont des composés essentiels des cellules vivantes, elles jouent un rôle très important dans la régulation des acides nucléiques et la synthèse des protéines ainsi que dans la stabilisation des membranes (Ten Brink *et al.*, 1990).

### 3.2.2. L'histamine

L'histamine est un messenger. Elle est ubiquitaire et distribuée dans les mastocytes, les cellules entérochromaffines et les neurones. L'histamine se fixe à des récepteurs histaminergiques et son action est modulée sur 4 récepteurs H1, H2, H3 et H4. De plus, l'histamine se fixe au cytochrome P450s qui est un ensemble d'enzymes métaboliques cruciales (Maintz and Novak, 2007).

La fixation de l'histamine à ces récepteurs entraîne plusieurs réactions métaboliques essentielles au corps humains telles que le contrôle des sécrétions gastriques acides jusqu'au mécanisme de neurotransmission du système nerveux central (Hungerford, 2010). D'autres fonctions qui peuvent être reliées à certains symptômes d'une intoxication incluent la médiation de la perméabilité vasculaire et la sécrétion de mucus, l'immunomodulation mais aussi l'hématopoïèse, la guérison de certaines plaies, le rythme jour/nuit et l'angiogenèse de certains cancers. Il peut aussi arriver que l'histamine joue un rôle dans des ischmies intestinaux (Fig. 8).

Certaines des réponses modulées par les récepteurs histaminergiques tels que la vasodilatation, la contraction des muscles lisses, l'altération de la pression sanguine, la stimulation de récepteur nerveux nociceptif, la tachycardie et l'arythmie semble être corrélées avec les symptômes d'une intoxication histaminique.

Ces réponses sont modulées par certains récepteurs (Fig. 8) :

- récepteur H1 et H2 : ils sont responsables de l'apparition des symptômes caractéristiques d'une intoxication histaminique tel que l'urticaire, les démangeaisons, les rougeurs et la modification du rythme cardiaque.
- récepteur H3 : il module la libération de neurotransmetteur. La fixation d'histamine sur ce récepteur induit des maux de tête, des nausées et des vomissements.
- récepteur H4 : son rôle est encore inconnu.

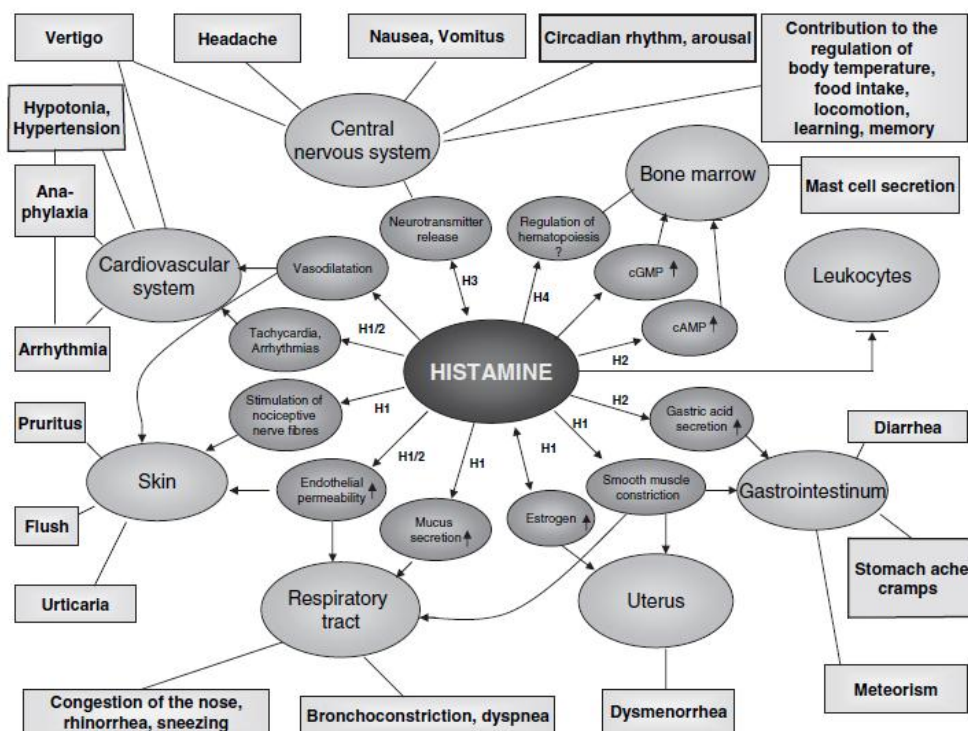


Figure 8 : Schématisation des symptômes provoqués par l'histamine (Maintz and Novak, 2007)

La monoamine oxydase (MAO), la diamine oxydase (DAO) et l'histamine N-méthyl transférase (HNMT) sont les trois enzymes qui métabolisent l'histamine chez l'être humain. La DAO est sécrétée par les cellules dans la circulation sanguine tandis que l'HNMT est produite dans le cytosol. La DAO est la principale enzyme de catabolisme de l'histamine qui est alors dégradée en imidazole acétate (Maintz and Novak, 2007).

### 3.2.3. 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'H<sub>2</sub>S, TMA et ammoniac. En conséquence, elles peuvent être utilisées dans certains cas comme indicateur de la qualité.

Le rôle des amines biogènes comme indicateur de qualité est assez controversé. Ainsi, il a été proposé que la production d'amines biogènes était corrélée à l'altération du poisson. 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 précurseurs. En revanche, la putrescine et la cadavérine sont produites à la fois par les enzymes endogènes de l'aliment et celles des microorganismes. Un indice dénommé Index en Amines Biogènes (BIA) (Baixas-Nogueras *et al.*, 2005) utilise les principales amines biogènes pour calculer un index de dégradation du produit selon l'équation (1) :

$$(1) \quad BIA = \frac{0,25 \times [H] + 0,25 \times [P] + 0,25 \times [C] + 0,25 \times [T]}{[H] + [P] + [C] + [T]} \times 100$$

Cet index a été utilisé sur du thon en boîte par Veciana-Nogués (1997). Un autre indice nommé Index d'Amines (IA) est défini selon l'équation (2). Duflos *et al.* (1999) ont déterminé qu'un index inférieur à 25 suivant cette équation était synonyme d'un produit de bonne qualité. Ces indices sont cependant dépendants de la matrice et demandent à être adaptés à chaque espèce.

$$(2) \quad IA = \frac{[H] + [P] + [C] + [T]}{[H] + [P] + [C] + [T] + [A] + [S] + [D]} \times 100$$

Dans le saumon, un nouvel index a été mis au point par (Jørgensen *et al.*, 2000a). Cet index a démontré une bonne correspondance avec l'analyse sensorielle en se basant sur l'histamine, la cadavérine, la putrescine, la tyramine et le pH.

A l'heure actuelle, ces index ne sont pas utilisés en routine pour déterminer la qualité des produits. En revanche, pour des raisons sanitaires, l'histamine est réglementée.

#### 4. L'intoxication histaminique

L'intoxication histaminique s'apparente à une pseudo-allergie alimentaire engendrée par l'ingestion d'aliments contaminés par de fortes concentrations d'une amine biogène telle que l'histamine. Des intoxications ont été répertoriées suite à la consommation de fromages, de vins, de saucissons (viandes rouges fermentées) mais aussi de poissons frais ou de sauces à base de poissons fermentés (Bartowsky and Stockley, 2011; Dalgaard *et al.*, 2006; Ferencik, 1970; Kim, 1979; Kim *et al.*, 2002a; Rosi *et al.*, 2009; Schirone *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2013).

L'histamine est formée, lors de la maturation du fromage, de la fermentation du vin ou des sauces de poissons et à la mort du poisson, par l'histidine décarboxylase. Cette enzyme bactérienne peut-être synthétisée par des bactéries à Gram négatif ou positif.

Dans les poissons, les bactéries histaminogènes sont des bactéries à Gram négatif de la famille des Entérobactéries ou des Vibrionacées mais des bactéries à Gram positif ont aussi été retrouvées dans les sauces de poissons ayant subi une maturation enzymatique. De même, dans le vin et le fromage

qui sont eux aussi des produits fermentés, ce sont des bactéries à Gram positif de la famille des Entérocoques, Lactobacilles ou encore des Staphylocoques qui sont responsables de la formation d'histamine (Brillantes *et al.*, 2002; Diaz-Cinco *et al.*, 1992; Emborg *et al.*, 2002; Guerrini *et al.*, 2002; Hernandez-Herrero *et al.*, 1999; Shozen *et al.*, 2012; Stratton *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 2005; J Yongsawatdigul *et al.*, 2007; Zaman *et al.*, 2011).

#### 4.1. Symptômes, mécanismes d'actions et dose toxique

##### 4.1.1. Tableau clinique de l'intoxication histaminique

Les symptômes d'une intoxication histaminique apparaissent souvent lors du repas, entre 10 minutes et 1 heure après l'ingestion de l'aliment contaminé (Hungerford, 2010).

Les symptômes observés sont variables selon la personne et la dose d'histamine ingérée. Les symptômes spécifiques de cette intoxication sont caractérisés par une sensation de goût poivré ou métallique, un engourdissement de la bouche, une modification de la pression sanguine, des maux de tête, des palpitations et des étourdissements, des difficultés à déglutir et une sensation de soif (Taylor *et al.*, 1989).

Les patients rencontrent aussi des symptômes proches d'une allergie alimentaire tels que des éruptions cutanées (Fig. 9), de l'urticaire, des sueurs et un gonflement du visage (Kim, 1979; Taylor *et al.*, 1989). D'autres cas ont aussi présenté des atteintes au niveau du système nerveux central avec des phénomènes d'anxiété (Russell and Maretic, 1986; Specht, 1998). Ce sont les principaux symptômes qui permettent d'identifier une intoxication histaminique mais d'autres symptômes communs à d'autres toxi-infections alimentaires sont aussi ressentis tels des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et des diarrhées.

Ces symptômes disparaissent généralement spontanément en quelques heures, avec une moyenne de l'ordre de 3 heures et n'excédant que très rarement plus de 24 heures. Ils peuvent exceptionnellement durer quelques jours et parfois conduire à l'hospitalisation ou à la mort dans les cas les plus graves, touchant principalement des personnes ayant des déficiences cardiaques (Gilbert *et al.*, 1980).

Aucune corrélation n'a pu être établie entre les concentrations d'histamine ingérées et les symptômes rencontrés chez les patients (Hungerford, 2010). Différents acteurs scientifiques ont donc tenté de comprendre les mécanismes de l'intoxication et les variations observées entre les consommateurs.



Figure 9 : Eruptions cutanées chez un patient victime d'une intoxication histaminique

#### 4.1.2. Mécanismes de l'intoxication et traitement

Les effets physiologiques de l'histamine incluent une dilatation des vaisseaux sanguins et des capillaires, une augmentation de la perméabilité des capillaires, une contraction des muscles lisses intestinaux ainsi qu'une augmentation du rythme cardiaque. Ces effets expliquent les principaux symptômes de l'intoxication. Cependant, les mécanismes de l'intoxication histaminique sont encore méconnus. Quatre hypothèses ont été émises (Børresen, 2008; Hungerford, 2010) (Fig. 8) :

1. Inhibition-potentialisation : effet potentiateur d'autres amines biogènes (cadavérine, putrescine) qui induisent un blocage des enzymes de dégradation de l'histamine.
2. Dégranulation des mastocytes : libération de fortes concentrations d'histamine dans le plasma par libération de l'histamine contenue dans les mastocytes
3. Fixation de l'histamine à d'autres récepteurs
4. Intolérance à l'histamine : déficience en DAO (diamine oxydase) et HNMT (Histamine N-MethylTransferase) qui conduit à une incapacité de l'organisme à dégrader l'histamine

La majeure partie des consommateurs atteints d'une intoxication histaminique souffrent de symptômes de faible amplitude qui ne nécessitent aucun traitement médical. Un traitement à base d'antihistaminiques est administré uniquement lors d'hospitalisations (Hungerford, 2010). Ces anti-histaminiques comme le diphenhydramine ont pour rôle de bloquer les récepteurs H1, H2 pour stopper les mécanismes d'actions de l'histamine.

#### 4.1.3. Dose toxique

Les concentrations en histamine mesurées lors d'épidémies sont listées dans le tableau 4. D'après ces teneurs, la FDA (Food and Drug Administration) a défini la dose toxique de l'histamine pour laquelle n'importe quelle personne sera intoxiquée et développera des symptômes à 500 mg/kg. En effet, 91 % des intoxications alimentaires sont liées à des concentrations supérieures à ce seuil.

Néanmoins, des cas d'intoxications ont été recensés à des teneurs inférieures à la dose toxique. Ces cas peuvent être liés à la sensibilité des individus et dans certains cas à une intolérance à l'histamine. D'autre part, la présence d'amines biogènes telles que la putrescine et la cadavérine ont un effet potentiateur qui peut amoindrir la dose toxique (Hungerford, 2010).

Tableau 4 : Aperçu des épidémies (n = 142) et des cas (n = 1998) d'intoxications histaminiques en fonction de la concentration en histamine dans différents poissons (Emborg *et al.*, 2005)

Histamine (mg/kg)	Epidémies		Nombres de cas		Poissons impliqués
	Nombres	%	Nombres	%	
> 5000	14	10	98	5	Escolier, kahawai, kingfish, marlin, sanma, thon, thon albacore
1000 - 5000	66	47	937	47	Anchois, tassergal, sériole, escolier, kahawai, maquereau, mahi-mahi, marlin, sardine, thon rouge, espadon, thon, voilier
500 - 1000	23	18	772	39	Anchois, orphie, kahawai, mahi-mahi, maquereau, marlin, sardine, thon
< 500	36	25	191	9	Anchois, bonite, escolier, maquereau, mahi-mahi, sardine, thon rouge, thon listao, saumon

Enfin, l'ingestion d'histamine pure par voie orale a été étudiée. Les résultats observés sont très différents de ceux en aliments car l'efficacité d'absorption par le tractus digestif est beaucoup moins importante. De plus, l'absence d'autres amines biogènes souvent produites en parallèle de l'histamine augmente les teneurs nécessaires pour l'apparition des symptômes (Maintz *et al.*, 2007).

#### 4.2. Données et statistiques des intoxications histaminiques

##### 4.2.1. Données et statistiques mondiales

Une toxi-infection alimentaire collective est définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. Les toxi-infections alimentaires liées à l'histamine impliquent généralement moins d'une dizaine d'individus. Cependant, le nombre de cas est encore sous-déclaré pour plusieurs raisons :

- ✓ Plusieurs pays ne collectent pas d'informations sur cette intoxication comme l'Italie ou l'Espagne en Europe. Les statistiques les plus fiables sont disponibles aux Etats-Unis et en Angleterre même si la France tend à rattraper son retard avec la mise en place du logiciel WinTIAC qui référence les toxi-infections alimentaires depuis 2006
- ✓ Les symptômes sont modérés et leur disparition rapide n'entraîne pas forcément une visite chez un médecin
- ✓ L'intoxication est parfois considérée comme une allergie alimentaire suite à une erreur de diagnostic
- ✓ Les données récoltées sont liées à des épidémies et les cas individuels ne sont quasiment jamais répertoriés

En 2011, l'EFSA a décrit dans son rapport annuel que 78,9 % des toxi-infections alimentaires liées à la consommation de poissons étaient dues à l'histamine sur un total de 71 épidémies.

A l'échelle mondiale, différents organismes ont pour but de recenser les épidémies liées à des toxi-infections alimentaires. Des données sont disponibles depuis 1967. Le tableau 5 présente les intoxications histaminiques recensées entre 1950 et 2011 obtenues auprès du CDC des Etats-Unis (Center for Disease Control) et de l'ANSES en France.

**Tableau 5 : Données statistiques internationales sur les intoxications histaminiques de 1950 à 2011 (Dalgaard *et al.*, 2008)**

Etat ou Pays	Année	Epidémies	Nombres de cas	Nombre de cas/an/millions d'habitants	Références
Hawaï	1990 - 2003	111	526	31	(CSPI, 2005)
Danemark	1986 - 2005	64	489	4,9	(Dalgaard <i>et al.</i> , 2006a; Hungerford, 2010)
Nouvelle-zélande	2001- 2005	11	62	3,1	(ESR, 2006)
Japon	1951 - 1954	14	1215	3,7	(Kawabata <i>et al.</i> , 1955)
	1970 - 1980	42	4122	3,2	(Taylor, 1986)
	1994 - 2005	68	1523	1,1	(Hungerford, 2010)
France	1987 - 2005	123	2635	2,5	(WHO, 2003; INVS, 2006)
	2005 - 2011	283	1373	3,48	(INVS, 2013)
Finlande	1983 - 1994	26	73	1,3	(Maijala <i>et al.</i> , 1996)
	1998 - 2005	15	89	2,1	(Hungerford, 2010)
Taïwan	1986 - 2001	8	535	1,5	(Tsai <i>et al.</i> , 2005)
UK	1976 - 2004	515	1300	0,8	(McLauchlin <i>et al.</i> , 2006)
Norvège	1999 - 2000	4	6	0,7	(WHO, 2003)
Suisse	1966 - 1991	76	111	0,7	(Marie <i>et al.</i> , 1992)
Afrique du Sud	1992	10	22	0,5	(Müller <i>et al.</i> , 1992)
	2004	3	21	0,4	(Hungerford, 2010)
Australie	1995 - 2003	12	77	0,4	(Hungerford, 2010)
USA	1973 - 1987	202	1216	0,4	(Hungerford, 2010)
	1990 - 2003	341	1651	0,4	(CSPI, 2005)
	2004 - 2011	16	60	0,2	(CDC, 2013)
Suède	1993 - 2000	5	22	0,3	(WHO ,2003)
Canada	1975 - 1995	39	109	0,2	(Hungerford, 2010)
Pays-bas	1999 - 2005	4	15	0,2	(NIPHE, 2006)
Philippines	1995 - 2004	?	124	0,2	(Hungerford, 2010)

D'après le tableau 5, Hawaï est l'état des USA le plus touché par l'intoxication histaminique avec 31 cas/an/millions d'habitants. La fréquence des intoxications est corrélée à la pêche sportive dont 20 % est revendue aux restaurants. La chaîne du froid n'est en général pas respectée ce qui permet une



croissance rapide des bactéries et une forte production d'histamine. De même, la population hawaïenne consomme une proportion importante de poisson à l'inverse d'autres pays ce qui peut expliquer l'occurrence de cette intoxication.

Le Danemark est fortement affecté par l'intoxication histaminique par rapport à une consommation modérée de produits marins. La plupart des cas sont liés à la consommation de produits à base de thon, d'orpie fraîche ou d'escolier (Dalgaard *et al.*, 2006). D'autres pays comme la Finlande ou la Norvège, gros consommateurs de produits de la mer avec plus de 30 kg/an/habitant, présentent un nombre d'épidémies relativement bas entre 2,1 à 0,7 cas/an/millions d'habitants. Les Etats-Unis sont faiblement affectés par cette intoxication avec moins de 0,4 cas/an/millions d'habitants.

Enfin, le Japon est un pays qui a vu une diminution de l'occurrence des intoxications histaminiques entre 1951 et 2005 passant de 3,7 à 1,1 cas/an/millions d'habitants. Cette observation a été reliée à l'amélioration des processus de conservation des produits par le froid et à une forte diminution de la consommation de poissons séchés (Hungerford, 2010).

#### 4.2.2. Statistiques françaises

La France est un important consommateur de produits marins avec 36,2 kg poids vif/habitant en 2010, dont 24,5 kg/habitant de poissons (FranceAgriMer, 2011). Les toxi-infections alimentaires sont surveillées par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et l'ANSES. Entre 1987 et 2005, 125 épidémies ont été recensées qui ont impliqué 2635 cas. Ces chiffres sont en augmentation entre 2006 et 2013, où 283 épidémies ont été répertoriées mais avec un nombre de cas en baisse (1373 personnes affectées). Certaines de ces épidémies ont été plus marquantes en particulier celle de 2003 suite au décès d'un homme après l'ingestion de brochette de thon. Par ailleurs, en 2008 deux foyers épidémiques impliquant une trentaine d'individus sont survenus en Martinique et dans un restaurant collectif Sodexo à la Défense. Plus récemment, en 2010, 71 militaires français basés au Sénégal ont été intoxiqués par du thon jaune (InVS, 2012).

#### 4.3. **Poissons impliqués et leurs caractéristiques :**

Initialement, l'intoxication histaminique était uniquement associée aux poissons de la famille des *Scombridae* qui regroupe plusieurs espèces de thon, maquereau et bonite. Cette intoxication fut dénommée "Scombroid fish poisoning" en référence à cette famille de poissons (Specht, 1998).

Depuis, de nouvelles espèces ont été identifiées comme vecteurs de l'intoxication, suite à des épidémies, telles que les *Clupeidae* (hareng, sardine), *Belonidae* (Orpie), *Engraulidae* (anchois), *Xiphiidae* (espadon), et *Gempylidae* (escolier) (Ababouch *et al.*, 1991; Crapo and Himelbloom, 1999;

Dalgaard *et al.*, 2006; Feldman *et al.*, 2005, 2005; Hernandez-Herrero *et al.*, 1999; Lehane and Olley, 2000; Özogul *et al.*, 2004a, 2002a, 2002b). Le tableau 6 dans la partie réglementation prend en compte les poissons qui ont été impliqués dans des épidémies durant la décennie. Il est intéressant de noter qu'aucun poisson d'eau douce n'a été répertorié.

Ces espèces de poisson possèdent dans leur chair de fortes concentrations d'histidine libre. En moyenne, la concentration est de 2 000 mg/kg mais elle s'avère beaucoup plus importante chez les *Scombridae* et plus particulièrement le thon. La concentration en histidine libre peut atteindre jusqu'à 10 000 mg/kg dans les genres *Thunnus*, *Euthynnus* et *Katsowonus*. Il est important de souligner que la concentration d'histidine est variable dans la chair de ces poissons qui a un pH proche de 6, comme le thon dont le pH est entre 5,8 et 5,9 (Fig. 10).

Une cartographie de la production d'histamine dans du thon Listao a été établie par la Plateforme Nouvelles Vagues et l'ANSES (Histabio, FranceAgriMer, 2013). Cette étude a révélé une très forte hétérogénéité lors de la formation d'histamine inter-individus et sans aucune tendance pour un même individu. En effet, une très grande variabilité a été observée quant à la présence d'histamine au cours de la maturation de différentes portions de chair entre la tête et la queue. Il est cependant reconnu que l'histamine s'accumule préférentiellement derrière la tête, et le long de l'arête dorsale, les industriels de la conserverie ont donc pour habitude d'effectuer leur prélèvement sur la chair derrière la tête afin d'estimer la qualité de leurs produits (CITMG/KG, 2012).

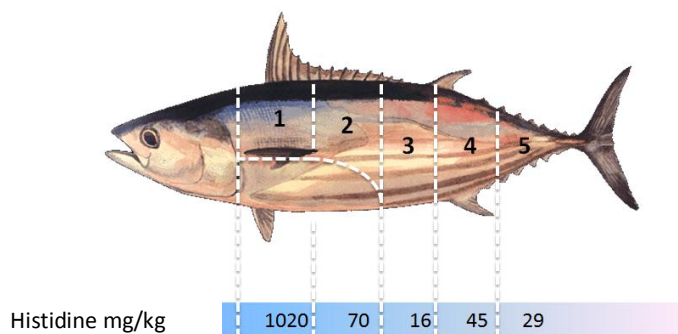


Figure 10 : Variation de la concentration en histidine dans la chair d'un thon (Borrensen, 2008)

Le saumon est un cas particulier des intoxications histaminiques. Sa chair possède des concentrations en histidine libre de 130 à 1090 mg/kg. La production d'histamine dans sa chair est donc plus limitée par rapport aux autres espèces. Elle se situe entre 10 et 170 mg/kg d'histamine. Cependant, malgré ces faibles concentrations, le saumon a aussi été responsable d'intoxications histaminiques (Bartholomew *et al.*, 1987; Dr, 1991; Gessner *et al.*, 1996; Hungerford, 2010).

#### 4.4. La réglementation Européenne et Américaine

##### 4.4.1. Réglementation Européenne

L'histamine est un critère de sécurité, dont la concentration autorisée dans les produits est définie dans le règlement (CE) 1019/2013 sur les critères microbiologiques. Ces critères ne concernent que les produits de la mer présentant une grande quantité d'histidine (supérieure à 1000 mg/kg) dont la liste est présenté dans le tableau 6, sauf le saumon qui possède de plus faibles quantités mais qui suffisent pour observer de légères intoxications (Crapo and Himelbloom, 1999; Dr, 1991; Gessner *et al.*, 1996; Guillier *et al.*, 2011; Jørgensen *et al.*, 2000b; Lehane and Olley, 2000).

Les produits aquatiques sont séparés en deux catégories : les produits à base de poisson frais et les produits à base de poisson avec une maturation enzymatique. Les concentrations en histamine sont mesurées sur 9 échantillons. Pour les produits frais, le critère est respecté lorsque la concentration de chaque échantillon est inférieure ou égale à 100 mg/kg ou lorsque deux échantillons maximum présentent des concentrations entre 100 et 200 mg/kg d'histamine.

Cependant, aucun échantillon ne doit avoir une concentration supérieure à 200 mg/kg. Pour les produits avec maturation enzymatique, ces valeurs sont doublées. Le non-respect de ces critères entraîne le retrait ou le rappel du lot auprès de son fabricant. La réglementation Européenne ne prend pas en compte les autres amines biogènes telles que la tyramine, la putrescine ou la cadavérine.

Des normes sont établies pour le transport et la conservation des matières premières. Le règlement de l'UE (EC 853/2004) exige que les produits marins frais ou décongelés non transformés soient maintenus à une température proche de la glace fondante. Ce texte est interprété de telle manière que les produits sont conservés entre 0 et 2°C. Ces températures doivent être appliquées dès la capture de la matière première. Cependant, le temps pour atteindre cette température dans la chair des produits n'est pas défini.

Enfin, les produits faiblement préservés, i.e. produits fumés ou fermentés, qui ont un taux de sel inférieur à 6 % et un pH supérieur à 5 doivent être conservés à une température inférieure à 5°C.

Tableau 6 : Liste des poissons riches en histidine sous la réglementation EC 1441/2007 (Guillier *et al.*, 2011)

Famille	Espèce	Nom
<b>Arripidae</b>	<i>Arripis trutta</i>	loup de mer
<b>Ammodytidae</b>	<i>Ammodytes tobianes</i>	lançon
<b>Belonidae</b>	<i>Belone belone</i>	orphie, anguille
<b>Carangidae</b>	<i>Seriola dumerii</i> (Risso)	Sériole
	<i>Seriola lalandii</i>	limon
	<i>Caranx</i> spp.	carangue
	<i>Trachurus</i> spp.	chinchard
<b>Coryphaenidae</b>	<i>Coryphaena hippirus</i>	dorade coryphène, mahi-mahi
<b>Clupeidae</b>	<i>Sardinella sirm</i>	anchois de norvège, sprat
	<i>Ambygaster sirm</i>	sardinelle tachetée
	<i>Sardinops</i> spp.	pilchard
	<i>Sardina pilchardus</i>	sardine
	<i>Clupea harengus</i>	hareng
	<i>Sprattus</i> spp.	sprat
	<i>Harregula</i> spp.	sardine
	<i>Alosa pseudoharengus</i>	gaspereau
<b>Engraulidae</b>	<i>Anchoa</i> spp.	anchois
	<i>Anchoviella</i> spp.	
	<i>Engraulis</i> spp.	
	<i>Cetengraulis mysticetus</i>	
<b>Gempylidae</b>	<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>	escolier
	<i>Ruvettus pretiosus</i>	rouvet
<b>Istiophoridae</b>	<i>Makaira Audax</i>	marlin
	<i>Istiophorus</i> spp.	voilier
<b>Lutjanidae</b>	<i>Aphareus</i> spp.	vivaneau
	<i>Aprium virescens</i>	
	<i>Pristipomoides</i> spp.	
<b>Pomatomidae</b>	<i>Pomatomus saltatrix</i>	tassergal, poisson-serre
<b>Scianidae</b>	<i>Seriphus politus</i>	courbine reine
<b>Scomberesocidae</b>	<i>Cololabis saira</i>	balaou japonais, scombérésoce, samana
<b>Scombridae</b>	<i>Auxis thazard</i>	auxide, bonitou
	<i>Acanthocybium solandri</i>	thazard noir
	<i>Euthynnus alleratur</i>	thonine
	<i>Katsowonus pelamis</i>	listao, bonite à ventre rayée
	<i>Sarda sarda</i>	bonite à dos rayé
	<i>Scomber japonicus</i>	maquereau espagnol
	<i>S. scombrus</i>	maquereau
	<i>Scomberomorus cavalla</i>	thazard barré
	<i>S. maculatus</i>	thazard tacheté
	<i>S. regalis</i>	thazard franc
	<i>S. brasiliensis</i>	thazard moucheté
	<i>Thunnus alalunga</i>	germon, thon blanc
	<i>T. albacares</i>	albacore
	<i>T. obesus</i>	patudo
<i>T. thynnus</i>	thon rouge	
<i>T. atlanticus</i>	thon à nageoires noires	
<b>Salmonidae</b>	<i>Salmo salar</i> , <i>Oncorhynchus</i> spp.	saumon
<b>Serranidae</b>	<i>Epinephelus</i> spp.	mérou
<b>Xiphiidae</b>	<i>Xiphia gladius</i>	espadon

#### 4.4.2. Réglementation américaine

Selon le règlement de la FDA mis à jour en 2011, la réglementation aux Etats-Unis est établie à 50 mg/kg. Pour effectuer un jugement, l'analyse de l'histamine sur un lot de poisson doit être réalisée sur 18 poissons au minimum. Si ce lot contient moins de 18 poissons, chaque poisson doit être analysé. La réglementation s'applique aux mêmes espèces de poisson qu'en Europe dont l'escolier, le marlin et le rouvet mais ne prend pas en considération l'orphie, le voilier et l'espadon (FDA/CFSAN, 2001).

A l'identique de l'UE, des normes ont été établies pour la conservation des produits afin d'assurer leurs qualités organoleptiques et microbiologiques. Les poissons frais doivent être maintenus dans la glace, dans de l'eau de mer réfrigérée ou de la saumure à des températures inférieures à 4°C, au maximum 12 heures après la mort du poisson. Les poissons capturés dans des zones tropicales avec des températures environnantes supérieures à 28,3°C et les thons de grande taille (> 9,1 kg) doivent être placés dans la glace au maximum 6 heures après la capture et maintenus à moins de 4,4°C.

Finalement, il est mentionné qu'un refroidissement supplémentaire aux températures les plus froides possibles est préférable pour prévenir la formation d'histamine sur le long terme (FDA/CFSAN, 2001).

### **5. Méthodes de quantification des amines biogènes**

La première méthode de détection de l'histamine était basée sur une contraction de l'ileum de cochon de Guinée (Geirger, 1944). Par la suite, une méthode colorimétrique fut développée par Sager et Hortwitz (1957). Les résultats obtenus par les deux méthodes ont été comparés et ont permis l'amélioration de la méthode biologique par la modification de l'étape d'extraction. Au final, la méthode biologique basée sur l'ileum de cochon fut adoptée par l'AOAC (Official method 954.04) grâce à la possibilité d'un criblage rapide de plusieurs échantillons.

La seconde méthode officielle permettant la détection et surtout la quantification d'histamine s'est basée sur une extraction chimique complexe à base de méthanol, benzaldéhyde, une solution de sodium hydroxyde et un mélange de benzène-n-butanol. L'extrait était ensuite passé au travers d'une colonne de coton brute et d'acide succinique. La fraction éluée était collectée et quantifiée par spectrophotomètre à 475 nm (AOAC Official method 957.07).

Par la suite, d'autres méthodes biologiques utilisant des crabes, ou encore des méthodes enzymatiques se basant sur la dégradation de l'histamine par la DAO ont été mises au point (Lerke *et al.*, 1983 ; Rodriguez-Jerez *et al.*, 1994). Un grand nombre de méthodes ont été développées pour la recherche en se basant sur la technologie de chromatographie haute performance (HPLC). Ces

méthodes nécessitent un appareillage coûteux mais permettent d'être automatisées et de quantifier plusieurs amines biogènes lors d'une même analyse (Rehbein and Oehlenschlager, 2009).

La méthode de référence est la méthode HPLC de l'Union Européenne (Duflos *et al.*, 1999), elle permet de quantifier l'histamine, la tyramine, la cadavérine, la putrescine, la spermine et la spermidine. Les amines biogènes sont extraites de la chair de poisson par traitement à l'acide perchlorique et dérivatisées avec du chlorure de dansyl. Les amines sont séparées sur une colonne kromasil C<sub>18</sub> utilisant un gradient d'élution eau/acétonitrile. L'échantillon est analysé à 254 nm et les pics sont identifiés par rapport à un chromatogramme de référence. La quantité d'amine (mg/kg) est calculée à l'aide du rapport de l'aire de l'amine et du standard interne (1,3 diaminopropane) et du coefficient de régression linéaire propre à l'amine.

Les Etats-Unis utilisent une méthode plus facile d'accès qui permet uniquement la mesure d'histamine par fluorimétrie (AOAC Official Method 977.13). Ces méthodes sont utilisées par d'autres pays en dehors de l'UE ou des USA. De plus, d'autres méthodes alternatives basées sur la chromatographie sur couche mince par exemple permettent d'obtenir des données semi-quantitatives (Dalgaard *et al.*, 2008).

Afin de simplifier ces analyses dans le secteur industriel plus particulièrement, de nouveaux outils de quantification ont été proposés sous la forme de kit prêt à l'emploi. Les premiers kits quantitatifs tels qu'Histamarine (Coulter, Villepinte, France) ou Veratox (Neogen, Ecosse, Royaume-Uni) sont des kits basés sur la technologie ELISA. L'histamine présente dans la chair est extraite par broyage, cet extrait est ensuite déposé dans des puits où un anticorps spécifique de cette amine biogène est fixé. Un substrat compétitif est ensuite déposé, la détection de ce substrat par spectrométrie permet ensuite par rapport à une gamme étalon de déterminer la concentration en histamine des produits jusqu'à 50 mg/kg ou plus si des dilutions sont effectuées. D'autres kits qualitatifs tel que Histameter ou Histasure (LDN) ont aussi été proposés et permettent uniquement de savoir si le produit a une concentration en histamine supérieure à 50 mg/kg. Des études comparatives ont été menées pour déterminer la fiabilité de ces kits par rapport aux méthodes de référence HPLC Européenne et Américaine. Le kit Veratox a ainsi été validé par l'AOAC et s'avère fiable par rapport aux méthodes HPLC (Köse *et al.*, 2011). L'avantage de ces kits réside dans leur simplicité et la rapidité d'utilisation par rapport à la méthode HPLC. Dernièrement, deux nouveaux kits, MaxSignal (Bioo Scientific, Austin, USA) basé sur la conversion enzymatique de l'histamine par une histamine déhydrogénase et un nouveau kit Reveal (Neogen) (Fig. 11) basé sur une immuno-chromatographie ont été comparés par rapport au kit Veratox (Neogen, Ecosse). Ces nouveaux kits semblent fiables et apportent des avantages non négligeables. Le kit MaxSignal permet une quantification sur une gamme de réponse linéaire qui augmente en fonction de la concentration en histamine et permet une quantification jusqu'à 70 mg/kg tandis que le kit Veratox (Neogen) s'appuie sur une courbe logistique pour

déterminer la teneur en histamine. De même, l'immuno-chromatographie du kit Reveal (Neogen) s'avère rapide et fiable pour déterminer la concentration en histamine dans les produits et pourrait remplacer la méthode du kit Veratox qui nécessite de nombreuses manipulations (Hungerford and Wu, 2012).

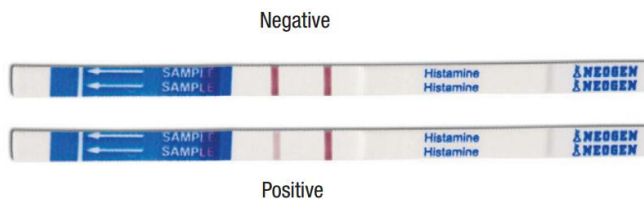


Figure 11 : Résultat positif et négatif du kit Neogen Reveal  
(<http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/R-Hist.pdf>)

Récemment, des circuits imprimés sur lesquelles ont été fixés des antigènes de l'histamine, ont été mis au point pour faciliter l'identification de produits contaminés directement sur l'emballage. La fixation d'une quantité donnée d'histamine induit un courant électrique qui va modifier la couleur de l'étiquette fixée sur l'emballage et permettra au consommateur de connaître la qualité du produit avant son achat. Ce dernier procédé est cependant toujours en développement (Croux *et al.*, 2013).

## 6. Les facteurs de production d'histamine dans les produits marins

### 6.1. Les bactéries histaminogènes

Les familles bactériennes auxquelles appartiennent ces bactéries sont en général dépendantes de l'aliment où elles sont retrouvées. En effet, dans le fromage, le vin et le saucisson, les responsables de la production d'histamine sont des bactéries à Gram positif alors que les bactéries à Gram négatif produisent de l'histamine dans les produits marins.

#### 6.1.1. Les bactéries histaminogènes à Gram positif

Dans le vin, les bactéries responsables de la formation d'histamine sont des bactéries lactiques telles que *Oenococcus oeni*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus brevis*. L'altération du vin par *Pediococcus* a aussi été reliée à la production d'histamine. De plus, l'alcool ralentit le fonctionnement des mécanismes de détoxification de l'histamine et ceci se traduit par une diminution de la dose donnant un effet toxique (Bartowsky and Stockley, 2011; Costantini *et al.*, 2006; Coton *et al.*, 1998; Guerrini *et al.*, 2002; Landete *et al.*, 2005; Lonvaud-Funel and Joyeux, 1994; Lonvaud-Funel, 2001; Rosi *et al.*, 2009). Dans le fromage, la production d'histamine est reliée à des bactéries lactiques qui sont utilisées comme starters telles que *Lactococcus lactis*, ou par des bactéries altérantes provenant du lait ou du

procédé de transformation telles qu'*Enterococcus*. Les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* possèdent tous des espèces et des souches capables de produire des amines biogènes et plus particulièrement l'histamine et la tyramine. Cette synthèse s'opère lors du processus de maturation et peut provoquer des intoxications légères à modérées (maux de tête, urticaires) (Burdychova and Komprda, 2007; Fernandez-García *et al.*, 2000; Joosten and Northolt, 1989; Martuscelli *et al.*, 2005; Schirone *et al.*, 2011; Stratton *et al.*, 1992, 1991).

Si les bactéries à Gram positif sont impliquées dans la production d'histamine dans les produits fermentés, on les retrouve logiquement dans les sauces fermentées à base de poisson. Dans ces produits ce sont d'autres genres bactériens à Gram positif souvent halophiles qui sont impliqués tels que *Tetragenococcus muriaticus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus brevis*, *Brevibacillus brevis* et *Staphylococcus epidermidis*. Ces bactéries sont utilisées comme « starters » pour accélérer le processus de fermentation, ou sont des bactéries endogènes altérantes qui vont dégrader les qualités organoleptiques des produits lors de la fermentation des sauces. Des bactéries à Gram négatif peuvent aussi être impliquées si la matière première n'est pas conservée dans des conditions optimales avant le processus de fermentation. (Brillantes *et al.*, 2002; Kuda *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 2006, 2005; Udomsil *et al.*, 2011; Yongsawatdigul *et al.*, 2004).

#### 6.1.2. Les bactéries histaminogènes à Gram négatif

Dans les poissons marins, la formation d'histamine débute à la mort du poisson. Des bactéries mésophiles et psychrotolérantes vont alors entrer en action et synthétiser de l'histamine à partir de l'histidine libre disponible dans la chair. Au cours de la dernière décennie, elles ont été isolées principalement de plusieurs espèces de thon, de maquereau, de sardines et d'espadon, elles ont aussi été retrouvées plus rarement dans de la bonite et du mahi-mahi (Tableau 7). Les bactéries mésophiles ont été identifiées parmi les familles des *Enterobacteriaceae* et des *Vibrionaceae* telles que *Listonella anguillarum*, *Morganella morganii* subsp. *morganii*, subsp. *sibonii*, *Hafnia alvei*, *Raoultella planticola*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* et *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*. Ces bactéries mésophiles sont capables de produire de l'histamine jusqu'à 7 à 10°C et excellent dans cette tâche lorsque les produits sont conservés à des températures supérieures à 10°C (Bjornsdottir *et al.*, 2009; Emborg, 2006; Emborg *et al.*, 2002; Ferrario *et al.*, 2012; Kanki *et al.*, 2004, 2002; Kim, 1979; Kim *et al.*, 2002a; Kimura *et al.*, 2009; Klausen and Huss, 1987a; Lehane and Olley, 2000; López-Sabater *et al.*, 1996, 1994; Özogul, 2004; Tolmasky *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 2004). Les bactéries psychrotolérantes sont représentées uniquement par 2 espèces : *Morganella psychrotolerans* et *Photobacterium phosphoreum*. Elles sont



capables de produire de l'histamine dans des produits marins tels que l'orpie ou le saumon à des températures avoisinant les 0 à 2°C et se révèlent être un problème important pour les industriels pour qui la chaîne du froid permet théoriquement de prévenir la formation d'histamine. L'origine de ces bactéries marines dans les produits est encore méconnue de la communauté scientifique. Les bactéries *P. phosphoreum*, *M. morganii*, *R. planticola* et *P. damsela* ont été retrouvées dans le tractus digestif de poisson mais leurs concentrations n'ont pas été déterminées (Børresen, 2008).

Ces bactéries histaminogènes sont souvent classées en fortement ou faiblement productrices suivant leur capacité à produire de l'histamine dans des milieux supplémentés à 0,5 % avec de la L-histidine (Bjornsdottir *et al.*, 2009). Une bactérie est considérée comme fortement productrice d'histamine lorsqu'elle est capable de produire plus de 1 000 mg/kg d'histamine dans un milieu supplémenté. En dessous de cette valeur, elle est considérée comme faiblement productrice et à des teneurs inférieures à 50 mg/kg d'histamine, elle est considérée comme non productrice d'histamine.

Un autre aspect des bactéries histaminogènes est la très forte variabilité de production d'histamine entre les souches d'une même espèce. En effet, la plupart des espèces bactériennes sont composées de souches non productrices d'histamine tandis qu'un faible pourcentage d'entre elles seront productrices. Cependant, le genre *Morganella* est une exception et regroupe uniquement des souches fortement productrices d'histamine.

Les bactéries des genres *Morganella* et *Photobacterium* demeurent celles qui sont le plus souvent impliquées dans les intoxications histaminiques (Emborg, 2006; Emborg *et al.*, 2005; Kanki *et al.*, 2004; Lopez-Caballero *et al.*, 2002).

Tableau 7: Liste de bactéries histaminogènes mésophiles et psychrotolérantes fortement productrices, leurs origines et références

Microorganismes	Origine	Référence
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Espadon	(Tsai <i>et al.</i> , 2004)
<i>Citrobacter freundii</i>	Thon	(López-Sabater <i>et al.</i> , 1996)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Albacore	(Kim <i>et al.</i> , 2001a)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Albacore, anchois, espadon, thon	(Kim <i>et al.</i> , 2001b; Rodtong <i>et al.</i> , 2005; Takahashi <i>et al.</i> , 2003)
<i>Hafnia alvei</i>	Thon, thon listao	(Ferencik, 1970; López-Sabater <i>et al.</i> , 1996)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Albacore, thon, espadon	(Kim <i>et al.</i> , 2001b; López-Sabater <i>et al.</i> , 1996, 1994; Tsai <i>et al.</i> , 2004)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Thon, maquereau	(López-Sabater <i>et al.</i> , 1996; Taylor and Speckhard, 1984, 1983)
<i>Listonella anguillarum</i>	Truite	(Tolmasky <i>et al.</i> , 1995)
<i>Morganella morganii</i>	Albacore, anchois, tassergal, thon obèse, thon rouge, maquereau, mahi-mahi, sardine, thon	(Ababouch <i>et al.</i> , 1991; Frank <i>et al.</i> , 1985; Gingerich <i>et al.</i> , 2001, 1999; Kim <i>et al.</i> , 2002a, 2002b, 2001a, 2001b; Kimura <i>et al.</i> , 2000; López-Sabater <i>et al.</i> , 1994, 1996; Lorca <i>et al.</i> , 2001; Rodtong <i>et al.</i> , 2005; Takahashi <i>et al.</i> , 2003; Taylor and Speckhard, 1984, 1983; Veciana-Nogués <i>et al.</i> , 2004)
<i>Morganella psychrotolerans</i>	Orphie, thon, thon fumé	(Dalgaard <i>et al.</i> , 2006; Emborg, 2006)
<i>Photobacterium damsela</i>	Maquereau	(Kim <i>et al.</i> , 2002a; Takahashi <i>et al.</i> , 2003)
<i>Photobacterium leognathi</i>	Maquereau et sardine à l'huile	(Ramesh <i>et al.</i> , 1989)
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Thon, sardine	(Emborg <i>et al.</i> , 2005; Kanki <i>et al.</i> , 2004)
<i>Proteus mirabilis</i>	Mahi-mahi et sardine	(Ababouch <i>et al.</i> , 1991; Frank <i>et al.</i> , 1985)
<i>Proteus penneri</i>	Espadon	(Tsai <i>et al.</i> , 2004)
<i>Proteus vulgaris</i>	Albacore, anchois, maquereau, espadon, thon	(Arnold <i>et al.</i> , 1980; Kim <i>et al.</i> , 2001a, 2001b; Rodtong <i>et al.</i> , 2005; Takahashi <i>et al.</i> , 2003)
<i>Rahnella agnatilis</i>	Espadon	(Tsai <i>et al.</i> , 2004)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Thon, anchois	(Rodriguez-Jerez <i>et al.</i> , 1994; Ryser <i>et al.</i> , 1984)
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Thon, bonite, sardine	(Kanki <i>et al.</i> , 2002)
<i>Raoultella planticola</i>	Thon, bonite, sardine	(Kanki <i>et al.</i> , 2002)
<i>Serratia fonticola</i>	Albacore, thon rouge	(Kim <i>et al.</i> , 2001b; López-Sabater <i>et al.</i> , 1996)
<i>Serratia marcescens</i>	Thon	(López-Sabater <i>et al.</i> , 1996)
<i>Vibrio fischeri</i>	Maquereau et sardine à l'huile	(Ramesh <i>et al.</i> , 1989)
<i>Vibrio harveyi</i>	Maquereau et sardine à l'huile	(Ramesh <i>et al.</i> , 1989)

### 6.1.3. Le genre Morganella

Le genre *Morganella* appartient à la famille des Entérobactéries. Il est représenté par deux espèces bactériennes : *Morganella morganii* et *Morganella psychrotolerans*. Ces bactéries à Gram négatif sont anaérobies facultatives, oxydase négative et catalase positive. Elles ont une forme de bacilles mobiles aux bords arrondis d'1 µm de largeur et de 2 à 3 µm de longueur. Elles sont observables de manière dispersées ou sous la forme de courtes chaînettes. *Morganella* peut croître à un pH compris entre 4,6 et 9,2 et à une concentration en NaCl allant de 0 à 7,5 % (w/v) sauf *M. morganii* qui peut se développer jusqu'à 8,5 % de NaCl (Emborg and Dalgaard, 2008a, 2008b; Emborg, 2006). *M. psychrotolerans* et *M. morganii* ont une température de croissance allant d'une  $T_{min}$  de -8,3 à -5,9 contre 0,3 à 2,8°C, une  $T_{opt}$  de 26,0 à 27,0 et une  $T_{max}$  de 32,0 à 33,3 contre 44,0 à 47,4°C respectivement. Enfin, le taux de croissance de *M. morganii* est supérieur à *M. psychrotolerans* au-delà de 15°C (Fig. 12).

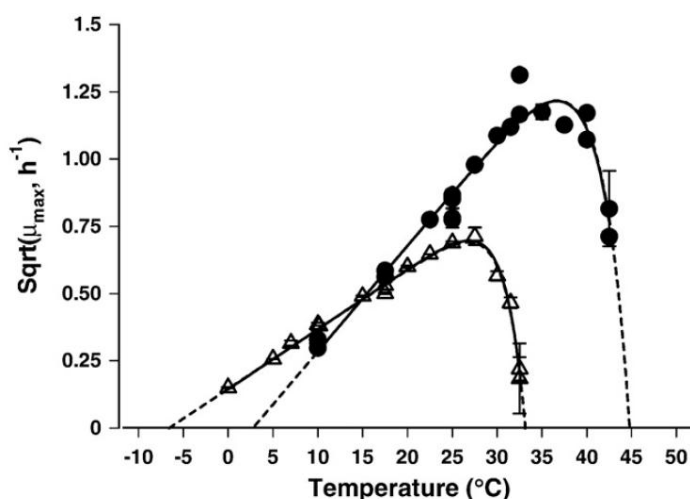


Figure 12 : Taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ) observé (Avg±SD, n=2) pour *M. psychrotolerans* (triangle ouvert, Mix-Mp) et *M. morganii* (cercle plein, Mix-Mm.) (Emborg and Dalgaard, 2008a).

*M. morganii* est représenté par deux sous espèces *sibonii* et *morganii*, qui ont été isolées pour la première fois en 1919 (Winslow *et al.*, 1919). Cette bactérie a été impliquée dans des intoxications histaminiques mais correspond aussi à un pathogène opportuniste qui a été responsable de septicémies, d'abcès et d'infections urinaires chez des personnes immunodéprimées (Falagas *et al.*, 2006; Gautam *et al.*, 2003; Lee and Liu, 2006; O'Hara *et al.*, 2000). Le séquençage de son génome a été réalisé par une équipe chinoise pour identifier les gènes de pathogénicité (Chen *et al.*, 2012; Khatri *et al.*, 2013). Son matériel génétique se compose d'un chromosome de 3,8 millions de paires de bases. Il est constitué à 51,15 % de GC, de 3 565 séquences codant pour des protéines, de 72 tRNA et de 10 rRNA (Chen *et al.*, 2012; Khatri *et al.*, 2013). Le tableau 8 présente différentes souches

isolées dans des produits marins et chez des patients infectés. Dans le cas des intoxications histaminiques, il est souvent difficile d'isoler et d'identifier la bactérie responsable de la production d'histamine car le produit a souvent subi un traitement thermique au préalable ou l'ensemble du repas a été consommé.

Tableau 8 : Souches de *M. morganii* isolées sur différentes matrices

Isolat	Source	Provenance géographique	Année	Référence
<b><i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i></b>				
25a32	Thon	Japon	2000 / 2001	(Takahashi <i>et al.</i> , 2003)
M04090	Clinique	Belgique		(Wauters <i>et al.</i> , 2004)
LMG 7874 <sup>T</sup>	Fèces humain	Angleterre	1920	(Winslow <i>et al.</i> , 1919)
U6/1	Thon	Danemark	2004	(Emborg, 2006)
<b><i>Morganella morganii</i> subsp. <i>sibonii</i></b>				
NCIMB 865	Poisson altéré	Japon	-	(Dalgaard <i>et al.</i> , 2006)
DSM 14850T	Expectorations humaines	Danemark	-	
AP28	Albacore	Japon	2000/2001	(Takahashi <i>et al.</i> , 2003)
03A11	Poisson fumé	Nouvelle-Zélande	1996	(Dalgaard <i>et al.</i> , 2006)
03B10	Poisson fumé	Nouvelle-Zélande	1996	

Tableau 9 : Souches de *M. psychrotolerans* isolées sur différents poissons

Isolat	Source	Provenance géographique	Année	Référence
<b><i>Morganella psychrotolerans</i></b>				
F39-1	Œuf de lump	Canada/Danemark	1998	(Basby <i>et al.</i> , 1998)
F39-3	Œuf de lump	Canada/Danemark	1998	
JB-T11	Thon frais sous atmosphère modifiée	Sri lanka	2000	(Dalgaard <i>et al.</i> , 2006a)
JB-T12	Thon frais sous atmosphère modifiée	Sri lanka	2000	
JB-T16	Thon frais sous atmosphère modifiée	Sri lanka	2000	
U2/3 <sup>T</sup>	Thon fumé	-	2004	
U2/4	Thon fumé	-	2004	
U2/5	Thon fumé	-	2004	
U2/6	Thon fumé	-	2004	
U2/7	Thon fumé	-	2004	
FD24	Thon frais sous atmosphère modifiée	Indonésie	2003	
1F10	Orphie	Danemark	2003	
2F6	Orphie	Danemark	2004	

*M. psychrotolerans* est une espèce récente qui a été décrite en 2006 par Emborg & Dalgaard (2006). Cette bactérie est encore peu étudiée par la communauté scientifique, uniquement 5 articles y font référence (Bunkova *et al.*, 2011; Emborg and Dalgaard, 2008a, 2008b; Emborg, 2006; Ramanathan *et*

*al.*, 2011). Elle a été retrouvée sur des œufs de lump, de l'orpie, du thon frais et du thon fumé (Tableau 9).

Elle est capable de produire de fortes concentrations d'histamine à des températures comprises entre 0 et 2°C. Cette bactérie a aussi récemment été utilisée pour la biosynthèse de nanoparticules d'argent (Ramanathan *et al.*, 2011). Enfin, toutes les espèces et surtout toutes les souches du genre *Morganella* sont fortement productrices d'histamine avec plus de 1 000 mg/kg en bouillon nutritif supplémenté avec de l'histidine (Bjornsdottir *et al.*, 2009).

#### 6.1.4. Le genre *Photobacterium*

Le genre *Photobacterium* fait partie de la famille des *Vibrionaceae* qui est composée de bactéries à Gram négatif aérobies facultatives communément associées aux animaux marins, tels des poissons ou des invertébrés.

A ce jour, 21 espèces de *Photobacterium* ont été isolées de l'eau de mer, de sédiments et de coraux marins, d'eau de lac salée mais également des écailles, du tractus digestif et de la chair de poisson. Certaines espèces ont même été retrouvées dans l'organe lumineux de plusieurs espèces de poissons marins (Urbanczyk *et al.*, 2011). *Photobacterium* a une forme de bacilles arrondis d'un diamètre de 0,8 à 1,3 µm et d'une longueur de 1,8 à 3,4 µm. Ce genre est chimio-organotrophe et puise son énergie de diverses matières carbonées. Le métabolisme oxydatif est possible à la fois en condition d'anaérobiose mais aussi en aérobiose où ces bactéries peuvent convertir du D-fructose, D-galactose, D-glucose, glycérol, DL-lactate, D-ribose, succinate pour former des molécules d'ATP. Cependant, toutes les espèces ne métabolisent pas forcément les mêmes sources de carbone, par exemple le pyruvate peut être dégradé par *Phosphoreum angustum* ou *Phosphoreum leognathi* mais pas par *P. phosphoreum*.

La structure génomique du genre *Photobacterium* est représentatif des *Vibrionaceae*, en effet le génome est réparti entre deux chromosomes de tailles inégales communément appelées « grand » et « petit ». Le « grand » chromosome contient les gènes essentiels au fonctionnement de la bactérie tandis que l'autre chromosome assure des fonctions plus spécifiques.

Les membres de 7 espèces de *Photobacterium* sont bioluminescents : *P. angustum*, *P. aquimaris*, *P. damselae*, *P. kishitani*, *P. leognathi*, *P. mandapamensis* et *P. phosphoreum*. La bioluminescence bactérienne est une activité visible à l'œil nu, qui est potentiellement associée à des bénéfices physiologiques ou écologiques pour la bactérie.

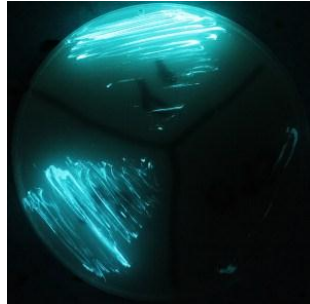


Figure 13 : Bioluminescence de *Photobacterium phosphoreum* sur un milieu Marine agar  
([http://exploringtheinvisible.files.wordpress.com/2013/05/img\\_0116-e1367752538636.jpg?w=300&h=294](http://exploringtheinvisible.files.wordpress.com/2013/05/img_0116-e1367752538636.jpg?w=300&h=294))

L'altération des produits de la mer qui est causée par plusieurs bactéries telles que *Shewanella putrefaciens* peut aussi être liée à la présence d'espèces de *Photobacterium*. *P. phosphoreum* a été identifiée dans ce contexte par différentes études et principalement dans l'altération de produits crus sous atmosphère protectrice (Dalgaard, 1995; Dalgaard *et al.*, 2006; Dalgaard *et al.*, 1997). De même, certaines espèces principalement *P. damsela* sont pathogènes pour les poissons. Ces deux espèces bactériennes sont aussi responsables d'intoxications alimentaires par la production d'histamine. Cette production d'histamine est souche-dépendante.

*P. phosphoreum* a été isolé par Cohn (1878) et par Beijerinck (1889) à partir d'eau de mer (Ast and Dunlap, 2005). Cette bactérie lumineuse et psychrotolérante a été retrouvée par la suite dans divers environnements tels que la surface des animaux marins, le contenu intestinal de poisson ou aussi de poissons altérés et des organes de bioluminescence (Budsberg *et al.*, 2003; Dalgaard *et al.*, 1993; Dalgaard *et al.*, 1997b; Emborg *et al.*, 2002; Farmer, Hickman-Brenner, 2006; Hovda *et al.*, 2012; Hovda *et al.*, 2007a; Hovda *et al.*, 2007c; Paarup *et al.*, 2002).

*P. phosphoreum* domine la flore d'altération de différents poissons frais dont le cabillaud, l'orpie, le flétan, le lieu noir, le saumon (Dalgaard *et al.*, 2006; Dalgaard *et al.*, 1997; Emborg *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2009; Hovda *et al.*, 2007; López-Caballero *et al.*, 2002; Reynisson *et al.*, 2009; Rudi *et al.*, 2004; Van Spreekens, 1977).

Cette bactérie est capable d'utiliser l'OTMA (Oxyde de triméthylamine) comme accepteur final d'électrons lors de la respiration anaérobie ce qui entraîne la production de métabolites d'altération comme la triméthylamine (TMA), qui provoque le dégagement d'odeurs aigres et aminées sur les poissons comme le cabillaud, le saumon ou encore d'autres poissons conservés sous atmosphères protectrices (Dalgaard *et al.*, 1993; Dalgaard *et al.*, 1997b; Emborg *et al.*, 2002; Fletcher *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2009). *P. phosphoreum* est notamment capable de produire 30 fois plus de TMA que *S.*

*putrefaciens* (Dalgaard, 1995b). Certains composés volatils, comme le 3-hydroxybutanone, ont également été reliés à l'altération des produits de la mer par *P. phosphoreum* (Olafsdottir *et al.*, 2005). *P. phosphoreum* est également responsable de la production d'amines biogènes dans le saumon frais et le saumon fumé comme la putrescine, la cadavérine, la tyramine, la putrescine, l'histamine etc. (Emborg *et al.*, 2002; Jørgensen *et al.*, 2000a). Cette espèce a été impliquée dans des cas d'intoxication histaminique en lien avec la consommation de thon frais ou fumé et de sardines séchées (Emborg *et al.*, 2005; Kanki *et al.*, 2004).

*P. phosphoreum* est une bactérie assez difficile à cultiver, elle se développe uniquement sur des milieux nutritifs enrichis en NaCl (Broekaert *et al.*, 2012). De plus, cette bactérie est sensible à la congélation à -20°C pendant plusieurs semaines (Bøknæs *et al.*, 2000; Emborg *et al.*, 2002).

Il n'existe aucune méthode classique de dénombrement sélectif pour cette bactérie, seule une méthode de conductance-métrie est disponible pour la quantification spécifique de *P. phosphoreum* (Dalgaard *et al.*, 1996). Tout récemment, une méthode de quantification par PCR en temps réel a été développée pour quantifier *P. phosphoreum* spécifiquement jusqu'à 10<sup>3</sup> UFC/g dans du saumon (Macé *et al.*, 2013).

*P. damselae* est une autre espèce de *Photobacterium* produisant de l'histamine. Elle possède l'enzyme la plus active, mais n'a cependant été que rarement identifiée dans des cas d'intoxications histaminiques (Hungerford, 2010; Kanki *et al.*, 2007). *P. damselae* a été isolée d'une infection humaine par Morris *et al.* (1982) et d'ulcères cutanés chez des poissons par Love *et al.* (1981). Elle a été identifiée à cette époque en tant que *Vibrio damselae*, puis au fur et à mesure de la découverte de nouvelles souches, elle a été renommée *Photobacterium histaminum* (Okuzumi *et al.*, 1994). Suite à des analyses phylogénétiques et des hybridations ADN-ADN, elle fut identifiée comme *P. damselae* subsp. *damselae* (Kimura *et al.*, 2000). Enfin, un autre pathogène des poissons *Pasteurella piscicida* (Magarinos *et al.*, 1992) a été réassigné et identifié en tant que *P. damselae* subsp. *piscicida* (Gauthier *et al.*, 1995).

Chacune de ces sous-espèces est une bactérie pathogène de poisson et est ubiquitaire dans l'environnement marin (Wang *et al.*, 2013). *P. damselae* subsp. *piscicida* est l'agent responsable de la pasteurellose des poissons, tandis que *P. damselae* subsp. *damselae* est un pathogène actif sur les poissons mais aussi les animaux marins et les hommes. *P. damselae* a été rapporté comme un pathogène opportuniste responsable d'infections cutanées et de nécrose faciale fatale chez l'homme. La pathogénicité de cet organisme est due à sa production de toxines (Novotny *et al.*, 2004). Les souches de *P. damselae* subsp. *damselae* ont démontré une virulence équivalente entre des poissons poïkilothermes comme homéothermes, en sécrétant une toxine phospholipase létale

du fait de ses propriétés hémolytiques et cytotoxiques. La plupart des infections rapportées chez l'homme sont liées à des blessures lors de la manipulation de poisson, ou lors de l'ingestion de poisson cru.

## 6.2. L'histidine décarboxylase

Les bactéries histaminogènes possèdent un opéron assurant la synthèse de l'histidine décarboxylase dans leur cytoplasme, qui permet la formation d'histamine dans certaines conditions. Cette enzyme a surtout été étudiée chez des bactéries Gram positive telle que *Lactobacillus* sp. 30A, *Tetragenococcus muriaticus*, *Oenococcus oeni* 9204 et *Lactobacillus hilgardii* 0006. Ces bactéries à Gram positif synthétisent une histidine décarboxylase pyruvoyl-dépendante. Elle est produite sous la forme d'une pro-enzyme inactive qui est activée par une réaction auto-catalytique et par la fixation d'un groupement pyruvoyl. Le centre catalytique de cette enzyme se trouve au niveau de la sérine 81-82. Elle est composée de 2 trimères  $\alpha\beta\beta_3$ , avec une masse moléculaire (*Mr*) 28000 pour l'unité  $\alpha$  et un *Mr* 9000 pour l'unité  $\beta$ , ce qui correspond à une enzyme d'un *Mr* 202 000. C'est une enzyme stable avec un pH optimum de 4,8, qui a pour inhibiteur compétitif l'histamine. L'organisation génétique de l'opéron a été étudiée sur les souches citées précédemment (Copeland *et al.*, 1989; De Las Rivas *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2008, 2005; Vanderslice *et al.*, 1986). Cette organisation est similaire entre les opérons de chacune de ces espèces qui sont composés des gènes suivants (Landete *et al.*, 2008) :

- ***hdcP*** : gène de la perméase assurant l'échange histidine/histamine
- ***hdcA*** : gène de synthèse de l'enzyme
- ***hdcB*** : gène codant pour une protéine de maturation de l'enzyme
- ***hisRS*** : gène codant une histidyl tRNA synthétase

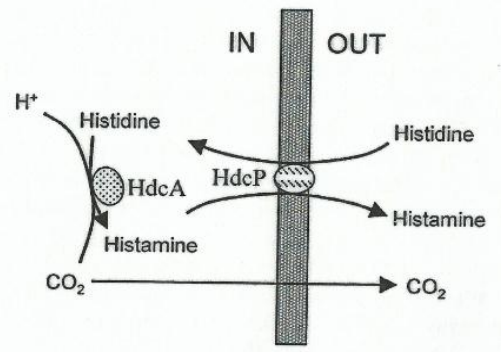


Figure 14 : Principe de la décarboxylation de l'histidine libre chez des bactéries à Gram positif (Landete *et al.*, 2008)

Le fonctionnement de l'opéron de l'histidine décarboxylase et de ses gènes a ainsi pu être élucidé. L'histidine libre est transportée dans la bactérie par la perméase (*hdcP*). L'histidine y est décarboxylée par l'histidine décarboxylase (*hdcA*) suite à son activation formant alors l'histamine qui est ensuite excrétée en dehors de la cellule en même temps que le CO<sub>2</sub>, ce qui génère un potentiel membranaire (Fig. 14). En conséquence, la production d'histamine conduit à une alcalinisation du



cytoplasme de la bactérie et génère une force proton motrice par le biais d'un potentiel électrique et du gradient de pH transmembranaire. Ces effets assurent une synthèse d'énergie métabolique et une résistance au stress acide.

Ces bactéries peuvent parfois perdre leur fonction de décarboxylation en milieu synthétique, s'il est dépourvu d'histidine. Chez *L. hilgardii*, l'opéron de l'histidine décarboxylase se trouve sur un plasmide de 80 kb, ce qui permet des transferts horizontaux du plasmide à d'autres bactéries (Lucas *et al.*, 2005; Satomi *et al.*, 2008, 2011, 2012).

Les bactéries à Gram négatif synthétisent une histidine décarboxylase pyridoxal-5'-phosphate dépendante. La catalyse de l'histidine libre est équivalente entre les deux enzymes (1 molécule d'histidine = 1 molécule d'histamine). Cette enzyme est constituée d'unités d'une masse moléculaire (*Mr*) de 43000 pour un ensemble d'un *Mr* 170000. Cette enzyme est instable et possède un pH optimum de 6,5. La fluorométhylhistidine et la méthylhistidine sont des inhibiteurs de cette enzyme. Le gène de l'histidine décarboxylase a été étudié dans un grand nombre de bactéries à Gram négatif (Guirard and Snell, 1987; Hayashi *et al.*, 1986; Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Tanase *et al.*, 1985). L'organisation génétique de l'opéron est constituée de 3 gènes (Fig. 15) :

- **hdc** : gène de l'histidine décarboxylase
- **hdcP** : gène de la perméase assurant le transfert de l'histidine/histamine
- **hisS** : gène de l'histidyl tRNA synthetase

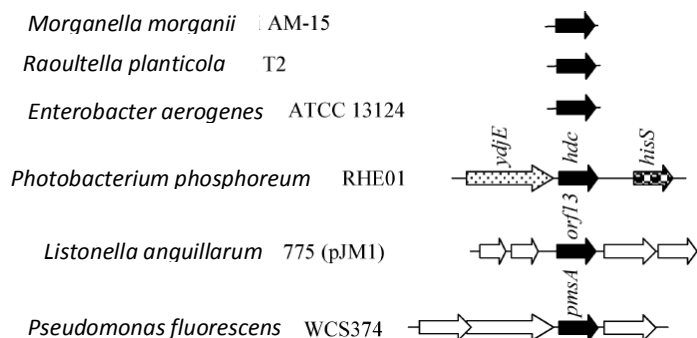


Figure 15 : Organisation génétique de la région codant le gène de l'histidine décarboxylase chez les bactéries à Gram négatif. Les régions *hdc* de *M. morganii* AM-15 (J02577), *R. planticola* strain T2 (M62746), *E. aerogenes* ATCC 13124 (M62745), *P. phosphoreum* RHE01 (AY223843), du plasmide pJM1 de *Listonella anguillarum* 775 (AY312585) et *Pseudomonas fluorescens* WCS374 (Y09356) sont représentées. Les flèches indiquent des COL (Cadre ouvert de lecture), les gènes codant pour l'HDC sont représentés en noir (Landete *et al.*, 2008).

Au niveau moléculaire, l'histidine décarboxylase des bactéries à Gram négatif est caractérisée par une taille de 378 acides aminés chez *M. morganii*, *M. psychrotolerans*, *H. alvei*, *E. aerogenes* ou encore *R. planticola* (Landete *et al.*, 2008). La séquence nucléotidique de l'enzyme entre ces espèces est identique à 75%, tandis que la séquence protéique est identique à 80%.

*P. phosphoreum* reste un cas particulier puisqu'à l'inverse des souches de *Morganella* qui sont toutes fortement productrices d'histamine, la grande majorité des souches de *P. phosphoreum* sont faiblement productrices d'histamine. Cette espèce possède deux histidines décarboxylase, une constitutive et une autre inductible. L'activité de ces enzymes va être régulée par différentes composantes environnementales tel que l'oxygène disponible, le pH, la température et la concentration en sel. Ces deux molécules ont une activité jusqu'à 7°C dans un extrait cellulaire. La température et le pH optimum ont été fixés à 30°C et pH 6,5 pour l'enzyme inductible et 40°C avec un pH 6,0 pour l'enzyme constitutive. L'activité enzymatique reste optimale à 0% de NaCl (Morii *et al.*, 2006).

Lorsqu'une bactérie productrice d'histamine est inactivée, l'enzyme reste active et continue de synthétiser de l'histamine (Kanki *et al.*, 2007). Ainsi, la production d'histamine peut se poursuivre dans des produits contaminés dont les bactéries auraient été inactivées par une étape de congélation par exemple. Des histidine décarboxylases recombinantes de *M. morganii*, *R. planticola*, *P. damsela* et *P. phosphoreum* ont été produites de façon hétérologue et leurs activités ont été testées en milieu modèle dans différentes conditions de pH, de milieu, de sel et de température (Kanki *et al.*, 2007). Ces auteurs ont ainsi démontré que l'histidine décarboxylase de *P. damsela* est la plus active (*V<sub>m</sub>*) et produit 649 mg/kg d'histamine dans du thon en 2 h à 30°C et 654 mg/kg en 4 h à 20°C, avec une température optimale définie à 37°C, à un pH de 7. D'autre part, cette enzyme reste stable dans les produits même après congélation-décongélation. Cette résistance peut provoquer des biais de quantification lors de l'analyse de produits envoyés sous forme congelée. Ainsi, lors de l'étape de décongélation avant analyse, la quantité d'histamine peut doubler voir tripler. D'après ces travaux, il semble que l'histidine décarboxylase de *P. damsela* soit une cause prédominante de la production d'histamine dans les produits congelés puis transformés.

Il est important de souligner à nouveau, qu'une fois produite l'histamine ne peut être détruite par congélation, fumage, cuisson ou stérilisation (Taylor *et al.*, 1989). Il est donc essentiel d'agir en amont de sa formation pour maîtriser le risque.

### **6.3. Les conditions nécessaires à la production d'histamine**

La formation d'histamine est dépendante des conditions environnementales (pH, sel, température, atmosphère de conservation), de la teneur en acides aminés libres dans la chair du poisson et de la durée de conservation.

La présence de bactéries histaminogènes d'intérêt est le paramètre qui a le plus d'impact sur la formation d'histamine. Les bactéries histaminogènes sont souvent classées suivant leur capacité à

produire de l'histamine dans des milieux supplémentés à 0,5 % avec de la L-histidine (Bjornsdottir *et al.*, 2009) (Cf. Section 6.1).

En présence d'une ou plusieurs souches de bactéries fortement productrices d'histamine l'effet température/temps va jouer un rôle prédominant pour la formation d'amines biogènes. Dans le cadre du projet européen BIOCOM (Biogenic amines in seafoods - assessment and management of consumer exposure, SeafoodPlus, Project 3.4, 2004 - 2008), un grand nombre de données a été récolté sur la formation d'histamine et synthétisé dans la figure 16.

Des concentrations en histamine de 500 mg/kg correspondant au seuil de toxicité peuvent être atteintes jusqu'à des températures de -1°C à 5°C en 4 à 25 jours. Ce même taux est atteint en 3 jours entre 6 et 11°C, en 2 jours entre 11 et 15°C et en quelques heures au delà de 16°C.

Jusqu'en 2004, la production d'histamine était uniquement associée à des bactéries mésophiles et à des ruptures de la chaîne du froid lors de la conservation des produits. Ces températures peuvent être atteintes lors du procédé de transformation utilisé pour le thon en boîte où la température du poisson peut atteindre 12 à 14°C, notamment entre les étapes de décongélation du thon entier et de cuisson-stérilisation. Cependant, des travaux récents ont mis clairement en valeur l'impact des bactéries psychrotolérantes sur la production d'histamine aux températures réglementaires de conservation entre 2°C et 4,4°C.

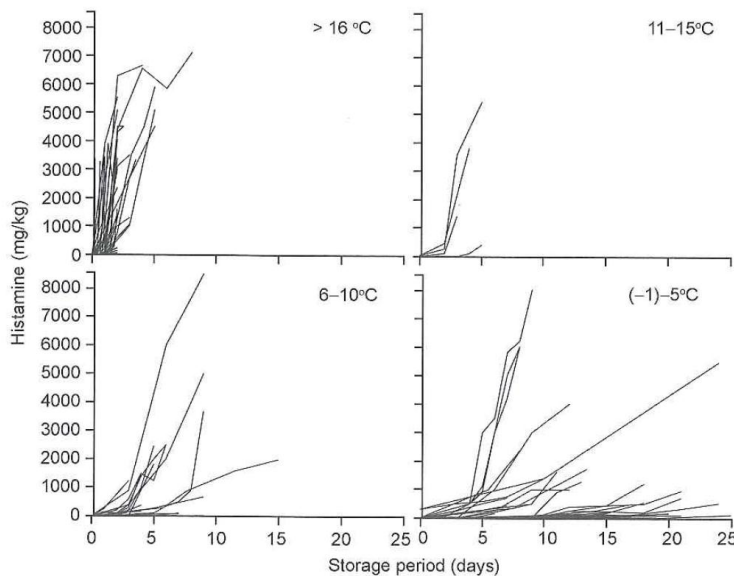


Figure 16 : Synthèse des données sur la formation d'histamine dans des produits riches en histidine naturellement et artificiellement contaminés à différentes températures (Dalgaard *et al.*, 2008)

Les bactéries fortement productrices d'histamine ont une bonne tolérance aux fortes teneurs en NaCl. Par exemple, *M. psychrotolerans* peut croître jusqu'à 7,5 % (w/v) (Emborg, 2006). Cependant, l'addition de sel dans les produits peut permettre de ralentir la formation d'histamine. Dans du maquereau conditionné à 20°C, l'addition de 1 à 2% de NaCl stimule légèrement la formation d'histamine, alors qu'avec 3% de NaCl la formation d'histamine a été retardée de 1 à 2 jours et de 1 à 4 jours avec 4% de NaCl (Yamanaka *et al.*, 1985).

Dans du thon fumé à froid conditionné sous vide à 5°C, la formation d'histamine par *P. phosphoreum* a été stoppée avec 4,4% ± 0,8% de sel en solution aqueuse (SSA). *M. psychrotolerans* est plus résistant au sel et il a été nécessaire d'appliquer 5% pour une durée de vie de 3 à 4 semaines à 5°C (Dalgaard *et al.*, 2006).

Le pH joue aussi un rôle dans la formation d'histamine. Sur de la bonite naturellement contaminée, la synthèse d'histamine est plus importante à un pH de 6,2 comparé à un pH de 5,6 ou 6,7. Dalgaard *et al.*, (2006) ont montré que *P. phosphoreum* produit deux fois plus d'histamine à pH 6,1 qu'à pH de 6,5, même si les taux de croissance étaient quasi-identiques. Le pH est donc un facteur important de la production d'histamine ; cependant, c'est un paramètre sur lequel il est difficile de jouer pour moduler la production d'histamine sauf dans le cas des produits marinés par exemple.

Différents modèles prédictifs de la production d'histamine ont été proposés. Franck *et al.* (1983) ont suggéré un modèle mathématique empirique pour la formation d'histamine dans du thon listao entre 21,1°C et 37°C en fonction du temps de stockage et de la température en °F.

$$H = 28.10^{0.00025(T-21.1)} \cdot 10^{0.00025(T-21.1)} \cdot 10^{0.00025(T-21.1)}$$

Un autre modèle, basé lui aussi sur des données d'intoxications alimentaires, a été développé par Frank et Yoshinaga (1987) sur du thon listao entre -1,1°C et 15,6°C. Emborg et Dalgaard (2008a) ont évalué ces deux modèles et d'après les données observées dans diverses épidémies, il a été estimé que ces modèles étaient imprécis et sous estimaient la plupart du temps la concentration réelle dans les produits.

Un nouveau modèle a été proposé par ces auteurs en se focalisant uniquement sur le genre *Morganella*. Le modèle établi entre une courbe de croissance logistique étendu et un facteur de rendement d'histamine constant a été mis au point pour relier la croissance à la production d'histamine pour *M. psychrotolerans* et *M. morgani* (Logiciel SSSP v3.1, <http://sssp.dtuaqua.dk/>, Août 2009, Emborg and Dalgaard, 2008a) en fonction du taux de sel, de la température et du niveau d'inoculation.

La production d'histamine en présence de *M. psychrotolerans* à des températures frigorifiques peut évoluer très rapidement sur quelques degrés (Fig. 17). En effet, du thon contaminé à 10 UFC/g et conservé à 2°C atteindra une concentration de 500 mg/kg d'histamine en 15 jours avec une croissance de 7,5 log UFC/g. Une expérience similaire, mais avec une incubation à 4,4°C, indique qu'en 10 jours, la valeur toxique de 500 mg/kg est atteinte. De même, avec une contamination initiale à 1000 UFC/g, la production de 500 mg/kg d'histamine à 2°C est plus rapide et s'effectue en 10 jours, et en moins de 7 jours à 4,4°C. La synthèse d'histamine par *M. morgani* dans ces conditions est beaucoup plus lente. La FDA indique que la durée de vie maximale des produits frais conditionnés sous air est de 5 à 7 jours à 4,4°C à cause de la formation d'histamine (FDA/CFSAN, 2001).

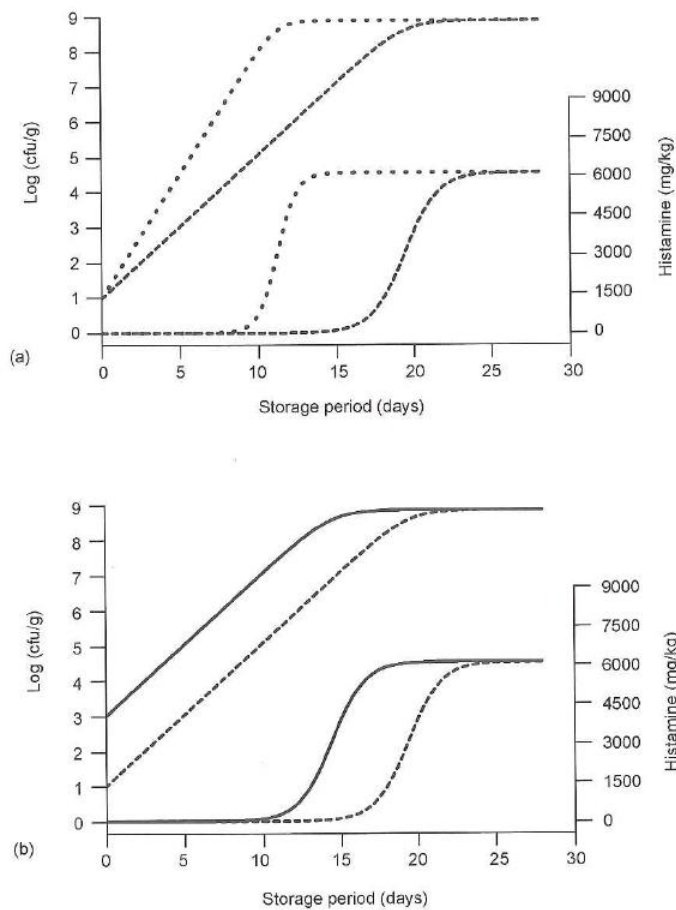


Figure 17 : Croissance de *M. psychrotolerans* d'après le Seafood Spoilage and Safety Predictor dans différentes conditions. a) Croissance dans du thon avec une concentration initiale à 10 UFC/g à 4°C et 2 °C pendant 28 jours. b) Croissance dans du thon à 2°C avec une concentration de 10 UFC/g ou 1000 UFC/g pendant 28 jours

Ceci correspond au temps prédit pour la production de 500 mg/kg d'histamine dans un poisson avec une contamination initiale de 1000 UFC/g de *M. psychrotolerans*. Ce genre de modèle peut être très

utile pour déterminer les temps et températures de stockage critiques des produits. Il pourrait donc permettre de réduire les intoxications histaminiques par une meilleure maîtrise du procédé. La mise au point d'un modèle pour *P. phosphoreum* pourrait être aussi envisagée.

La maîtrise de la formation d'histamine passe d'une part par une meilleure connaissance et détection des bactéries histaminogènes, d'autre part par le développement de nouveaux moyens de maîtrise adaptés. Ces deux approches vont être développées dans la suite de ce chapitre.

## **7. Les méthodes de détection et de quantification des bactéries histaminogènes**

### **7.1. Détection par méthode biochimique**

Les premières méthodes rapides pour déterminer le potentiel histaminogène de bactéries se sont basées sur des modifications du pH visualisées par un indicateur coloré. En effet, l'histamine est une amine biogène basique qui, lorsqu'elle est produite en grande quantité, va induire une augmentation du pH du milieu. Le pourpre de bromocrésol est de couleur jaune à pH inférieur à 5,2 et pourpre quand le pH devient basique à partir de 6,8. Le premier milieu de ce type fut développé par Niven (1981), ce milieu a ensuite été partiellement modifié par Majjala (1993) puis par Mavromatis et Quantick (Majjala, 1993; Mavromatis and Quantick, 2002; Niven *et al.*, 1981). Le milieu de Majjala initialement prévu pour la tyramine a été modifié pour la synthèse d'histamine et se compose de 5 g/l de tryptone, 4 g/l d'extrait de levure, 0.5 g/l de Tween 80, 0.2 g/l de MgSO<sub>4</sub>, 0.05 g/l de MnSO<sub>4</sub>, 0.04 g/l de FeSO<sub>4</sub>, 0.1 g/l de CaCO<sub>3</sub>, 0.06 g/l de pourpre de bromocrésol, 20 g/l d'agar et enfin 20 g/l de L-histidine.

Une nouvelle méthode de dénombrement par microbiologie classique développée par Tao *et al.* (2009) repose sur la filtration d'eau de mer ou d'une dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans du tryptone-sel d'un produit sur un filtre d'une porosité de 0,2 µm. La membrane de filtration est ensuite déposée sur un milieu gélosé de type Marine Agar contenant 0,5 % d'histidine et 0,04 % de bleu de bromothymol. La gélose est incubée à 35°C pendant 5 heures, les colonies formant des halos bleus sont considérées comme productrices d'histamine grâce au virage de pH. A cette température, seules les bactéries mésophiles sont détectées. L'impact des bactéries psychrotolérantes n'est donc pas encore totalement pris en compte.

La détection des bactéries histaminogènes est aussi possible par méthode potentiométrique. Klausen & Huss (1987b) ont développé un milieu dénommé HDB (Histidine decarboxylase broth) composé de 0,2 % de peptone, 0,1 % Lab-Lemco, 0,81 % histidine, 0,5 % NaCl et 0,0005 % piridoxal HCl. Ce milieu est déposé en flacon potentiométrique et la production d'histamine observée à 30°C pendant 24 h. Le pourcentage de conductance exprimé en fonction du temps permet de déterminer la dégradation

de l'histidine en histamine. Cette méthode testée sur du maquereau a identifié la présence d'Entérobactéries (*M. morganii*). Une méthode potentiométrique reposant sur le même principe a été développée par Dalgaard pour la quantification de *P. phosphoreum* (Dalgaard *et al.*, 1996).

A ce jour, ces milieux colorimétriques sont peu utilisés et ont démontré des limites quant à leur fiabilité (Bjornsdottir *et al.*, 2009). En effet, l'augmentation du pH n'est pas forcément corrélée à une production d'histamine. D'autre part, le développement de la technologie PCR a imposé une alternative pour la détection des bactéries productrices d'histamine. Bjornsdottir *et al.* (2009) ont comparé 3 méthodes de détection de bactéries histaminogènes. Cent cinquante deux bactéries productrices ou non d'histamine ont été testées par la méthode colorimétrique de Niven (1981), par une méthode potentiométrique développée par Klausen and Huss (1987b) et par la méthode de PCR de Takahashi *et al.* (2003). Les 152 souches ont été caractérisées par HPLC pour déterminer leur capacité de production d'histamine entre fortement, faiblement et non productrices. Sur les 152 souches testées, 128 (84%) sont considérées positives par la méthode colorimétrique de Niven alors que 73 (48%) et 74 (49%) étaient positives par la méthode potentiométrique et la méthode PCR respectivement.

## 7.2. Détection par des outils moléculaires

Depuis que des données sur le gène *hdc* des principales bactéries histaminogènes sont disponibles, plusieurs paires d'amorces ont été dessinées pour les détecter et / ou les identifier (Tableau 10).

La paire d'amorces KPF2/KPR4 proposée par Kanki *et al.* (2002) et basée sur la séquence protéique de l'histidine décarboxylase (HDC) de *R. planticola* s'est révélée fiable pour toutes les souches de cette espèce et celle de *R. ornithinolytica*.

Toutefois, *R. planticola* n'est pas la seule espèce productrice d'histamine. Dans ce sens, une méthode moléculaire permettant à la fois une détection rapide des bactéries productrices d'histamine et aussi une différenciation des espèces par SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) a été développée par Takahashi *et al.* (2003) (Tableau 10). Ces amorces amplifient un fragment de 709 pb du gène *hdc*. La spécificité de cette méthode a été testée sur une collection de 37 souches de bactéries histaminogènes et 470 souches de bactéries non productrices isolées de poissons. Seules les souches de *M. morganii*, *R. planticola*, *E. aerogenes*, *P. damsela*, *P. phosphoreum*, *H. alvei*, *Erwinia* sp. et *Proteus vulgaris* sont détectées par la méthode tandis qu'aucun amplicon n'a été obtenu pour les souches non productrices.

Tableau 10 : Détection de bactéries histaminogènes à l'aide de paires d'amorces développées pour une méthode PCR

Amorce	Séquence 5' => 3'	Séquence protéique	Référence
KPF2	AAA GCT GGG GGT ATG TGA CC	ESWGYVT	(Kanki <i>et al.</i> , 2002)
KPR4	GTG ATG GAG TTT TTG TTG C	RNKNSIT	(Kanki <i>et al.</i> , 2002)
Hdc-f	TCH ATY ARY AAC TGY GGT GAC TGG RG	SISNCGDW	(Takahashi <i>et al.</i> , 2003)
Hdc-r	CCC ACA KCA TBA RWG GDG TRT GRC C	RNGMTPLMM	(Takahashi <i>et al.</i> , 2003)
106	AAV TCN TTY GAY TTY GAR AAR GAR G	NSFDFEKEV	(De Las Rivas <i>et al.</i> , 2005)
107	ATN GGN GAN CCD ATC ATY TTR TGN CC	GHKMIGSPI	(De Las Rivas <i>et al.</i> , 2005)
HIS2-F	AAV TSN TTY GAY TTY GAR AAR GAR GT	NSFDFEKEV	(De Las Rivas <i>et al.</i> , 2005)
HIS2-R	TAN GGN SAN CCD ATC ATY TTR TGN CC	GHKMIGSPI	(De Las Rivas <i>et al.</i> , 2005)
Deff	GGY GGI ACI GAR GGN AAN ATG	GGTEGNM	(Morii <i>et al.</i> , 2006)
DegR	GGR AAI ACI CAN GTN WTG GAG	NSITVVF	(Morii <i>et al.</i> , 2006)

La paire d'amorces hdc-f/hdc-r a été réutilisée pour développer une méthode de PCR multiplex pour différencier l'histidine décarboxylase des bactéries à Gram positif et celle des bactéries à Gram négatif, mais sans succès (de las Rivas *et al.*, 2006). De nouvelles paires d'amorces, 106/107 et HIS2-F/HIS2-R, ont été créées pour résoudre ce problème. Seule la paire d'amorces HIS2-F/HIS2-R, amplifiant un fragment de 534 pb du gène *hdc* des bactéries à Gram négatif, était suffisamment spécifique pour détecter uniquement les espèces *M. morgani*, *H. alvei*, *R. planticola*, *P. fluorescens* (De Las Rivas *et al.*, 2005).



Figure 18 : Alignement de séquences protéiques de l'histidine décarboxylase de différentes espèces bactériennes. EAR : *E. aerogenes* ; ECA : *Enterobacter cloacea* ; RPA : *R. planticola* ; ROR : *R. ornithinolytica* ; MMO : *M. morgani* ; PPH : *P. phosphoreum* ; PDA : *P. damsela* ; PFL : *Pseudomonas fluorescens* (Landete *et al.* 2008)

A partir de 2006, un grand nombre de séquences nucléotidiques du gène *hdc* des bactéries mésophiles étaient disponibles en banque. A cette même période Kanki et Dalgaard identifièrent *P. phosphoreum* comme la cause de plusieurs intoxications histaminiques, mais seul un fragment de la séquence du gène *hdc* était disponible dans les bases de données. A partir de l'alignement de plusieurs séquences du gène *hdc* de *E. aerogenes*, *Enterobacter cloacea*, *R. planticola*, *R. ornithinolytica*, *M. morgani*, *P. phosphoreum*, *P. damsela* et *P. fluorescens*, Morii *et al.* (2006) ont proposé des amorces dégénérées qui ont permis d'une part de détecter et identifier plusieurs



bactéries productrices d'histamine, d'autre part de déterminer la séquence de 1143 pb du gène *hdc* de *P. phosphoreum* (Fig. 18)

Les gènes *hdc* complets de *M. morgani*, *H. alvei*, *R. planticola*, *P. damsela*, *P. phosphoreum*, *P. fluorescens*, *E. aerogenes*, *R. ornithinolytica* sont actuellement disponibles dans les bases de données. Ces paires d'amorces ont été utilisées par la communauté scientifique pour détecter et identifier des bactéries productrices d'histamine (Bjornsdottir *et al.*, 2009; Ferrario *et al.*, 2012). Aucune de ces amorces n'ont néanmoins été testées sur *M. psychrotolerans*.

### 7.3. Méthodes de quantification

La paire d'amorces *hdc-f/hdc-r* de Takahashi *et al.* (2003) a été utilisée plus récemment pour mettre au point une nouvelle méthode de dénombrement classique associée à un marquage avec des sondes marquées à la digoxigénine (DIG). Bjornsdottir *et al.* (2010) ont ainsi développé une méthode permettant le dénombrement spécifique de *M. morgani*, *E. aerogenes*, *R. planticola* et *P. damsela* dans les produits marins jusqu'à  $1,5 \times 10^4$  UFC/g. Il est important de préciser que la sonde marquée ne réagit pas avec les bactéries faiblement productrices d'histamine.

Par la suite, Bjornsdottir *et al.* (2011) ont mis au point la première méthode de PCR quantitative en temps réel spécifique des bactéries histaminogènes mésophiles. Les amorces *hdc-forward* (5'-TCH ATY ARY AAC TGY GGT GAC TG-3') et *hdc-reverse* (5'-CCR TTR GTN ACR TAV CCC CA-3') ainsi que la sonde *hdc* (5' FAM-AAC TCN TTY GAY TIY GAR AAR GAR G-3' MGBNFQ) se fixent sur un fragment de 139 pb du gène *hdc*. Un contrôle interne a été mis en œuvre pour valider la méthode. Ces amorces sont spécifiques de *M. morgani*, *R. planticola*, *R. ornithinolytica*, *E. aerogenes*, *E. gergoviae* et *P. damsela*. Ultérieurement, cette méthode a été améliorée pour obtenir une méthode de PCR en temps réel en fonction du nombre le plus probable (MPN). Quatre sondes spécifiques de 4 espèces de bactéries mésophiles ont été développées et testées avec succès sur du mahi-mahi et du maquereau permettant une quantification de *M. morgani*, *R. planticola*, *E. aerogenes* et *P. damsela* jusqu'à 3.6 MPN/g en produits (Bjornsdottir *et al.*, 2011b).

Ferrario *et al.* (2012) ont analysé des longes de thon albacore pour détecter des bactéries histaminogènes à l'aide des amorces de Takahashi *et al.* (2003). Dans cette étude, plusieurs souches de *Citrobacter koseri/Enterobacter* spp. et surtout *M. morgani* ont été identifiées comme fortement productrices d'histamine dans ces produits. Du fait de l'impact important de *M. morgani*, ces auteurs ont développé par la suite une méthode de PCR quantitative en temps réel spécifique de *M. morgani*. Cette méthode permet la quantification jusqu'à  $10^2$  UFC/g en produits. Cependant, il est

important de rester prudent quant à cette méthode. En effet les amorces qui ont été dessinées sur l'ADNr 16S de *M. morgani* ont été testées sur d'autres entérobactéries sauf *M. psychrotolerans*.

**Tableau 11 : Liste des amorces et des sondes utilisées pour détecter ou quantifier les bactéries histaminogènes par PCR et PCR en temps réel**

Amorce ou sonde	Sequence 5'-3'	Références
<b>Amorces hdc</b>		
		i.
<b>hdc-Forward</b>	5' TCH ATY ARY AAC TGY GGT GAC TG 3'	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
<b>hdc-Reverse</b>	5' CCR TTR GTN ACR TAV CCC CA 3'	
<b>Sonde globale</b>		
		ii.
<b>Sonde hdc</b>	5'/FAM/AAC TCN TTY GAY TTY GAR AAR GAR G/MGBNFQ/3'	Bjornsdottir-Butler <i>et al.</i> , 2011a
<b>Sonde spécifique</b>		
		iii.
<b>SondeMm449</b>	5'/FAM/ATT TCG CAG ACC TGT TCA AA/MGBNFQ/3'	Bjornsdottir-Butler <i>et al.</i> , 2011b
<b>Sonde Rp1</b>	5'/TxRED/ACT GCA ACT ACT TAT TAA ACT CCT TTG ATT/BHQ2/3'	
<b>Sonde Ea1</b>	5'/Cy5/CTA TTT ACT CAA CTC TTT CGA CTT TGA AAA/BHQ2/3'	
<b>Sonde Pd1</b>	5'/TET/ATT GAG TA TTT TGC ACA TAC TTT/MGBNFQ/3'	
<b>Contrôle Interne d'Amplification (IAC) – Amorces et sondes</b>		
		iv.
<b>IAC Forward</b>	5' ATG GGT GCC GTT CGA GC 3'	Bjornsdottir-Butler <i>et al.</i> , 2011a
<b>IAC Reverse</b>	5' GAG ACG ATG CAG CCA TTC G 3'	
<b>Sonde IAC</b>	5'/Cy5/TCT CAT GCG TCT CCC TGG TGA ATG TG/BHQ2/3'	

a FAM, 6-carboxyfluorescein; MGBNFQ, minor groove binding nonfluorescent quencher; BHQ2, black hole quencher 2; TET, tetrachlorofluorescein; TxRED, Texas Red.

b Y = (C/T), R = (A/G), N = (A/G/C/T), V = (A/G/C).

De nombreuses avancées ont été réalisées pour développer des outils de biologie moléculaire pour mieux appréhender l'intoxication histaminique et les points critiques de son apparition. Néanmoins, elles se sont focalisées sur les bactéries mésophiles et n'ont jamais été testées sur *M. psychrotolerans*. Or, il a bien été démontré que les bactéries psychrotolérantes sont un risque majeur pour la qualité des produits. Ce n'est qu'en 2013 qu'une méthode de PCR en temps réel SYBR Green fut développée pour la quantification de *P. phosphoreum*. Elle permet la quantification spécifique en produits jusqu'à 10<sup>3</sup> UFC/g de cette bactérie par l'utilisation d'un couple d'amorces spécifiques d'un fragment de 350 pb du gène de la gyrase sous-unités β (Macé *et al.*, 2013). La contamination par *M. psychrotolerans* est encore peu étudiée et aucun outil de détection ou de dénombrement spécifique n'est actuellement disponible.

## 8. Options de gestion du risque de formation d'histamine dans les produits marins

A l'heure actuelle, la formation d'histamine est maîtrisée par l'application stricte de la chaîne du froid. En effet, la formation d'histamine est dépendante de la température et la production est réduite à basse température par le biais d'une croissance microbienne plus lente et une réduction de l'activité enzymatique (Prester, 2011).

Bien que l'usage de la chaîne du froid permette de maintenir une certaine qualité de produit, elle reste insuffisante pour assurer une totale maîtrise de la formation d'histamine. En effet, la découverte de bactéries psychrotolérantes aptes à produire de l'histamine à des températures inférieures à 5°C oblige les scientifiques à développer de nouveaux outils (Dalgaard *et al.*, 2006; Emborg *et al.*, 2005). D'autre part, tous les pays n'ont pas les mêmes possibilités de préservation de leurs produits en particulier au niveau de la réfrigération. Dans ces circonstances, l'utilisation d'autres procédés est essentielle pour garantir la sécurité du consommateur et améliorer la durée de vie du poisson.

De plus, malgré la mise en place de normes de températures pour la conservation des produits et d'une réglementation sur la limite autorisée, les statistiques ne montrent pas d'atténuation du nombre d'épidémies recensées. Seul le Japon par une modification de ses habitudes culinaires a vu une légère diminution de cette intoxication (Børresen, 2008). A l'heure actuelle, peu d'études ont porté sur la maîtrise du risque histaminique dans les produits marins par l'utilisation de procédés innovants (Naila *et al.*, 2010).

Plusieurs approches sont envisageables pour améliorer la maîtrise de cette intoxication :

- ✓ Maîtriser la contamination par les bactéries histaminogènes
- ✓ Maîtriser la croissance des bactéries histaminogènes dans les produits pour empêcher la synthèse d'histidine décarboxylase
- ✓ Réduire l'activité de l'histidine décarboxylase
- ✓ Dégrader l'histamine après sa formation dans le produit. Cette solution peut concerner des produits pour lesquels le procédé de transformation peut favoriser la production d'histamine comme dans les sauces ou pâtes fermentées à base de poisson (Hu *et al.*, 2007; Naila *et al.*, 2011)

Une grande part des travaux a porté sur les produits fermentés à base de poisson tel que les sauces où l'histamine peut être produite à la fois dans le poisson avant fermentation par des bactéries à

Gram négatif puis lors de la fermentation par des bactéries à Gram positif telles que *Tetragenococcus* ou *Staphylococcus*. Dans l'ensemble des produits riches en histidine, ces expérimentations ont porté sur des méthodes d'ionisation, de hautes pressions, de pressions hydrostatiques, de conditionnement, de cultures starters ou encore par l'ajout d'additifs alimentaires et/ou conservateurs. Plus récemment, il a aussi été proposé l'utilisation d'un traitement enzymatique pour dégrader l'histamine.

### 8.1. Ionisation des produits

La méthode d'ionisation des produits par rayonnement Gamma ( $\gamma$ ) a été introduite dans les années 50. Après validation sanitaire de la consommation de produits ionisés, cette méthode a été appliquée dans certaines catégories de denrées alimentaires pour améliorer la durée de conservation des produits et leur qualité sanitaire ou pour limiter l'utilisation de conservateurs chimiques. L'ionisation des produits de la mer peut être utilisée pour réduire la formation d'amines biogènes par radiolyse d'une part et par réduction du nombre de bactéries histaminogènes, d'autre part.

Au dessus de 5 kGy une dégradation importante de la spermine, spermidine et putrescine a été observée par Kim *et al.* (2002a, 2002b) dans de l'eau distillée. Quatre vingt-quinze % des amines biogènes à une concentration de 100 mg/kg ont été dégradées après une exposition à 20 kGy. L'utilisation de cette technique reste limitée puisque l'application sur produits peut induire une oxydation de la chair du poisson avec des modifications organoleptiques et visuelles. Par la suite d'autres études ont porté sur divers produits impliqués dans des intoxications. Du maquereau et de la bonite (*Scomber japonicus*) ont subi un traitement à des doses ionisantes allant de 1 à 7,5 kGy. D'après les caractéristiques sensorielles, seules de faibles doses ionisantes sont acceptables et doivent rester inférieures à 1,5 kGy. Cette dose de 1,5 kGy a permis d'augmenter la durée limite de conservation de ces produit de 7 jours en réduisant de 4 log UFC/g la contamination initiale du produit et en empêchant la production d'histamine (Mbarki *et al.*, 2009a, 2009b, 2008).

Une autre étude de Nei *et al.* (2012) a été effectuée pour déterminer la valeur  $D_{10}$  (valeur pour laquelle 90% des bactéries sont détruites) pour 3 bactéries histaminogènes mésophiles: *M. morgani*, *R. planticola* et *E. aerogenes*. La valeur  $D_{10}$  est estimée entre 0,32 et 0,48 kGy. Il est cependant nécessaire d'ioniser les produits jusqu'à 4 kGy pour éliminer totalement les bactéries histaminogènes. D'autre part, une ionisation aussi forte induit une modification de la texture et de la couleur de la chair de thon.

Sur de la sardine ionisée à 0, 1 et 3 kGy, une diminution très importante de la production d'histamine a pu être observée sur des produits conservés à 4°C et 30°C ; cependant, le traitement ionisant à 3 kGy induit une forte oxydation des lipides (Maltar-Strmecki *et al.*, 2013).

Bien qu'autorisée aux Etats-Unis pour des doses ionisantes inférieures à 10 kGy (WHO, 1994), l'ionisation des produits de la mer est limitée en France aux crevettes congelées décortiquées ou étêtées. En Europe, la législation autorise l'ionisation de certains produits mais oblige un étiquetage adéquat. Les denrées alimentaires qui peuvent être ionisés vont des fruits et légumes aux cuisses de grenouille et sont décrites précisément dans les directives 1999/2/EC et 1999/3/EC.

### **8.2. Traitement par pression hydrostatique**

Le procédé de Haute Pression Hydrostatique (HPH), quelquefois dénommé Pascalisation, consiste à appliquer une haute pression par eau comprimée sur un produit alimentaire emballé (Lerasle *et al.*, 2012). Cette méthode permet de dégrader la membrane bactérienne pour inactiver ou tout simplement détruire la flore bactérienne. Par l'inactivation des micro-organismes, cette méthode permet d'augmenter la DLC des produits tout en conservant leurs caractéristiques organoleptiques et sensorielles. Ce procédé est déjà appliqué sur divers produits alimentaires comme le guacamole ou les huîtres aux États-Unis, les fruits au Japon ou encore sur le jambon en Espagne (Patterson, 2005). Depuis, cette méthode a été appliquée sur d'autres produits dont le poisson. Ainsi, l'application de ce procédé à la matière première ou sur le produit fini peut réduire la présence des bactéries histaminogènes. Le traitement de sauces fermentées avec des pressions de 350 MPa durant 15 minutes a diminué de 20,1 % le nombre de bactéries lactiques tout en réduisant de 12,5 %, 8,7 % et 17 % la cadavérine, putrescine et tyramine respectivement, dans la sauce pendant 160 jours de stockage par rapport à de la sauce non traitée (Ruiz-Capillas *et al.*, 2007). Ce procédé a aussi été appliqué dans du thon albacore et du mahi-mahi où une diminution des bactéries histaminogènes et une réduction de l'activité de l'histidine décarboxylase ont pu être observées à des pressions entre 300 et 400 MPa. Ceci n'affecte pas la qualité finale du poisson (Bolton *et al.*, 2009). Enfin, une étude récente s'est focalisée sur le traitement haute pression de filets de truites arc-en-ciel sous-vide. Après traitement à des pressions de 300 à 500 MPa, les filets de truite n'ont pas montré de formation d'histamine pendant 70 jours de stockage (Matejkova *et al.*, 2013).

### **8.3. Application d'additifs ou de conservateurs alimentaires**

La réduction de la synthèse d'amines biogènes par l'ajout d'additifs alimentaires tels que des conservateurs ou par le biais d'ingrédients tels des épices a été bien étudiée (Tableau 12).

La formation d'amines biogènes, observée lors de l'étape de fermentation de certaines sauces de poisson, est réduite par l'ajout de sorbate et d'hexametaphosphate (Tableau 12), ces substances peuvent malgré tout être responsables de la formation d'odeur soufrée dans des sauces à base de sardine à faible température (2 jours) (Bozkurt, 2006). L'utilisation d'acide ascorbique et de nitrite de

sodium ont permis une baisse significative de l'accumulation des amines biogènes dans des sauces fermentées turques (Bozkurt, 2006; Kurt and Zorba, 2009). Dans la sauce de Myeolchi-jeot à base d'anchois salés et fermentés, l'ajout de glycine a permis de réduire de 63 à 73 %, la concentration en amines biogènes à la fin du procédé de fabrication. Dans le poisson, la synthèse d'histamine a été inhibée sur du maquereau stocké à 25°C pendant 10 jours par l'ajout de plusieurs additifs dont l'acide citrique, l'acide succinique, le D-sorbitol et l'acide malique (Shalaby, 1996).

D'autre part, dans ces sauces, différents ingrédients ajoutés lors du procédé de fabrication ont démontré une capacité à inhiber les amines biogènes. La tyramine et la cadavérine sont les 2 principales amines biogènes formées lors du processus de fermentation. Le sucre, un ingrédient utilisé lors de la fermentation, permet de réduire cette synthèse d'amines biogènes, son omission est donc fortement déconseillée.

Des épices comme le gingembre, l'ail, l'oignon, la cannelle et le clou de girofle ont démontré un potentiel inhibiteur face à la production d'amines biogènes dans la sauce de Meyolchi-jeot (Mah and Hwang, 2009a). L'addition de 5% d'ail lors de la fermentation a ainsi permis une diminution de la concentration en amines biogènes de 8,7 %. Cette inhibition est liée à l'allicine qui est le composé actif présent dans l'ail, un des aromates les plus consommés au monde (Batra and Rajeev, 2007).

**Tableau 12 : Réduction de la synthèse d'amines biogènes par des additifs alimentaires**

Produits	Additifs appliqués	Stockage	Réduction des amines biogènes	Référence
<b>Maquereau indien</b>	10 % de curcumine, de capsaïcine ou de piperine	5°C 8 jours	Histamine : 200 à 13 mg/kg Putrescine : 200 à 100 mg/kg Tyramine : 200 à 100 mg/kg	(Shakila <i>et al.</i> , 2003)
<b>Sauce fermentée</b>	Sucre (glucose, lactose) entre 4000 et 20000 mg/kg	4°C et 19°C 20 jours	Cadavérine et tyramine	(Bover-Cid <i>et al.</i> , 2001)
<b>Sauce fermentée (Sucuk)</b>	Pyrophosphate de potassium ( 2500 mg/kg), hydrogène phosphate dipotassium ( 2500 mg/kg), acide ascorbique (500 mg/kg), alpha-tocopherol et sorbate de potassium (200 mg/kg).	20°C, 30°C et 40°C 60 jours HR <sup>b</sup> entre 50, 65 et 80 %	<b>Histamine</b> (baisse de 242 à 35 mg/kg à 80% d'HR à 30°C), <b>Putrescine</b> (baisse de 378 à 12 mg/kg à 65% d'HR et 40°C) et <b>Tryptamine</b> (baisse de 60 à 14 mg/kg à 50% d'HR à 20°C)	(Bozkurt, 2006)
<b>Myeolchi-Jeot<sup>a</sup></b>	5% d'extrait d'ail	25°C 25 jours	Histamine : - 20,8 % Tyramine : -31,2%	(Mah and Hwang, 2009a)
<b>Myeolchi-Jeot<sup>a</sup></b>	5% de glycine et 20% de NaCl	25°C 25 jours	Réduction de 63 à 73% de toutes les amines biogènes	(Mah and Hwang, 2009a)

a : Anchois fermentés

b : HR, Taux d'humidité relative

L'effet des additifs et des ingrédients a été testé directement sur certaines bactéries histaminogènes. Des extraits de sauge, clou de girofle, cannelle et de noix de muscade ont permis de ralentir la formation d'amines biogènes par *Enterobacter aerogenes*. Cet effet inhibiteur a été accru par ajout de NaCl. Les molécules de cinnamaldehyde (cannelle) et d'eugenol (clou de girofle) issues de ces extraits se sont révélés les plus efficaces (Wendakoon and Sakaguchi, 1995). L'utilisation de 0,5 % de potassium sorbate et d'huiles essentielles de citronnelle ont un effet inhibiteur sur la production d'amines biogènes par *M. morgani* et de *Klebsiella pneumoniae* (seulement le sorbate) (Sangcharoen *et al.*, 2009; Shalaby, 1996).

Enfin, une espèce fortement productrice d'histamine, *Bacillus licheniformis*, isolée à partir de Myeolchi-jeot a vu sa production d'histamine, cadavérine et putrescine réduite de 93, 78 et 32 % respectivement en présence de 10 % de glycine. De plus, dans ces conditions aucune production de tyramine et de spermidine n'a été observée (Wei *et al.*, 1990 ; Mah and Hwang, 2009a).

#### **8.4. Le conditionnement des produits**

Un conditionnement approprié des produits marins, aux normes de températures définies par la FAO ou l'EFSA, permet d'améliorer leurs durées de conservation (Sivertsvik 2002). En effet, de la chair de poisson sous air à des températures de réfrigération ne peut être conservée que 2 à 3 jours avant que ses qualités sensorielles, biochimiques et microbiologiques ne s'altèrent. Pour palier cette durée de conservation relativement courte, de nouveaux moyens de conditionnement ont été mis en place tels que le conditionnement sous-vide (SV) ou sous atmosphère protectrice avec différents mélanges gazeux à base d'O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>. Il est important de noter qu'en absence d'O<sub>2</sub>, l'efficacité de l'histidine décarboxylase est améliorée, tandis qu'en présence d'O<sub>2</sub> ce sont les histaminases qui sont plus efficaces (Kapeller-Adler, 1944).

Prévenir la formation d'histamine, par un conditionnement adapté, est étudié depuis 1990. Wei (1990) a testé l'effet d'un emballage sous-vide sur du thon frais artificiellement contaminé par *M. morgani*, *H. alvei* ou *K. oxytoca*. Aucun effet inhibiteur n'a été observé à 2°C ou 10°C par rapport à l'emballage sous air. Lopez-Calvez (1995) réussi à doubler le temps de conservation de steak de thon en utilisant un mélange gazeux de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (40/60), tout en préservant la qualité microbiologique et sensorielle du produit (Lopez-Calvez *et al.*, 1995). Par exemple, dans le hareng et la sardine, une production de putrescine et de cadavérine a été relevée sous air en moins de 3 jours. Le conditionnement sous MAP avec un mélange CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (60/40), plus efficace qu'un emballage sous-vide, a permis de retarder cette production d'amines à 9 jours et 16 jours. La concentration en histamine n'a pas dépassé le seuil fixé par la FDA (Özogul *et al.*, 2004, 2002a, 2002b).

Dans d'autres poissons, tel que l'espadon, le conditionnement sous MAP avec 40% CO<sub>2</sub>, 30 % N<sub>2</sub> et 30 % O<sub>2</sub> a assuré une conservation de la chair durant 12 jours au lieu de 7 jours sous air et 9 jours sous-vide selon les normes sensorielles et biochimiques (Pantazi *et al.*, 2008). Le conditionnement de thon frais ou d'orpie sous-vide ou sous MAP (60 % CO<sub>2</sub> et 40 % N<sub>2</sub>) ne bloque pas la production d'histamine en présence de *M. psychrotolerans* ou de *P. phosphoreum*. Ainsi en 24 jours à 1,7°C, ces produits ont été caractérisés par des concentrations en histamine supérieures à 5000 mg/kg. Cependant, l'utilisation d'un mélange de 40 % CO<sub>2</sub> et 60 % d'O<sub>2</sub> pour conserver le thon a justement empêché la formation d'histamine pendant 28 jours à 1,7 °C (Dalgaard *et al.*, 2006; Emborg *et al.*, 2005). Plus récemment, le conditionnement sous-vide de maquereau n'a eu aucun effet sur la production d'amines (Mbarki *et al.*, 2009a).

In fine, le conditionnement des produits marins sous-vide ou sous MAP avec un mélange de 40 % CO<sub>2</sub> et 60 % d'O<sub>2</sub> permet, par rapport à un produit sous air, d'améliorer drastiquement sa conservation de plusieurs jours et d'inhiber la production d'histamine dans plusieurs matrices riche en histidine libre.

#### **8.5. L'oxydation de l'histamine**

Certaines bactéries possèdent une activité amine oxydase qui peut dégrader les amines biogènes et ainsi réduire la concentration dans les produits alimentaires. Ces bactéries appartiennent aux espèces *Micrococcus varians*, *Natriema gari*, *Brevibacterium lineni*, *Virgibacillus* sp. SK33 et *S. xylosus* (Dapkevicius *et al.*, 2000; Leuschner *et al.*, 1998; Tapingkae *et al.*, 2010; Yongsawatdigul *et al.*, 2004). *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007 possède l'enzyme DAO qui permet donc de dégrader uniquement l'histamine. De plus, la DAO a été isolée de la bactérie et son activité étudiée (Sekiguchi *et al.*, 2004).

Certaines de ces bactéries ont été testées dans des produits fermentés pour oxyder les amines biogènes. Mah et Hwang (2009) ont testé un cocktail de « starters », dont *S. xylosus*, dans de la sauce d'anchois fermentés qui a permis une diminution de 38 % en histamine et de 4% en tyramine. De même, *Virgibacillus* sp. SK3 peut réduire de 50% la concentration en histamine dans de la sauce de poisson Thai (J Yongsawatdigul *et al.*, 2007). En parallèle, certaines souches de *Lactobacillus* sont aussi capables de réduire les amines biogènes. Dapkevicius (2000) a isolé des bactéries lactiques d'un pâté de maquereau et a remarqué que 5 souches de *L. sakei* et *L. curvatus* étaient capables de réduire de 20 à 54 % la concentration en histamine en milieu MRS.

L'enzyme DAO a été récemment utilisée seule dans de la sauce de poisson Rihakuruu qui est souvent considérée comme un produit ayant une très forte concentration en histamine. Cette enzyme



appliquée après la cuisson de la sauce, permet de réduire à des teneurs réglementaires la concentration en amines biogènes de ce produit (Naila *et al.*, 2012).

## **8.6. La biopréservation**

Le laboratoire EM<sup>3</sup>B d'Ifremer et le laboratoire UMR 1014 SECALIM d'ONIRIS ont une grande expérience dans le domaine de la biopréservation des produits de la mer pour prévenir la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes sur du poisson ou des crustacés. Cette méthodologie a été choisie pour offrir une alternative ou un complément aux procédés déjà mis en œuvre. La maîtrise de la formation d'histamine par biopréservation peut apporter plusieurs éléments bénéfiques sur le plan socio-économique :

- ✓ La réduction du nombre d'alertes sanitaires liées aux intoxications histaminiques
- ✓ L'augmentation de la consommation de poisson liée à une meilleure maîtrise de la sécurité sanitaire et à une plus grande confiance des consommateurs
- ✓ La réduction des pertes de matière liées aux rappels et destructions pour des raisons sanitaires

La biopréservation consiste à appliquer sur un produit des souches bactériennes sélectionnées, de manière à inhiber la flore indésirable qui pourrait s'y trouver, sans modifier les caractéristiques organoleptiques et sensorielles de ce produit (Le Fur *et al.*, 2013).

La biopréservation a été appliquée depuis une dizaine d'années aux produits de la mer en utilisant essentiellement des bactéries lactiques bioprotectrices. C'est une technique douce de conservation des aliments qui peut se substituer à l'utilisation de conservateurs.

La biopréservation est associée à d'autres technologies de barrière comme la réfrigération, le conditionnement sous-vide ou sous MAP qui permettent d'améliorer la DLC des produits frais et faiblement préservés ou de lutter contre la croissance de bactéries pathogènes (Leistner, 2000).

### 8.6.1. L'impact des bactéries lactiques dans les produits marins

Les bactéries lactiques sont des bactéries ubiquitaires à Gram positif sous la forme de coques ou de bacilles, asporulées, anaérobies facultatives, catalase négative, oxydase négative et capables de dégrader les sucres en acide lactique (Dellaglio *et al.*, 1994). Elles ont un métabolisme chimio-organotrophe, ce qui signifie qu'elles utilisent comme source énergétique des substances hydrocarbonées telles que des sucres, les alcools, et les acides organiques. Elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexes en termes d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucres (Dellaglio *et al.*, 1994). Les bactéries lactiques des produits marins

appartiennent aux genres *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Leroi, 2010).

La microflore des produits de la mer dépend de plusieurs facteurs dont la charge bactérienne de la matière première. La microflore des poissons vivants est répartie sur les surfaces d'échanges avec l'environnement : la peau, les branchies, le mucus et le tractus intestinal. Sauf en cas d'infection, le muscle est stérile. Des bactéries lactiques ont souvent été isolées de poissons vivants, en général dans le tractus digestif. Des bactéries du genre *Lactobacillus* ont été retrouvées dans du saumon et de l'omble chevalier. Des bactéries du genre *Carnobacterium* ont été isolées elles aussi de saumon et d'omble chevalier, ainsi que de la truite, de la morue et du loup. Les espèces de *Carnobacterium* les plus fréquemment rencontrés sont *C. divergens* et *C. maltaromaticum*. La présence d'autres genres et espèces tels que *Lactococcus piscium*, *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. sakei* et *L. curvatus*) *Streptococcus* et *Leuconostoc mesenteroides* a également été rapportée. Enfin, des bactéries lactiques, des espèces *L. lactis* et *L. raffinolactis* ont été retrouvées en temps qu'espèces dominantes de la flore intestinale de poissons d'eau douce (carpes) (Hagi *et al.* 2004).

Lors de l'abattage des poissons, durant le filetage et l'éviscération, des microorganismes endogènes de la matière première peuvent contaminer la chair. Les conditions de production et les manipulations humaines sont aussi des sources de contamination des produits finis. Les bactéries lactiques sont désavantagées par rapport aux bactéries à Gram négatif psychrotrophes tels que *Pseudomonas* ou *Shewanella putrefaciens* sur les produits conservés à l'air ou sous vide. Par contre, les produits faiblement préservés qui font l'objet d'un emballage sous atmosphère protectrice, ou d'une étape de fumage, de fermentation ou encore de marinade sont favorables au développement des bactéries lactiques. Les principales espèces bactériennes isolées de produits de la mer faiblement préservés sont présentés dans le tableau 13. Plus de détails sur les bactéries lactiques sont disponibles dans la revue de Leroi (2010).

Tableau 13 : Liste des principales bactéries lactiques isolées de poissons (Leroi *et al.*, 2010)

Bactéries lactiques	Produits marins	Références
<i>Carnobacterium sp.</i>	Lompe	Basby <i>et al.</i> , 1998
<i>Carnobacterium divergens</i>	Saumon fumé à froid	Leroi <i>et al.</i> , 1996 Lyhs <i>et al.</i> , 2002
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Saumon fumé à froid, Truite Arc-en-Ciel, Crevette, Salade avec produits marins	Lyhs <i>et al.</i> , 2002 ; Mejholm <i>et al.</i> , 2005
<i>Enterococcus</i>	Truite fumé à froid Salade avec des produits marins	Lys <i>et al.</i> , 1998 Andrighetto <i>et al.</i> , 2009
<i>Enterococcus faecalis</i>	Saumon fumé à froid, poisson séché et salé traditionnel (Himalaya), crevette mariné, crevette sous atmosphère modifié	Andrighetto <i>et al.</i> , 2009; Jaffrès <i>et al.</i> , 2009; Dalgaard and Jørgensen, 2000; Thapa <i>et al.</i> , 2006; Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002; Dalgaard <i>et al.</i> , 2003
<i>Enterococcus faecium</i>	Crevette cuite sous atmosphère modifié, poisson séché et salé traditionnel	Jaffrès <i>et al.</i> , 2008; Thapa <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Saumon fumé à froid, hareng mariné	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002; Lyhs <i>et al.</i> , 2001a
<i>Lactobacillus casei subsp tolerans</i>	Saumon fumé à froid	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus coryneformis</i>	Saumon fumé à froid	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Saumon et truite fumé à froid, truite marinée, crevette en saumure, hareng fumé, salade de produits marins	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002 ; Truelstrup Hansen and Huss, 1998 ; Jørgensen <i>et al.</i> , 2000b ; Lyhs <i>et al.</i> , 1999 ; Lyhs <i>et al.</i> , 2002 ; Dalgaard and Jørgensen, 2000a ; Dalgaard <i>et al.</i> , 2003 ; Gancel <i>et al.</i> , 1997 ; Andrighetto <i>et al.</i> , 2009
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Saumon fumé à froid	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus farciminis</i>	Saumon fumé à froid	Leroi <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	Hareng mariné	Lyhs and Bjorkroth, 2008
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	Saumon fumé à froid	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus malfermentans</i>		Andrighetto <i>et al.</i> , 2009
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Saumon et truite fumé à froid	Lyhs <i>et al.</i> , 1999; Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002; Gancel <i>et al.</i> , 1997
<i>Lactobacillus sakei</i>	Saumon et truite fumé à froid, truite marinée	Leroi <i>et al.</i> , 1998; Truelstrup Hansen and Huss, 1998; Jørgensen <i>et al.</i> , 2000b; Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002 ; Lyhs <i>et al.</i> , 1999; Lyhs <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactococcus sp.</i>	Saumon fumé à froid, hareng mariné, lompe salé	Paludan-Müller <i>et al.</i> , 1998; Basby <i>et al.</i> , 1998; Lyhs and Bjorkroth, 2008
<i>Lactococcus piscium</i>	Steak de saumon sous atmosphère modifié	Matamoros <i>et al.</i> , 2009b
<i>Lactococcus lactis</i>	Poisson séché et salé traditionnel (Himalaya), salade de produits de la mer	Thapa <i>et al.</i> , 2006 Andrighetto <i>et al.</i> , 2009
<i>Lactococcus plantarum</i>	Poisson séché et salé traditionnel (Himalaya)	Thapa <i>et al.</i> , 2006
<i>Leuconostoc carnosus</i>	Saumon fumé à froid	Truelstrup Hansen and Huss, 1998
<i>Leuconostoc citreum</i>	Truite fumé à froid	Lyhs <i>et al.</i> , 1999
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Saumon et truite fumé à froid, truite marinée, crevette en saumure, hareng fumé, salade de produits de la mer	Truelstrup Hansen and Huss, 1998; Jørgensen <i>et al.</i> , 2000b; Lyhs <i>et al.</i> , 1999; Thapa <i>et al.</i> , 2006; Andrighetto <i>et al.</i> , 2009
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Truite fumé à froid, steak de saumon sous atmosphère modifié	Truelstrup Hansen and Huss, 1998; Matamoros <i>et al.</i> , 2009b
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Poisson salé et séché traditionnel	Thapa <i>et al.</i> , 2006
<i>Pediococcus sp.</i>	Salade de produits marins	Andrighetto <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptococcus parauberis</i>	Crevette cuite sous MAP	Andrighetto <i>et al.</i> , 2009
<i>Vagococcus fluvialis</i>	Salade de fruits de mer	Andrighetto <i>et al.</i> , 2009
<i>Vagococcus sp.</i>	Poisson séché ou salé	Thapa <i>et al.</i> , 2006
<i>Weissella confusa</i>	Saumon fumé à froid	Gonzalez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002
<i>Weissella kandleri</i>	Salade de fruits de mer	Andrighetto <i>et al.</i> , 2009

Beaucoup d'études ont porté sur le saumon et la crevette mais à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la description des bactéries lactiques présentes dans les produits riches en histidine libre tels que le thon, le maquereau ou la sardine. Le projet EcoBioPro (ANR 2011-2014) qui porte sur la description des écosystèmes microbiens et des produits carnés de la mer par pyroséquençage, présente des outils moléculaires intéressants pour étudier la flore microbienne de ces produits.

La biopréservation à l'aide de bactéries lactiques est une alternative intéressante aux méthodes actuelles. Ces bactéries bénéficient du statut GRAS (Generally Recognized as Safe) aux Etats-Unis (FDA) et pour plusieurs d'entre elles, du statut QPS (Qualified Presumption of Safety) en Europe qui est délivrée par l'EFSA (2007). Leurs propriétés bioprotectrices permettant d'améliorer la durée de conservation ou d'améliorer les propriétés organoleptiques sont bien reconnues par la communauté scientifique mais aussi bien acceptées par le consommateur qui y voit un procédé naturel (Calo-Mata *et al.*, 2008; Leroi *et al.*, 2010).

Les bactéries lactiques issues de produits marins sont idéales pour développer une méthode de biopréservation. En effet, elles poussent à basse température entre 0 et 4°C et sont compatibles avec cet environnement (atmosphère modifiée, pH faible, forte concentration en sel ou présence d'additif).

Pour réussir à inhiber la flore altérante ou pathogène tout en devenant la flore majoritaire, les bactéries lactiques ont la faculté de synthétiser diverses molécules inhibitrices telles que des acides organiques, du CO<sub>2</sub> ou encore des peptides anti-microbiens appelés bactériocines.

#### 8.6.2. Les propriétés inhibitrices des bactéries lactiques

##### **La compétition nutritionnelle**

C'est une relation naturelle impliquant les flores présentes dans un écosystème donné. Afin d'assurer leur croissance, les micro-organismes entrent en compétition pour des éléments limitants, de nature minérale ou organique. Dans le cas des organismes auxotrophes pour certains acides aminés, la présence de micro-organismes nécessitant cette ressource peut déclencher une compétition nutritionnelle. Dans le poisson, la faible teneur en fer entraîne une compétition entre *S. putrefaciens* et *Pseudomonas* spp. pour l'acquisition du fer (Ellis *et al.*, 2000). *Pseudomonas* arrive à inhiber *S. putrefaciens* par compétition lorsque la taille de l'inoculum atteint 10<sup>8</sup> UFC/g (Gram *et Melchiorson*, 1996). Par ailleurs, *Lactobacillus* peut inhiber l'action altérante de *B. thermosphacta* par compétition au niveau du substrat dans la viande conservée à 10°C en condition aérobie (Gardner, 1980). Dans la biopréservation, l'utilisation de bactéries lactiques dans l'inhibition de flores pathogènes ou altérantes par des phénomènes de compétitions est très rarement décrite. Cependant, il a été démontré en milieu modèle par Nilsson *et al.* (2005) que l'activité inhibitrice de *C. piscicola* A9b, qui

est une souche bactériocine négative, contre *L. monocytogenes* est due à une compétition pour le glucose.

### **Métabiose**

Cette forme d'interaction est la plus rencontrée dans la nature. Qualifiée de relation d'interdépendance ou de proto-coopération, elle consiste en la création de conditions favorables pour une bactérie par une autre. Contrairement à l'antagonisme, ici, la modification du pH, la création de l'anaérobiose et la mise à disposition de substrats intermédiaires de dégradation, contribuent au développement de certaines populations bactériennes et non à leur inhibition. S'agissant des substrats, dans plusieurs cas la bactérie dépendante ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire pour s'attaquer à de grosses molécules et de ce fait dépend d'une autre bactérie capable de dégrader ces molécules. Dans la littérature des interdépendances entre les bactéries lactiques et entérobactéries sont très relatées. Borch *et al.* (1996) ont montré qu'en co-culture les bactéries lactiques et *Hafnia alvei* pouvaient causer une altération de la viande sous vide contrairement aux cultures pures. Dans le saumon fumé à froid, Joffraud *et al.* (2006) ont mis en évidence la perte du caractère altérant de *L. sakei* et *S. liquefaciens* lorsqu'elles sont mises en co-culture comparativement aux cultures pures dans lesquels le pouvoir altérant était très marqué. Ils ont aussi démontré dans la même étude que l'association de souches de *C. piscicola* et *Vibrio sp.*, deux germes non altérants en culture pure, provoquait l'apparition de mauvaises odeurs très marquées. Jørgensen *et al.* (2000) ont démontré que l'augmentation de la production de putrescine dans le saumon fumé quand les souches de *Hafnia alvei* ou *S. liquefaciens* sont en co-culture avec *L. sakei* ou *C. divergens* était liée à un métabolisme inter-espèce de l'arginine. Dans le lait réfrigéré, la production d'acide lactique par les lactocoques présents accélère la croissance de *P. fluorescens*. Cette espèce de *Pseudomonas* est incapable d'utiliser les sources de carbone et d'azote du milieu quand sa population est inférieure à  $10^5$  UFC/ml. La présence des lactocoques lève cette inhibition par la production d'acide lactique, qui est métabolisé par *P. fluorescens*. En retour, la création de l'anaérobiose par *Pseudomonas* dans le biofilm formé avec les lactocoques stimule la croissance de ces derniers (Sanjose *et al.*, 1987).

### **Les métabolites**

La principale substance et activité anti-bactérienne produite par les bactéries lactiques est l'acide lactique avec une réduction concomitante du pH (Stiles, 1996). Les effets anti-bactériens des acides organiques sont reliés à la réduction du pH ainsi qu'à la forme naturelle non dissociée de ces acides qui inhibent la croissance des bactéries indésirables. L'acide acétique et l'acide propionique sont plus efficaces pour inhiber cette flore mais sont produits à des concentrations bien moindres par les

bactéries ce qui atténue leur impact sur le produit. Ces deux acides sont parfois recherchés pour améliorer les propriétés sensorielles du fromage (Lindgren and Dobrogosz, 1990; Richards *et al.*, 1995; Wong and Chen, 1988; Woolford, 1975).

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), produit en présence d'oxygène, a tendance à s'accumuler en raison de l'absence de catalase chez les bactéries lactiques. Les enzymes impliquées dans cette production peuvent être la NADH oxydase, l' $\alpha$ -glycérophosphatase, la pyruvate oxydase et la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène a un potentiel oxydatif capable d'inhiber des bactéries pathogènes et des bactéries psychrophiles altérantes tels que des staphylocoques, des entérobactéries et des pseudomonales, en altérant les acides nucléiques et les lipides.

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) produit par les bactéries lactiques lors de la fermentation hétérolactique, crée une atmosphère anaérobie qui peut être toxique pour les bactéries aérobies strictes qui ont besoin d'oxygène comme seul accepteur final d'électron lors de la respiration.

Le diacétyle est un produit de la fermentation du citrate, il a un effet inhibiteur sur des bactéries à Gram positif et négatif telles que *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* et *Aeromonas*. Cet antimicrobien est produit par des bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Son action inhibitrice est en général peu importante, en relation avec sa faible quantité dans les produits (Jay, 1982; Lanciotti *et al.*, 2003).

D'autres métabolites peuvent avoir un effet inhibiteur tels que la reutérine ou les acides gras (Axelsson *et al.*, 1989; Ouwehand and Vesterlund, 2004). *Lactobacillus reuteri* produit un antibiotique la reutéricycline qui a un spectre d'action large contre des bactéries à Gram positif (*Listeria*, *Staphylococcus*), à Gram négatif (*Salmonella*, *Shigella*), les levures, les champignons et les protozoaires (Axelsson *et al.*, 1989; Paul Ross *et al.*, 2002).

Ces métabolites ont tous un spectre d'action large qui permet à la fois d'inhiber des bactéries indésirables mais aussi des bactéries d'intérêt pour la fermentation ou la conservation du produit. Les bactériocines ont un spectre d'action plus limité qui peut être très intéressant pour inhiber une bactérie cible sans affecter le reste de la flore microbienne (levures, champignons, bactéries).

### **Les bactériocines**

Les bactériocines sont des composés peptidiques anti-microbiens synthétisés par les bactéries. Ce sont de petits peptides qui sont produits par le ribosome sous forme mature ou sous forme d'un précurseur nécessitant une étape de maturation enzymatique ultérieure. On les distingue des antibiotiques, qui sont eux des produits secondaires du métabolisme assemblés par des réactions multi-enzymatiques. L'effet bactéricide est généralement dû à la formation de pores dans la membrane plasmique de la cellule cible. Leur spectre d'action est souvent limité aux bactéries de

genres et d'espèces proches de celui de la bactérie productrice, mais leur efficacité contre les bactéries pathogènes susceptibles de se retrouver dans les aliments est incontestable, par exemple contre *L. monocytogenes* ou *Clostridium botulinum*. Les bactériocines sont regroupées en 4 classes selon leur structure (Sonomoto and Yokota, 2011):

- ✓ Les bactériocines de **classe I** ou lantibiotiques, sont des petits peptides (moins de 5 kDa) qui subissent une modification post-transcriptionnelle. Ils contiennent des acides aminés modifiés tels que la lanthionine et la  $\beta$ -methyl-lanthionine. La nisine A, produite par *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, est la plus connue des bactériocines de classe I (Gross and Morell, 1971).
- ✓ Les bactériocines de **classe II** sont subdivisées en 4 sous-classes : IIa, IIb, IIc, IId. Les peptides de ces sous-classes sont petits (< 10 kDa), thermorésistants et ne subissent pas de modification transcriptionnelle. **Les bactériocines de classe IIa** sont des peptides à activité anti-*Listeria* avec une partie N-terminale comprenant une séquence conservée du type Tyr-Gly-Asn-Gly-Val et un pont disulfure. Les bactéries lactiques sont les principales productrices de bactériocines de classe IIa. Les peptides de référence sont la pédiocine PA-1/AcH et la leucocine A (Cleveland *et al.*, 2001; Drider *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 1992; Motlagh *et al.*, 1992).  
**Les bactériocines de classe IIb** sont composées de 2 peptides qui forment un complexe capable de percer la membrane plasmique, on y retrouve la lactococcin G et la lactacine F (Allison *et al.*, 1994; Nissen-Meyer *et al.*, 1992). **Les bactériocines de classe IIc** sont de forme cyclique tels que l'entéroccine AS-48, la gassericine A et la lactocycline Q (Abriouel *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 1998; Sawa *et al.*, 2009). Enfin, les **bactériocines de classe IId** telles que la Lactococcin A ou la lactacine Q, sont des bactériocines simples et linéaires qui ont la faculté d'augmenter la porosité de la membrane des bactéries cibles (Fujita *et al.*, 2007; Holo *et al.*, 1991).
- ✓ Les bactériocines de **classe III** sont des gros peptides (plus de 30 kDa) thermosensibles, qui sont souvent dénommées bactériolysines. Ce sont des hydrolases (murein) qui dégradent la membrane plasmique telles que l'entérolysine A contre *Enterococcus faecalis* (Nilsen *et al.*, 2003)

Actuellement, la seule bactériocine autorisée en temps qu'additif alimentaire est la nisine produite par *L. lactis* subsp. *lactis*. Au sein de l'Union Européenne, la nisine E234 est autorisée comme agent de conservation dans les aliments tels que les fromages affinés et les fromages fondus, dans certains puddings, ainsi que dans la crème caillée et le mascarpone (règlement 1338/2008). Cependant, l'ajout d'additifs est interdit dans certains produits comme le saumon fumé.

### 8.6.3. La biopréservation des produits de la mer

La biopréservation des produits de la mer par des bactéries lactiques est réalisée depuis plusieurs années déjà, l'essor de cette technique à notre époque est lié à la demande du consommateur, qui souhaite acheter des produits peu voire non transformés. Ces produits frais ou légèrement préservés, par fumage par exemple, sont plus facilement et surtout plus rapidement altérés par des bactéries à Gram négatif psychrotrophes. Le tableau 14 dresse une liste des méthodes de biopréservation développées pour réduire voir inhiber le développement des flores indésirables sur des filets de poissons, des produits fumés et des crevettes.

L'essentiel des études porte sur l'inhibition de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé. Nilsson *et al.* (1999) ont isolé deux souches de *C. maltaromaticum* capables de limiter le développement de *L. monocytogenes* pendant 31 jours à 5°C. Brillet *et al.* (2005) ont aussi démontré l'efficacité de *C. divergens* V41 contre *L. monocytogenes* dans le saumon fumé à froid, en maintenant sa population à moins de 50 UFC/g pendant 1 mois à 4 et 8°C. Toujours dans le saumon fumé à froid, Yamazaki *et al.* (2003) ont mis en évidence une baisse de la population de *L. monocytogenes* de 10<sup>3</sup> à 50 UFC/g en présence *C. maltaromaticum* CS526 après 7 jours à 4°C. Katla *et al.* (2001) ont aussi démontré l'efficacité de *Lactobacillus sakei* Lb790 qui était capable de limiter le développement de *L. monocytogenes* pendant 28 jours 10°C sur du saumon fumé à froid. Selon Vescovo *et al.* (2006), *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum* réduisent le développement de *L. innocua* de 3.3 et 2.8 log UFC/g respectivement, dans le saumon fumé à froid stocké à 4°C. Beaucoup moins d'études sont consacrées à l'inhibition des flores d'altération.

Contrairement à ce qui est observé pour l'inhibition de *L. monocytogenes*, les bactéries du genre *Carnobacterium* montrent généralement peu d'efficacité pour retarder les flores d'altération. Dans l'étude de Leroi *et al.* (1996) certaines souches de carnobactéries se sont révélées efficaces pour limiter l'altération sensorielle du saumon fumé mais les résultats étaient variables selon les lots traités. Une souche de *Bifidobacterium bifidum* a montré une activité inhibitrice vis-à-vis de *Pseudomonas* sp. et de *P. phosphoreum* dans des filets de plie conditionnés sous vide et réfrigérés (Altieri *et al.*, 2005).

Les travaux effectués par Matamoros *et al.* (2009a; 2009b) ont permis d'isoler deux souches de *Leuconostoc gelidum* et de *Lactococcus piscium* montrant une efficacité à limiter l'altération sensorielle de crevettes cuites décortiquées et de saumon fumé. Dans cette étude, les souches de *L. piscium* ont montré les activités les plus intéressantes permettant à la fois d'inhiber des bactéries pathogènes comme *L. monocytogenes* et *S. aureus*. La souche de *L. piscium* permet aussi de retarder l'altération sensorielle provoquée par *B. thermosphacta* (Fall, 2011).



Tableau 14 : Liste des travaux récents sur la biopréservation des produits marins

Produit	Culture protectrice Bactériocine employée	Effets	Références
<b>Filets de poissons frais</b>			
Poisson-chat	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19257	Amélioration de l'odeur et de l'apparence	Kim and Hearnberger, 1994
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bif. infantis</i> ou <i>Bif. longum</i>	Extension de la durée de conservation	Kim <i>et al.</i> , 1995
Chinchard	<i>Ped.</i> spp	Amélioration des qualités sensorielles	Cosansu <i>et al.</i> , 2011
Maquereau	<i>Ped. acidilactici</i> , <i>Ped. pentosaceus</i> , <i>Stre. thermophilus</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> et <i>L. helveticus</i>	Maîtrise de bactéries d'altération et la production d'amines	Sudalayandi and Manja, 2011
Truite arc-en-ciel	Solution aqueuse de nisine avec <i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i> NCFB 497	Pas d'effet notable	Kisla and ünlütürk, 2004
Saumon	<i>L. sakei</i> LAD et <i>L. alimentarius</i> BJ33	Amélioration des caractéristiques sensorielles	Morzel <i>et al.</i> , 1997
Sardine	Nisine	Inhibition de la flore altérante	Elotmani and Assobhei, 2004
Tilapia	<i>L. casei</i> DSM 120011 et <i>L. acidophilus</i>	Amélioration des qualités organoleptiques et la durée de conservation	Daboor and Ibrahim, 2008; Ibrahim and Desouky, 2009
Turbo (SV et AP)	Entérocoques producteurs d'EntP	Inhibition de <i>Listeria</i> , <i>staphylocoques</i> et bacilles	Campos <i>et al.</i> , 2012
Plie sous-vide	<i>Bif. bifidum</i>	Inhibition de <i>Pseudomonas</i> spp.	Altieri <i>et al.</i> , 2005
Truite Arc-en-ciel VP	<i>L. sakei</i> productrice de sakacine-A (Lb706)	Amélioration de la durée de conservation et inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Aras <i>et al.</i> , 2005; Katikou <i>et al.</i> , 2007
<b>Poissons fumés à froid</b>			
Saumon (AP - CO <sub>2</sub> )	<i>Cb. piscicola</i> / Nisine	Réduction de <i>L. monocytogenes</i>	Nilsson <i>et al.</i> , 1999, 1997
Saumon	Sakacine P	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Aasen <i>et al.</i> , 2003
	<i>C. maltaromaticum</i> CS526	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Yamazaki <i>et al.</i> , 2003
	<i>C. divergens</i> V41, <i>C. divergens</i> V1, <i>C. divergens</i> SF668	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Brillet <i>et al.</i> , 2005
	<i>L. sakei</i>	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Weiss and Hammes, 2006
	<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>C. maltaromaticum</i>	Inhibition de <i>L. innocua</i>	Vescovo <i>et al.</i> , 2006
	<i>L. casei</i> T3 et <i>L. plantarum</i> PE2		
Saumon SV	<i>Ent. faecium</i> ET05	Inhibition de <i>L. innocua</i>	Tomé <i>et al.</i> , 2008
	<i>C. divergens</i> M35	Inhibition de <i>L. innocua</i>	Tomé <i>et al.</i> , 2008
		Inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Tahiri <i>et al.</i> , 2009
	<i>Carnobacterium</i> spp.	Amélioration des caractéristiques sensorielles	Leroi <i>et al.</i> , 1996
	<i>C. piscicola</i> V1, <i>C. divergens</i> V41 et <i>divercine</i> V41	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Duffes, 1999; Duffes <i>et al.</i> , 1999; Nilsson <i>et al.</i> , 2004
Truite Arc-en-ciel SV	<i>L. sakei</i> productrice de sakacine-P	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Nykänen <i>et al.</i> , 2000
Truite Arc-en-ciel SV	Nisine	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Katla <i>et al.</i> , 2001
<b>Crevettes</b>			
Crevettes en saumure	Nisine Z, carnocine UI49, bavaricine A	Amélioration de la durée de conservation	Einarsson and Lauzon, 1995
Crevettes réfrigérées	Nisine	Inhibition de <i>Pseudomonas</i> spp. et de bactéries productrices d'H <sub>2</sub> S	Shirazinejad <i>et al.</i> , 2010
Crevettes cuites	<i>Lc. piscium</i> CNCM I-4031	Inhibition de <i>B. thermosphacta</i> et amélioration des indices sensoriels	Fall <i>et al.</i> , 2010
	<i>C. maltaromaticum</i>	Pas d'effet	Laursen <i>et al.</i> , 2006
Crevettes cuites SV	<i>Lc. piscium</i> EU2241 et <i>Leuc. gelidum</i> EU2247	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> et <i>S. aureus</i>	Matamoros <i>et al.</i> , 2009a

#### 8.6.4. L'application de starters dans les sauces fermentées pour maîtriser la formation d'histamine

La fermentation des sauces de poisson est employée depuis des années pour confectionner un produit stable dans le temps et servant principalement de condiment aux populations asiatiques. Ce produit s'est démocratisé au fil des années en Europe et les normes Européenne applicables sur les concentrations en histamine sont désormais employées pour ce type de produit.

Ces sauces sont fabriquées à partir d'anchois, de sardines et quelque fois de thon. Lors du processus de fermentation réalisé à des températures supérieures à 20°C, la protéolyse permet la libération d'acides aminés, par exemple l'histidine précurseur de l'histamine, c'est alors que les bactéries histaminogènes à Gram positif ou négatif se développent et produisent de très fortes concentrations d'amines biogènes. Pour prévenir cette formation, l'ajout de cultures starter accélérant le processus de fermentation ou permettant de réduire la concentration d'amines biogènes a été employé.

Ces starters de culture, appartenant majoritairement aux bactéries lactiques, sont choisis selon 3 conditions :

- ✓ Non producteurs d'amines biogènes
- ✓ Dégradation des amines biogènes présent dans le produit grâce à des amines oxydases
- ✓ Ralentissement ou inhibition de la croissance de bactéries histaminogènes



Figure 19: Sauce Nuoc-mam fabriquée à partir d'anchois pressés et fermentés (cap-vietnam.com)

*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* et *Virgibacillus* spp. ont été les principales bactéries utilisées dans ce but (Hu *et al.*, 2007).

*S. carnosus* FS19, non producteur d'amines biogènes (Petäjä *et al.*, 2000), de la famille des *Micrococcaceae*, a été employé dans des sauces de poisson en Malaisie par Zaman (2014, 2011), permettant de réduire la concentration en histamine de 27 à 15 %. *S. xylosus* un autre membre de cette famille, utilisé lors de la fermentation de sauce à base d'anchois (Myeolchi-jeot), a réduit de 16% la concentration en histamine (Mah and Hwang, 2009b).

L'absence de croissance des *Pseudomonas*, *Micrococcaceae* et des *Enterobacteriaceae* dans de la sauce de carpe argentée a été corrélé à la croissance rapide de *P. pentosaceus* résultant en un déclin rapide du pH (Xu *et al.*, 2010). De même, l'ajout de *Virgibacillus* sp. (SK33) lors de la fermentation de sauce de poisson Thai a réduit de 50 % la concentration en amines biogènes à la fin du procédé tout

en permettant d'obtenir un degré d'hydrolyse équivalent à 12 mois de fermentation en seulement 4 mois (Yongsawatdigul *et al.*, 2007).

#### 8.6.5. Première expérience de biopréservation pour empêcher la formation d'histamine

L'utilisation de la biopréservation pour prévenir la formation d'histamine dans les produits de la mer a été initiée par la société Biocéane (Nantes, France). Un ferment lactique LLO (*Lactococcus lactis*) isolé du merlan a été testé sur des longes de thon albacore importées d'Equateur. Ces longes de thon ont été parées etensemencées avec le ferment lactique LLO, elles ont ensuite été conditionnées sous vide avant d'être expédiées à l'état réfrigéré en France. Après 10 jours de conservation à 5°C, les longes de thons traitées avec le ferment contenaient 100 fois moins d'histamine que les longes non traitées. Ainsi, après 10 jours de stockage, 90% des longes biopréservées respectaient encore la norme avec une teneur en histamine inférieure à 100 mg/kg. Le mécanisme d'action de cette bactérie est encore méconnu.

Ces essais renforcent l'intérêt de la biopréservation dans la lutte contre l'intoxication histaminique. Les industriels Français de la conserverie ont donc souhaité approfondir cette voie et ont financé, avec l'aide de FranceAgrimer, un projet sur l'inhibition de la formation de l'histamine dans le thon par la biopréservation (HISTABIO). Ce projet qui s'est terminé au début de l'année 2013 a porté sur la cartographie et la caractérisation de la contamination histaminique dans des longes de thon pour identifier les zones les plus exposées à la formation d'histamine. La deuxième partie s'est focalisée sur la sélection de souches de bactéries bioprotectrices et la validation de l'efficacité de ces souches sur une matrice à base de thon. Enfin, la dernière partie a porté sur la validation à l'échelle pilote dans des conditions industrielles.

## 9. Objectifs de la thèse

Maîtriser la formation d'histamine par un procédé de biopréservation a été l'objectif principal de cette thèse. Si le laboratoire EM<sup>3</sup>B et l'UMR1014 Secalim ont une bonne expérience en matière de biopréservation des produits de la mer, aucun travail sur l'histamine, les bactéries histaminogènes et le thon n'avait jusque là été effectué.

Le premier objectif concernant le procédé de biopréservation a été divisé en 3 phases :

- Mettre en place une collection de bactéries lactiques et de bactéries histaminogènes à partir de produits de la mer riches en histidine.
- Cribler des bactéries lactiques pour leur capacité à empêcher le développement de bactéries histaminogènes en milieu modèle.

- Appliquer les bactéries lactiques bioprotectrices sélectionnées sur différents produits à base de thon.

Ces travaux se sont déroulés dans le cadre du projet HISTABIO cité précédemment.

La prévention des intoxications histaminiques reste un enjeu majeur pour les industriels et les autorités. Actuellement, l'origine de la contamination, les espèces bactériennes et les étapes critiques d'une chaîne de production ne sont que très peu étudiées, le manque d'outils est sans doute en partie responsable. Pour répondre à ce manque, le deuxième objectif de cette thèse a donc consisté à développer un outil rapide et fiable de quantification de 2 espèces fortement productrices d'histamine. Une méthode de PCR quantitative en temps réel a été mise au point et améliorée pour détecter de faibles concentrations bactériennes de *M. morgani* et *M. psychrotolerans*.

Enfin, peu d'études ont porté sur la compréhension des mécanismes de formation de l'histamine au niveau moléculaire. Pour répondre à cette problématique, l'étude de ces mécanismes chez *M. psychrotolerans* a été initiée dans la dernière partie du travail.

## **RESULTATS**



## **CHAPITRE I**

Sélection de souches bioprotectrices pour limiter le développement de bactéries histaminogènes dans des produits à base de thon





## INTRODUCTION

L'intoxication histaminique est la première cause de toxi-infection alimentaire liée à la consommation de poissons. Or, la France est un important pays consommateur de poisson avec 24,5 kg/hab/an (FranceAgriMer, 2011) et cette intoxication représente plus de 50 % des épidémies recensées (EFSA, 2012).

L'histamine est produite à partir de l'histidine libre présente dans la chair des poissons de la famille des *Scombridae* (thon, sardine, maquereau). Suite à la pêche et lors de la conservation de cette denrée, des bactéries histaminogènes peuvent se développer, entraînant au delà d'un certain seuil de croissance une production très importante d'histamine. Ces bactéries, pour la plupart des entérobactéries, ont la faculté de se développer à des températures allant de 0°C à 37°C. En effet, les premières études ont uniquement rapporté l'implication de bactéries mésophiles telles que *M. morganii*, *H. alvei*, *P. damsela* ou *R. planticola* capables de former de l'histamine grâce à une histidine décarboxylase. Suite à de nouvelles études parues à partir de 2004, deux nouvelles espèces fortement productrices d'histamine, *P. phosphoreum* et *M. psychrotolerans*, capables de s'adapter à des températures inférieures à 4°C, ont été mises en évidence dans des cas d'intoxications (Emborg, 2006; Kanki *et al.*, 2004).

Pendant de nombreuses années, la formation d'histamine a été prévenue par le respect strict de la chaîne du froid dès la capture du produit jusqu'à sa transformation et l'achat par le consommateur. Cependant, le nombre d'intoxications ne diminue pas dans le temps. La présence de ces bactéries adaptées au froid en est probablement la cause et de nouvelles méthodes pour inhiber leur croissance doivent être mise en œuvre pour réduire l'impact sur le consommateur.

La plupart des méthodes mises en place, cherchant à maîtriser la formation d'histamine, se sont focalisées sur les bactéries mésophiles. L'application stricte de la chaîne du froid est en général suffisante pour empêcher la croissance de ces bactéries mais elle ne permet pas de maîtriser la croissance ni la production d'histamine par les bactéries histaminogènes psychrotrophes. L'ionisation est un procédé qui a démontré une inhibition de la production d'histamine entre 4°C et 30°C mais qui induit à forte dose une oxydation des lipides. D'autre part, cette méthode n'est applicable qu'à certaines catégories de produits (cf. étude bibliographique, § 8-1). L'application d'additifs, de conservateurs ou encore de bactéries dégradant l'histamine n'est pas envisageable d'un point de vue sensoriel ou réglementaire pour les produits frais.

Le procédé le plus prometteur à l'heure actuelle repose sur le conditionnement des produits sous atmosphère protectrice sous un mélange de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, qui s'avère bien plus efficace qu'un emballage sous air ou sous-vide (Emborg *et al.*, 2005). Cependant, l'utilisation d'un conditionnement sous MAP n'est pas forcément applicable lors de tout procédé industriel.

La société nantaise Biocéane commercialise un ferment de biopréservation (le ferment LLO) dont l'efficacité a été démontrée sur des longes de thon frais albacore conditionnées sous vide (Cf. Etude bibliographique 8.6.5). Ceci nous conduit donc à penser que d'autres bactéries pourraient présenter une capacité à réduire la formation d'histamine. Nos travaux se sont donc focalisés sur la méthode innovante de biopréservation. ~~La société de production de ferments Biocéane a mis en avant au début de cette étude, la fonctionnalité d'une méthode de biopréservation contre les bactéries histaminogènes dans du thon frais.~~ Cette méthode qui consiste à appliquer des souches bactériennes de manière à inhiber la croissance de bactéries pathogènes ou altérantes a déjà démontré son efficacité tout en préservant la qualité sensorielle du produit, sur du saumon par exemple (cf. étude bibliographique, § 8-6). De plus, cette méthode qui utilise essentiellement des bactéries lactiques est accueillie positivement par le consommateur.

La première partie de ce travail de thèse s'est donc focalisée sur le développement d'une méthode de biopréservation pour maîtriser la formation d'histamine dans du thon. Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet national HISTABIO, impliquant plusieurs conserveries bretonnes de thon souhaitant améliorer la qualité sanitaire de leur produit afin de réduire le risque et l'impact des bactéries histaminogènes sur leur production. Ce projet a pour but final de réduire les pertes économiques et de denrées alimentaires, tout en améliorant la protection du consommateur.

En premier lieu, une collection de bactéries histaminogènes et de bactéries lactiques issues de poissons riches en histidine a été mise en place. Une sélection de bactéries bioprotectrices a ensuite été initiée selon la méthode de Matamoros *et al.* (2008) face à 4 bactéries histaminogènes. Les bactéries lactiques sélectionnées ont été testées sur diverses matrices de thon (appertisé, cuit, fumé) artificiellement et naturellement contaminés, dans différentes conditions de températures.

Ces travaux ont permis le dépôt du brevet " Utilisation de *Lactobacillus sakei* pour la biopréservation des produits de la mer" présenté en annexe.

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Souches utilisées, conditions de culture et de conservation

### 1.1. Souches bactériennes issues de collections

- ✓ Bactéries histaminogènes : 8 souches de bactéries d'espèces connues pour produire de l'histamine ont été commandées au Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRBIP, Paris, France) (Tableau 15). Leur production d'histamine a été testée en milieu de Majjala modifié comme décrit en 2-2.
- ✓ Bactéries lactiques : 38 souches de bactéries lactiques ont été sélectionnées dans la souchothèque d'Ifremer/Oniris. Leur potentiel bioprotecteur a auparavant été testé dans d'autres études contre diverses bactéries altérantes et pathogènes (Brillet *et al.*, 2005b; Fall *et al.*, 2010; Matamoros *et al.*, 2009b). Ces bactéries ont été listées dans le tableau 16.

Les autres souches utilisées dans ce travail ont été isolées à partir de produits de la mer (voir § 2 et 3).

Tableau 15 : Souches de bactéries potentiellement histaminogènes obtenues auprès de la CRBIP

Désignation	Origine	Collection	Code	Milieu de culture
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	Diarhée	CIP	A231 <sup>T</sup>	BHI (2% NaCl) à 20°C
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Expectorations	CIP	60.86	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	NC	CIP	76.1	
<i>Raoultella planticola</i>	Radis	CIP	100751	
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	NC	CIP	103364	
<i>Morganella psychrotolerans</i>	Thon fumé	CIP	109403 <sup>T</sup>	
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	NC	CIP	102511 <sup>T</sup>	
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	Poisson-demoiselle	CIP	102761 <sup>T</sup>	

NC : Origine non communiquée

Tableau 16 : Souches de bactéries lactiques issues de la souchothèque Ifremer

Espèces	Nombres de souches	Code	Milieu de culture	Température
<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	1	EU2257	MRS	20°C
<i>Carnobacterium divergens</i>	3	RF36, EU2253, EU2259	MRS	20°C
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	7	CD255, RF37, SF668, SF1944, SF2009, SF2022, SF2094	MRS	20°C
<i>Lactobacillus farciminis</i>	1	EU2204	MRS	20°C

<i>Lactobacillus fuchuensis/plantarum</i>	2	EU2255, EU2256	MRS	20°C
<i>Lactobacillus sakei</i>	1	EU2202	MRS	20°C
<i>Lactococcus piscium</i>	7	EU2229, EU2230, EU2233, EU2234, EU2235, EU2236, EU2239, EU2258	MRS	20°C
<i>Leuconostoc gelidum</i>	8	EU2213, EU2227, EU2247, EU2248, EU2251, EU2261, EU2262, EU2263	MRS	20°C
<i>Vagococcus inhae</i>	1	CD276	MRS	20°C
<i>Vagococcus fluvialis</i>	1	CD264	MRS	20°C
<i>Bactéries lactiques non identifiées issues de crevettes caramotes</i>	4	HOU2716, HOU2743, HOU2772, HOU2782	ELK	20°C
<i>Ferments commerciaux Biocéane</i>	2	LLO, BLN	MRS	20°C

### 1.2. Milieux de culture

Les bactéries histaminogènes ont été cultivées en bouillon Cœur-Cervelle (BHI, Biokar diagnostic, Beauvais, France). *P. phosphoreum* a été cultivé en bouillon BHI supplémenté avec 15 g/l de NaCl (BHI salé, concentration finale en NaCl à 20g/l soit 2 %). Les tubes ont été incubés entre 15°C et 37°C pendant 24 à 48 heures. Certaines bactéries ont été cultivées en bouillon marin (BM, Difco BD, Pont-de-Claix, France) à 15°C pendant 48 heures (Tableaux 15 et 22).

Les bactéries lactiques ont été cultivées en bouillon Elliker (ELK, Biokar) ou de Man Rogosa et Sharpe (MRS, Biokar) à 26°C pendant 24 à 48 heures.

### 1.3. Conservation des souches

Les souches sont conservées au laboratoire EM<sup>3</sup>B dans un congélateur à -80°C (souchier de travail) et en azote liquide à -196°C (souchier mère). Elles sont congelées dans un mélange composé à 50% de préculture (24 h minimum) et 50 % de milieu stérile supplémenté à 20% avec du glycérol (Panreac, Quimicia SA, Barcelone, Espagne). Dans le souchier de travail, les souches sont conservées sous forme d'aliquot de 200 µl.

## 2- Isolement de bactéries histaminogènes

### 2.1. Produits analysés

Afin d'isoler des bactéries fortement productrices d'histamine, des analyses microbiologiques ont été réalisées sur les 12 produits de la mer listés dans le tableau 17.

Cette première série d'expérimentations a été effectuée sur des produits frais (longe de thon Germon, maquereau et sardine non éviscérés) qui ont été achetés au rayon poissonnerie d'une grande-surface (Leclerc, Orvault, France). Ces produits ont été conditionnés dans des sacs stomachers clipés et ont été incubés à 20 ou 4°C pendant 5 et 16 jours respectivement. Une recherche similaire a été réalisée sur de la longe de thon albacore fumée conditionnée sous-vide (Saumextra, Angers, France). Ce produit a été conservé dans son emballage d'origine à 4°C jusqu'à sa DLC (12 jours). Après DLC, des sachets ont été stockés à 15°C et 8°C pendant 2 semaines. Enfin, des produits responsables de TIAC (anchois, thon, saumon) conservés par l'ANSES de Boulogne-sur-Mer ont été analysés après décongélation une nuit à 4°C.

**Tableau 17 : Produits marins riches en histidine, ou responsables d'intoxication histaminique utilisés pour l'isolement de bactéries histaminogènes**

Produits	Espèce	Conditionnement	Incubation	Concentration en histamine (mg/kg)
<b>Longe de thon Germon</b>	<i>Thunnus alalunga</i>	Sac stomacher	20°C // 5 jours 4°C // 16 jours	NM
<b>Maquereau entier</b>	<i>Scomber scombrus</i>	Sac stomacher	20°C // 5 jours 4°C // 16 jours	NM
<b>Sardine entière</b>	<i>Sardina pilchardus</i>	Sac stomacher	20°C // 5 jours 4°C // 16 jours	NM
<b>Longe de thon albacore fumé</b>	<i>Thunnus albacares</i>	Sous-vide	4°C // DLC puis 15°C // 2S 8°C // 2S	NM
<b>Anchois (réf. 999)</b>	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Sous-vide congelé		17,85
<b>Saumon (Réf. 6664)</b>	<i>Salmo salmar</i>	Sous-vide congelé		37
<b>Saumon (Réf. 6661)</b>	<i>Salmo salmar</i>	Sous-vide congelé	Intoxication histaminique <sup>a</sup>	46
<b>Saumon (Réf. 5762)</b>	<i>Salmo salmar</i>	Sous-vide congelé		87
<b>Thon (Réf. 7624)</b>	<i>Thunnus albacares</i>	Sous-vide congelé		144
<b>Thon (Réf. 6510)</b>	<i>Thunnus albacares</i>	Sous-vide congelé		16
<b>Thon (Réf ; 6161)</b>	<i>Thunnus albacares</i>	Sous-vide congelé		2059
<b>Thon (Réf. 6514)</b>	<i>Thunnus albacares</i>	Sous-vide congelé		29

<sup>a</sup> TIAC : Ces produits sont responsables de TIAC et n'ont pas été incubés pour permettre le développement de bactéries histaminogènes. NM : non mesuré

Vingt à trente grammes de chair de poissons ont été prélevés sous hotte à flux laminaire en conditions stériles et dilués au 1/5<sup>ème</sup> avec 80 à 120 ml de tampon de dilution tryptone-sel (TS) (1 g/l de tryptone, 8,5 g/l de NaCl, pH 7,2). Cette suspension mère est broyée en sac stomacher pendant 2 minutes à vitesse normale. Après broyage, l'échantillon est laissé au repos pendant 20 à 30 min avant d'être dilué 1/10<sup>ème</sup> pour les dénombrements.

- ✓ **La flore totale** a été dénombrée sur le milieu Long & Hammer (L&H) (protéose-peptone (20 g/l), gélatine (40 g/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 g/l), NaCl (10 g/l), ammonium Fer III citrate (0,5 g/l), agar (15 g/l)). Ce milieu est ensemencé en surface avec 100 µl de dilution puis incubé à 15°C pendant 72 heures.
- ✓ **Les entérobactéries** ont été dénombrées sur le milieu Violet Red Bile Glucose (VRBG, Biokar), à partir d'un ensemencement en profondeur de 1 ml de dilution. Une sur-couche a été coulée après solidification de la première couche de VRBG. Les boîtes ont été incubées à 20°C pendant 48 heures, seules les colonies avec un halo violet ont été comptées.

## 2.2. Sélection des bactéries histaminogènes par test en milieu de Maijala modifié

De 2 à 20 colonies ont été prélevées sur les boîtes dénombrables de VRBG et de L&H et isolées sur une gélose BHI salé (330 colonies prélevées au total). Ces boîtes ont été incubées à 15°C pendant 48 heures. Après incubation, une colonie isolée a été repiquée en bouillon BHI salé et incubée pendant 24 heures à 20°C. Pour sélectionner les isolats potentiellement producteurs d'histamine, 10 µl de chaque pré-culture ont été déposés en microplaques de 96 puits dans 200 µl de milieu Maijala modifié. En effet, la concentration en histamine dans le milieu de Maijala (Maijala *et al.*, 1996), testée avec le kit Veratox a révélé des concentrations en histamine de l'ordre de 25 mg/kg. Ce milieu a donc été modifié, pour réduire l'histamine à des teneurs inférieures à 5 mg/kg, en éliminant l'extrait de viande et en réduisant la proportion d'extrait de levure et de tryptone (Maijala modifié : CaCO<sub>3</sub> 0,4g/l ; MnSO<sub>4</sub> 0,2 g/l ; MgSO<sub>4</sub> 0.8 g/l ; Pourpre de bromocrésol 0,24 g/l ; tryptone 1,25 g/l ; extrait de levure 1 g/l ; histidine 2 g/l, tween 0,5 g/l). Après ensemencement, les microplaques ont été incubées à 20°C pendant 48 heures. L'évolution de la coloration du milieu a été suivie toutes les 12 heures. L'apparition d'une coloration violette, qui indique une augmentation de pH, peut être reliée à la production d'histamine en forte concentration dans le milieu. Ce test a également été appliqué pour les bactéries potentiellement histaminogènes issues de la collection CRBIP (Tableau 15).

## 2.3. Confirmation par détection du gène de l'histidine décarboxylase

La méthode PCR de Takahashi *et al.* (2003) a été appliquée pour détecter le gène de l'histidine décarboxylase (*hdc*) chez les souches supposées productrices d'histamine, d'après le test en milieu de Maijala modifié. Les souches cibles ont été cultivées en milieu BHI salé à 20°C pendant 24 heures, 1 ml de culture a été transféré en microtube de 1,5 ml stérile puis centrifugé à 8 000 x g durant 1 minute. Le culot obtenu après centrifugation a été remis en suspension dans 180 µl de solution de lyse composée de : 20 mM TrisCl, pH8 ; 2 mM sodium EDTA ; 1,2% Triton X100 ; 20 mg/ml lysozyme (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) dans de l'eau de qualité biologie moléculaire (Ozyme,

Montigny-le-Bretonneux, France). Cette lyse enzymatique a été réalisée à 37°C pendant 1h30. L'extraction et la purification de l'ADN ont été effectuées d'après le protocole fourni dans le kit DNeasy (Qiagen, Courtaboeuf, France).

La méthode PCR de Takahashi permet l'amplification d'un fragment de 709 pb du gène *hdc*. Ce fragment a été amplifié avec la paire d'amorces sens *hdc-f* (5'-TCH ATY ARY AAC TGY GGT GAC TGG RG-3') et anti-sens *hdc-r* (5'-CCC ACA KCA TBA RWG GDG TRT GRC C-3') correspondant aux positions 132 à 158 et 817 à 841 de ce gène chez les bactéries à Gram négatif. Les amorces ont été synthétisées auprès de la société Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Lesquin, France). L'amplification du gène de l'histidine décarboxylase a été réalisée à l'aide du Taq'Ozyme Purple Mix (Ozyme) dans un volume réactionnel de 25 µl : 12,5 µl de réactif Taq'Ozyme Purple Mix (1X), 0,25µM de chaque amorce *hdc-f* et *hdc-r*, 10 µl d'eau stérile qualité biologie moléculaire (Ozyme) et 2µl d'ADN extrait précédemment. L'amplification a été optimisée dans un thermocycleur MyCycler (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) sur 35 cycles (95°C - 30 sec, 56°C - 30 sec, 72°C - 1 min) auxquels s'ajoutent une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 2 minutes et une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min.

Les produits d'amplification ont été séparés sur un gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TAE 1X. L'ADN a été marqué au GelRed™ (Biotium, Hayward, Etats-Unis) à une concentration finale de 500X. Cinq µl des produits d'amplification ont été directement déposés dans les puits. Le marqueur ExactGene 100 pb DNA Ladder (Fischer scientifique, Illkirsh, France) a été utilisé pour identifier la taille des amplicons entre 1000 pb et 100 pb. Les produits PCR ont migré à 70 V pendant 45 minutes. Le gel a été analysé et photographié sur un analyseur d'image Gel Doc XR+ (Biorad).

### **3- Isolement de bactéries lactiques protectrices à partir de produits riches en histidine**

#### **3.1. Produits analysés pour l'isolement des bactéries lactiques**

Afin de sélectionner des bactéries bioprotectrices présentes dans le même écosystème que les bactéries histaminogènes, des bactéries lactiques ont été isolées à partir de 8 produits marins riches en histidine, achetés en grande-surface (Tableau 18).

Les produits frais, maquereau, sardine et thon, ont été conditionnés sous-vide et sous atmosphère modifiée (50 % CO<sub>2</sub> et 50% N<sub>2</sub>) directement après achat. Les produits fumés ont été conservés dans leur emballage sous-vide d'origine. Ces différents produits ont été stockés à 8°C pendant 1 semaine pour les poissons frais et 2 semaines pour les poissons fumés. Au terme de la durée de stockage, les

bactéries lactiques ont été dénombrées en surface (100 µl) sur une gélose ELK incubée à 20°C pendant 24 à 48h en anaérobiose.

A partir de chaque boîte dénombrable d'ELK, 8 colonies ont été repiquées en bouillon MRS, mis à incuber à 8°C pendant 48 à 72 heures. Les 140 isolats obtenus ont été ensuite purifiés par la méthode des stries sur gélose MRS, repiqués en bouillon MRS puis conservés dans la souchothèque selon les conditions décrites auparavant.

**Tableau 18 : Produits riches en histidine dans différentes conditions de stockage utilisés pour l'isolement de bactéries lactiques.**

Produits	Espèce	Conditionnement	Incubation
<b>Maquereau frais entier</b>	<i>Scomber scombrus</i>	SV AM	8°C / 1S
<b>Filets de maquereau frais</b>	<i>Scomber scombrus</i>	SV AM	8°C / 1S
<b>Filets de sardine fraîche</b>	<i>Sardina pilchardus</i>	SV AM	8°C / 1S
<b>Longe de thon</b>	<i>Thunnus albacares</i>	SV AM	8°C / 1S
<b>Thon fumé</b>	<i>Thunnus albacares</i>	SV	8°C / 2S
<b>Filets de harengs fumés</b>	<i>Clupea harengus</i>	SV	8°C / 2S
<b>Maquereau fumé</b>	<i>Scomber scombrus</i>	SV	8°C / 2S

S : Semaine

SV : Conditionnement sous-vide

AM : Conditionnement sous atmosphère modifiée composée de 50% CO<sub>2</sub>/ 50% N<sub>2</sub>

### 3.2. Sélection de bactéries bio-protectrices par la méthode en double-couche

Un milieu modèle à base de jus de thon a été développé pour la sélection des bactéries lactiques bioprotectrices. Ce milieu « jus de thon » (JT) est préparé à partir de longe de thon albacore fraîche (Cobreco, Douarnenez, France). Les longes ont été découpées en cubes de 2-3 cm<sup>3</sup> et broyées au mixeur avec un volume d'eau distillée deux fois supérieur au poids de longe. Ce mélange a été broyé pendant 150 secondes et une purée de thon a été obtenue. Cette purée a été portée à ébullition dans un bécher sur plaque chauffante pendant 5 minutes pour précipiter les protéines. Cette solution a ensuite été filtrée sur filtre Durieux plissé d'un diamètre de 185 mm (Whatman, Maidstone, Royaume-Uni) pour obtenir un jus de thon incolore qui a été récolté en erlenmeyer. Le pH, mesuré après refroidissement, se situe en moyenne à 5,98. Pour 2 kg de chair fraîche, 2 l de jus de thon sont obtenus. Ce milieu peut-être supplémenté avec de l'agar et stérilisé à 100°C pendant 30 minutes avant utilisation.



Au total, 178 bactéries lactiques obtenues de la collection de souches d'Ifremer et d'Oniris (38 souches) ou isolées de produits riches en histidine (140 souches) ont été sélectionnées pour cette étape (Tableau 16 et 23). Leur potentiel bioprotecteur a été testée face à 4 bactéries fortement productrices d'histamine : *M. morganii* (CIP A231<sup>T</sup>), *H. alvei* (MIP 2467), *P. phosphoreum* (CCUG 16288) et *M. psychrotolerans* (CIP 109403<sup>T</sup>) (Tableau 15 et 22) selon la méthode en double-couche décrite par Matamaros *et al.* (2009). A partir d'une pré-culture de chaque souche de bactérie lactique en bouillon MRS ou ELK incubée 24 h, des spots de 10 µl ont été déposés sur une première couche de gélose\_MRS ou de milieu JT à 1,5% d'agar (maximum 6 spots/boîte). Seules les 38 souches de la collection Ifremer/Oniris ont été testées en dupliquât sur la gélose MRS en complément des essais sur gélose JT. Après dépôt, les boîtes ont été incubées en anaérobiose à 15°C pendant 10 jours.

Après ces 10 jours, une gélose molle à 1% d'agar de BHI salé (sous-couche MRS) ou de JT (sous-couche JT), inoculée avec les bactéries histaminogènes a été coulée sur les colonies bactériennes. Pour obtenir des tapis bactériens homogènes, les pré-cultures de *M. morganii* (CIP A231<sup>T</sup>) et *Hafnia alvei* (MIP 2467) ont été dilués au 1/1000<sup>ème</sup> tandis que les pré-cultures de *M. psychrotolerans* (CIP 109403<sup>T</sup>) et *P. phosphoreum* (CCUG 16288) ont été dilués au 1/100<sup>ème</sup>. Après 36 h, 72 h et 96 h d'incubation à 15°C en aérobiose, les rayons des halos d'inhibition ont été mesurés à partir du bord du dépôt de la bactérie lactique.

## 4. Identification des bactéries isolées

### 4.1. Test phénotypique

Les bactéries histaminogènes et les bactéries lactiques isolées lors de cette étude ont été identifiées au niveau phénotypique selon leur morphologie, par la technique du Gram (Gregersen, 1978) et selon leurs activités catalase et oxydase.

### 4.2. Séquençage de l'ADNr 16S

Un millilitre de pré-culture d'une souche histaminogène ou d'une bactérie lactique inhibitrice a été centrifugé en microtube et le culot a été remis en suspension dans la solution de lyse enzymatique décrite précédemment. L'ADN chromosomique a été extrait et purifié suivant le protocole du kit DNeasy de Qiagen.

Le séquençage total de l'ADNr 16S de ces souches a été réalisé à l'aide de l'amorce fd1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') et de l'amorce rd1 (5'-TAA GGA GGT GAT CCA GCC-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Les amorces amplifiant la région interne SP1 (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC A-3') et SP4 (5'-CTC GTT GCG GGA CTT AAC-3') ont été aussi utilisées pour obtenir une superposition des séquences ou un séquençage partiel de l'ADNr 16S (amorces non publiées). La réaction de PCR est réalisée dans

un thermocycleur MyCycler (Biorad). Le mélange réactionnel d'un volume de 50 µl est composé de : Tampon Taq contenant déjà du MgCl<sub>2</sub> à une concentration de 1X, 0,2 mM de chaque dNTP, 1 µM d'amorces sens et anti-sens, 1,5 U de Taq polymérase (Invitrogen) et 1 µl d'ADN purifié, ajouté au mélange avant amplification. Un témoin négatif est incorporé pour chaque run d'amplification. Le cycle d'amplification débute par une étape de dénaturation à 95°C de 60 secondes, puis une hybridation de 60 sec à 56°C suivie d'une étape d'élongation de 90 secondes à 72°C. Le premier cycle est précédé d'une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C. Après 35 cycles d'amplification, une étape finale d'élongation de 7 minutes à 72°C a été réalisée. Les produits d'amplification ont été expédiés en microtubes auprès de la société Cogenics où ils ont été séquencés par la méthode de Sanger. A réception, les séquences ont été traitées, nettoyées et assemblées à l'aide du logiciel Geneious 5.6.5 (Biomatters, <http://www.geneious.com>). Une fois assemblées, les séquences sont comparées aux bases de données par le logiciel Blastn (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>, Alschul *et al.* 1997) et le logiciel Bibi (Université de Lyon, <http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>). L'alignement avec la meilleure e-value est considéré comme représentatif de la souche séquencée.

## 5. Méthode de quantification de l'histamine et des amines biogènes

### 5.1. Kit de quantification de l'histamine Veratox (Neogen)

Le principe du kit Veratox (Neogen) est basé sur la méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Avant l'analyse d'un échantillon, celui-ci est dilué afin de ne pas saturer les anticorps présents dans le puit de dépôt. Cinquante microlitres de suspension mère filtrée issue de l'analyse microbiologique (broyat dilué au 1/5<sup>ème</sup>) ou 10 µl de milieu Majala modifié après inoculation ont été dilués dans 10 ml de tampon de dilution fourni par le kit. L'échantillon, alors dilué au 1/1000<sup>ème</sup>, est analysé selon le protocole fourni par le kit avec une gamme d'étalonnage de 2,5 à 50 mg/kg.

La lecture des plaques a été effectuée à 620 nm à l'aide du spectrophotomètre de la marque Jbio. La droite d'étalonnage réalisée avec 5 échantillons de concentrations à 0, 2,5, 10, 20, 50 mg/kg doit avoir un r<sup>2</sup> supérieure à 0,98 pour que l'analyse soit validée. Les échantillons peuvent être dilués au 1/10<sup>ème</sup> ou 1/100<sup>ème</sup> (1 ml de dilution initiale dans 9 ml de tampon) pour augmenter ce seuil jusqu'à 500 ou 5000 mg/kg par exemple.

### 5.2. Quantification par HPLC

La méthode HPLC de référence de l'ANSES (Duflos *et al.*, 1999) permet la quantification de l'histamine mais aussi d'autres amines biogènes dont la putrescine, la cadavérine, la tyramine, la

**Commentaire [G1]:** Je cherche mais pas sûr qu'elle existe... hormis le numéro du règlement...

spermine et la spermidine. L'analyse des amines biogènes a été réalisée après l'analyse microbiologique, à partir de 5 ml de la solution mère broyée. Lorsque les échantillons ont été congelés, ils ont été décongelés à 100°C en bain-marie pendant 10 min, afin d'éliminer la flore bactérienne présente dans l'échantillon.

Ce volume a été dilué avec 10 ml d'acide perchlorique à 0,2 N et 100 µl de 1,3 diaminopropane à 0,8 mg/ml, homogénéisé au vortex pendant 30 secondes et centrifugé à 7 000 x g pendant 5 minutes. Après centrifugation, 100 µl de surnageant ont été prélevés auxquels ont été ajoutés 300 µl de carbonate de sodium saturé et 400 µl de chlorure de dansyl à 7,5 mg/ml dans un tube fermé hermétiquement. Après incubation au bain-marie pendant 5 minutes à 60 °C dans l'obscurité, les tubes ont été refroidis sous un courant d'eau froide et 100 µl de proline à 100 mg/ml ont été ajoutés à chaque échantillon. Les tubes ont ensuite été vortexés 30 secondes et placés à l'obscurité pendant 15 minutes. Après ce délai, 500 µl de toluène ont été ajoutés, le mélange a été vortexé et mis à congeler à -20°C. La congélation permet la séparation de la phase organique non congelée qui est récupérée dans un nouveau tube et évaporée sous flux d'azote. Suite à l'évaporation, 200 µl d'acétonitrile ont été déposés dans le tube pour solubiliser les amines biogènes avant passage dans l'appareil HPLC en phase inverse sur colonne kromasil C<sub>18</sub>, 5 µm, 100 A (25 cm x 4.6 mm) (Sigma). Le gradient d'élution mis à disposition par l'ANSES a été redéfini pour notre appareil, il est basé sur l'utilisation d'un gradient acétonitrile-eau de 5 à 95% d'acétonitrile en 30 min.

La gamme d'étalonnage a été réalisée à des concentrations en amines biogènes de 25, 50, 100 et 250 mg/kg. Un témoin négatif uniquement composé d'acétonitrile est passé avant analyse pour vérifier le nettoyage de la colonne. Suite au passage de la gamme d'étalonnage et des échantillons, l'identification des pics a été effectuée à l'aide d'un chromatogramme de référence fourni par l'ANSES. Le temps de rétention moyen de l'histamine est de 14,8 min. Une vérification du temps de rétention est effectuée à l'aide de la gamme d'étalonnage. La quantité en amines biogènes est exprimée en mg/kg à l'aide d'une droite d'étalonnage calculée utilisant le facteur de réponse de l'amine biogène par rapport au standard interne (1,3 diaminopropane) à partir des solutions étalons à 25, 50, 100, 250 mg/kg.

Validation : vérification du coefficient « a » et du « r<sup>2</sup> » (>0.96) ; les deux répétitions ne doivent pas dépasser : 5 mg/kg pour les valeurs inférieures à 250 mg/kg, 10 mg/kg pour les valeurs supérieures à 250 mg/kg.

$$A_{ab} / A_{SI} = Q_{ab} \times a$$

Equation pour le calcul d'une amine biogène par méthode HPLC. Q: quantité de l'amine biogène (mg/kg), Aab : Aire du pic de l'amine biogène, ASI: Aire du standard interne (1,3 diaminopropane), a : Coefficient de la droite de régression linéaire de l'amine

## 6. Sélection de bactéries lactiques inhibitrices de bactéries histaminogènes par challenge-test en matrice thon

Les challenge-tests ont été réalisés selon une succession d'étapes décrites dans la figure 20.

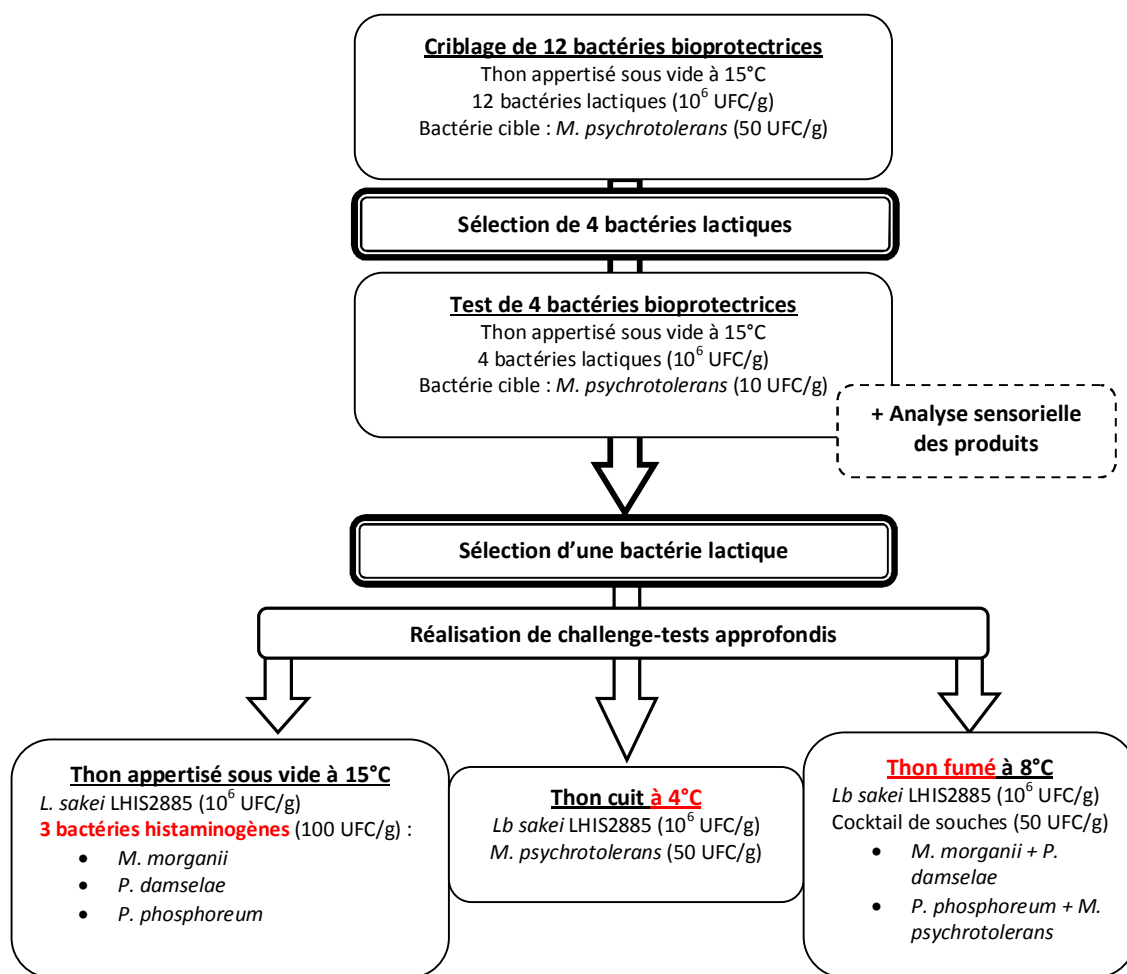


Figure 20 : Organisation des challenge-tests réalisés au cours de cette thèse

### 6.1. Matrices

Trois matrices différentes à base de thon Albacore ont été employées lors de ces challenge-tests. :

- ✓ **Thon appertisé** : cette matrice stérile correspond à du thon en boîte de la société Petit Navire achetée en grande-surface (Leclerc) disponible au format de 140 g ou 280 g poids net. Ce produit a une DLC allant au-delà de l'année 2014.
- ✓ **Thon cuit** : Des longes de thon frais ont été obtenues auprès de l'industriel Cobreco, spécialisé dans la production de thon en boîte et partenaire du projet Histabio (Douarnenez,

France). Ces longes congelées et conditionnées sous-vide ont été décongelées à 4°C durant une nuit. Les longes ont été découpées sous hotte à flux laminaire en cubes de 2 cm<sup>3</sup>, répartis dans des sacs par portions de 200 g, puis conditionnés sous-vide. Pour l'étape de cuisson, les sachets ont été placés dans une bassine d'eau bouillante. Un temps de cuisson de 5 minutes a été appliqué lorsque la température à cœur a atteint 70°C (81,2°C à cœur à la fin du temps de cuisson). Les cubes de thon ont ensuite été refroidis dans une cellule de refroidissement rapide à 0°C pendant 20 min. Les produits ont été conservés à 4°C pour une utilisation dans les 24 heures ou stockés à -20°C.

- ✓ **Thon fumé** : Les longes de thon fumé sont conditionnées sous-vide en sachet de 8 à 10 tranches fines (Saumextra). Ce produit est réceptionné à l'état congelé et n'est décongelé à 4°C pendant une nuit qu'au moment de l'utilisation.

## **6.2. Méthodes d'inoculation**

Les pré-cultures de bactéries lactiques et de bactéries histaminogènes ont été diluées en milieu tryptone-sel à 10<sup>8</sup> UFC/ml et 10<sup>3</sup> UFC/ml respectivement, de façon à obtenir un niveau d'inoculation de 10 à 100 UFC/g pour les bactéries histaminogènes et 10<sup>6</sup> à 5.10<sup>6</sup> UFC/g pour les bactéries lactiques.

L'inoculation des bactéries a été effectuée soit avec une pipette stérile (thon cuit) soit à l'aide d'un aérogaphe (thon fumé) en déposant un volume correspondant à 5 % du poids de matrice.

## **6.3. Criblage de 12 bactéries lactiques protectrices par challenge-test sur thon cuit**

Dans un premier temps, 12 bactéries lactiques (Tableau 26) ont été testées dans cette expérimentation face à la bactérie histaminogène *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup>. Des portions de 40 g de thon cuit ont étéensemencées avec 50 CFU/g de *M. psychrotolerans* pure ou en co-culture avec 10<sup>6</sup> UFC/g de chaque bactérie lactique par la méthode d'inoculation à la pipette (5% V/P). Les échantillons conditionnés sous vide et stockés à 15°C ont été analysés au moment de l'inoculation, puis à 24, 48 et 72 heures. L'analyse microbiologique et biochimique des produits a été effectuée sur 30 g de chair. Les bactéries lactiques ont été dénombrées sur milieu ELK ou MRS, tandis que l'entérobactérie, *M. psychrotolerans*, a été spécifiquement dénombrée sur milieu VRBG. Le pH des produits a été mesuré au début et à la fin des expérimentations. La production d'histamine a été déterminée à l'aide du kit Veratox dans une gamme de 25 à 500 mg/kg. (cf. §5-1).

#### 6.4. Test de 4 bactéries lactiques par challenge-tests sur thon cuit

Dans le but d'approfondir les résultats obtenus précédemment, 4 bactéries lactiques sélectionnées à l'issue du test précédent ont été testées face à la bactérie histaminogène *M. psychrotolerans* (CIP 109403<sup>T</sup>) : le ferment BLN (Biocéane), *L. sakei* (LHIS2885), *L. piscium* (EU2258) ; *V. fluvialis* (CD264). *M. psychrotolerans* a été inoculé à 10 UFC/g pure ou en co-culture avec 5.10<sup>6</sup> UFC/g de chaque bactérie lactique sur des portions de 40 g de thon appertisé. Après inoculation, les sachets de thon conditionnés sous-vide ont été congelés à -20°C pendant 48 h. Suite à cette étape, les sachets ont été décongelés à 8°C pendant une nuit puis ils ont été incubés à 15°C pendant 8 jours.

Les produits ont été analysés avant congélation, après congélation puis à 4 jours et 8 jours de stockage. Un lot témoin non inoculé a été suivi de la même façon. L'analyse microbiologique et biochimique des échantillons a été réalisée sur 30 g de chair. La flore lactique artificiellement inoculée dans les produits a été énumérée sur milieu MRS pour *L. sakei* et *V. fluvialis* ou sur milieu ELK pour *L. piscium* et le ferment BLN, après 48 heures d'incubation en anaérobiose à 20°C. La bactérie histaminogène a été dénombrée sur milieu VRBG en profondeur après 48 h à 20°C. L'analyse microbiologique du témoin a été effectuée uniquement sur milieu L&H pour dénombrer la flore totale à 15°C. L'histamine a été mesurée sur la suspension mère à l'aide du kit Veratox puis par la méthode HPLC (Cf §5-2).

#### 6.5. Evaluation sensorielle

Un challenge-test spécifique pour cette évaluation a été réalisé dans des conditions similaires au précédent : il comporte un témoin absolu à base de thon appertisé, un lot témoin à base de thon cuit, un lot avec *M. psychrotolerans* seul (10 CFU/g), 4 lots avec *M. psychrotolerans* en co-culture avec chaque bactérie lactique (5.10<sup>6</sup> UFC/g) et 4 lots avec chaque bactérie lactique seule. Les paramètres de conservation, d'analyses microbiologiques et biochimiques sont identiques au challenge-test précédent.

L'analyse sensorielle a été effectuée à chaque point d'analyse en duplicat (avant et après congélation, puis à 4 et 8 jours) à partir de sachets qui ont été congelés jusqu'à la séance d'analyse sensorielle. Ces tests ont été réalisés par un groupe de 9 personnes appartenant au jury interne d'analyse sensorielle de l'Ifremer de Nantes, bien entraîné sur les odeurs d'altération des produits de la mer.

Les séances d'évaluation sensorielle se déroulent dans une pièce climatisée, composée de 10 cabines individuelles de dégustation, éclairées par une lumière blanche standard (T = 6500°K) répondant aux

spécifications de la norme AFNOR V-09-105 concernant les recommandations relatives à l'implantation des locaux destinés à l'analyse sensorielle. Un système informatique permet l'acquisition automatique des données (logiciel Fizz, Biosystèmes, Dijon) et leur traitement statistique.

Le contenu de 2 sachets de chaque échantillon est réparti dans 5 pots inodores en polystyrène munis d'un couvercle, soit environ 15 g de miettes par pot. Les pots sont entreposés dans une étuve à 18°C pendant le déroulement de la séance. Le témoin de référence, décongelé le matin du test, est proposé en même temps. Les échantillons sont présentés aux juges selon un plan équilibré pour éviter un biais dû à l'effet du premier produit testé. Pour chaque échantillon, le niveau d'altération était évalué sur une échelle non structurée de 0 à 10, une note voisine de 6 étant représentative d'une altération relativement forte. En complément de ce test, le jury devait caractériser à l'aide d'une liste de descripteurs prédéfinis, au moins une odeur dominante sur les échantillons parmi les descripteurs suivants : sardine, maquereau, thon, pâté, poisson gras, marine/iodée, laiteuse, pomme de terre, végétale, serpillière, saumure, fruitée, métallique, beurre/caramel, pyrrolidine/sperme, rance/huile de lin, aminée/urine, acide/piquante, aigre/fermentée, pied/fromage, chou/gaz, H<sub>2</sub>S/œuf.

#### **6.6. Effet inhibiteur de *L. sakei* LHS 2885 sur différentes bactéries histaminogènes**

Ces expérimentations ont été réalisées en triplicat avec des souches fortement productrices d'histamine, *M. morganii* (CIP A231<sup>T</sup>), *P. phosphoreum* (CCUG 16288) et *P. damsela*e (CIP 102761<sup>T</sup>) inoculées à 100 UFC/g avec ou sans *L. sakei* LHS 2885 (10<sup>6</sup> UFC/g) sur du thon appertisé conditionné sous-vide après inoculation.

Les sachets avec *M. morganii* ont été préalablement congelés à -20°C puis décongelés à 4°C et stockés à 15°C pendant 7 jours. Ils ont été analysés avant et après congélation puis aux 2<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours de stockage. Les sachets contaminés par *P. phosphoreum* et *P. damsela*e ont été stockés directement à 15°C pendant 8 jours et analysés le jour même, puis aux 2<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jours de stockage.

Les analyses microbiologiques et biochimiques sont similaires au challenge-test précédent. *P. phosphoreum* et *P. damsela*e ont été énumérés sur milieu BHI salée à 8°C après 5 jours ou à 20°C après 48 heures respectivement.

#### **6.7. Effet bioprotecteur de *Lb. sakei* LHis 2885 vis à vis de *M. psychrotolerans* à 4°C sur du thon cuit albacore**

Les challenge-tests précédents ont été réalisés à 15°C afin de simuler une rupture de la chaîne du froid et pour stimuler la croissance de *M. psychrotolerans* ainsi que la production d'histamine. Ce challenge-test a pour but d'évaluer les propriétés bioprotectrices la bactérie lactique d'intérêt lors du stockage du produit à 4°C. Des portions de 25 g de thon cuit ont été inoculées (5% V/P) avec *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> (50 UFC/g) seule ou en co-culture avec *L. sakei* LHis2885 (10<sup>6</sup> UFC/g). Un témoin non inoculé, et un témoin avec la bactérie lactique seule ont également été préparés. Les sachets ont été conditionnés sous-vide, congelés à -20°C pendant 48 heures, puis décongelés à 4°C pendant une nuit avant d'être placés à 4°C pendant 14 jours. Vingt grammes des différents lots ont été analysés avant et après congélation puis aux 5<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours en utilisant les méthodes décrites précédemment (dénombrements, mesure du pH, dosage de l'histamine).

#### **6.8. Effet bioprotecteur de *L. sakei* LHis 2885 face à des cocktails de bactéries histaminogènes sur du thon fumé**

Sur ce dernier challenge-test réalisé en triplicat, la technique de biopréservation a été testée sur du thon albacore fumé en tranches (Saumextra).

Deux cocktails de bactéries histaminogènes inoculés à 100 UFC/g de thon fumé ont été préparés, soit avec deux bactéries mésophiles *M. morgani* (CIP A231<sup>T</sup>) et *P. damsela* (CIP 102761<sup>T</sup>), ou deux bactéries psychrotolérantes *M. psychrotolerans* (CIP 109403<sup>T</sup>) et *P. phosphoreum* (CCUG 16288) pure ou en co-culture avec la bactérie lactique bioprotectrice à 10<sup>6</sup> UFC/g. Un lot témoin non inoculé ainsi qu'un lot avec uniquement la bactérie lactique ont aussi été réalisés. Les longes ont été inoculées par pulvérisation à l'aide d'un aérographe (cf. § 6-2). Suite à cette étape, 40 g de tranches de thon fumé ont été conditionnés en plaquette sous-vide et stockés à 8°C. Les produits ont été analysés au niveau microbiologique et biochimique le jour de l'inoculation puis chaque début de semaine pendant 4 semaines en utilisant les méthodes décrites précédemment.

### **7. Analyse statistique**

Le calcul des moyennes, des écart-types, minimum et maximum, ainsi que les analyses de variance à un facteur ou à deux facteurs avec répétition d'expérience ont été réalisés sur Excel (Microsoft Excel 2007, Microsoft Corp. Redmond Wash, USA) en utilisant l'utilitaire d'analyse. Le seuil pour lequel une différence entre deux échantillons est significative a été fixé à  $p < 0,05$ . Plus précisément, les équations utilisées pour effectuer ces calculs sont notés ci dessous :



- ✓ Moyenne :  $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$
- ✓ L'écart-type (ou déviation standard) correspond à la racine carrée de la variance ( $S^2$ ) qui est calculée selon l'équation suivante :  $s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$
- ✓ La différence significative entre deux échantillons a été établie selon la loi t de Student avec une probabilité  $p < 0.05$ . L'hypothèse nulle est rejetée lorsque  $p(t > t_{\text{obs}}) \leq \frac{\alpha}{2}$ . Lorsque deux échantillons ont le même effectif n, l'équation selon la loi de Student est la suivante :

$$t_{\text{obs}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{\text{SCE}_1 + \text{SCE}_2}{n(n-1)}}$$

# RESULTATS & DISCUSSION

## 1. Constitution d'une collection de bactéries

### 1.1. Recherche de bactéries histaminogènes issues de produits de la mer

Des bactéries histaminogènes ont été recherchées lors de 3 criblages successifs par la méthode de Majjala (1996) et Takahashi (2003) sur des :

1. Produits frais : Longes de thon, sardines et maquereaux entiers
2. Produits fumés : Longes de thon fumé
3. Produits responsables d'intoxications (anchois, saumon et thon)

#### 1.1.1. Isolément à partir de produits frais

Lors de cette recherche, les longes de thon, les maquereaux et les sardines entières conservés à 20°C pendant 5 jours, ou 4°C pendant 16 jours se sont fortement altérés (fortes odeurs désagréables).

Après une incubation à 20°C pendant 5 jours, la flore totale et les entérobactéries, naturellement présentes dans les produits, se sont bien développées. Les concentrations en flore totale dans chaque produit étaient à peu près similaires et supérieures à 9 log UFC/g, tandis que les entérobactéries étaient supérieures à 8 log UFC/g (Tableau 19).

Pour les produits incubés à 4°C durant 16 jours, la flore totale était presque aussi élevée qu'à 20°C (environ 9 log UFC/g) tandis que les entérobactéries étaient nettement inférieures (environ 5-6 log UFC/g) (Tableau 19).

Tableau 19 : Flore totale et entérobactéries (log UFC/g) des produits conservés sous-air à 4°C et 20°C

Produits	Conservation à 20°C - 5 jours		Conservation à 4°C - 16 jours	
	Flore totale (L&H)	Entérobactéries (VRBG)	Flore totale (L&H)	Entérobactéries (VRBG)
Thon	9,58	8,93	8,9	6,02
Maquereau	9,06	9,40	8,48	5,23
Sardine	9,02	8,70	8,68	6,46

De 2 à 5 colonies, issues des boîtes dénombrables de VRBG et L&H, ont été repiquées en bouillon BHI salé (71 isolats), avant d'être inoculées en microplaques en milieu Majjala modifié afin de rechercher des isolats bactériens producteurs d'histamine. Après 48 h d'incubation, 33 isolats (46%) ont provoqué un virement de coloration (jaune-> violet) lié à une augmentation du pH. La concentration en histamine dans les puits a été mesurée à l'aide du kit Veratox dans une gamme de 25 à 500 mg/kg

d’histamine. Au final, 8 isolats (12%) ont synthétisé plus de 500 mg/kg d’histamine, 4 isolats (6%) ont fabriqué des quantités entre 100 et 500 mg/kg et 21 isolats (30%) ayant produits moins de 100 mg/kg ont été considérés comme non producteurs.

Le gène de l’histidine décarboxylase a été recherché sur les 8 isolats fortement producteurs d’histamine par la méthode de Takahashi *et al.* (2003). Un fragment de 709 pb a été amplifié pour 3 isolats (HB2810, HB2811, HB2855), les autres isolats n’ont présenté aucun produit d’amplification (HB2824, HB2826, HB2840, HB2843, HB2850) (Tableau 20). L’ADNr16S de ces 8 isolats a été amplifié et séquencé (1350 pb), pour déterminer le genre et l’espèce de ces bactéries fortement productrices d’histamine par rapport à la base de données du NCBI. Parmi les isolats positifs en PCR, 2 isolats (HB2810, HB2811) ont été identifiés en tant que *M. morganii* subsp. *sibonii* et le dernier isolat (HB2855) a été identifié comme *M. psychrotolerans*. Les autres isolats, négatifs lors de la PCR, ont été identifiés en tant que *Pseudomonas* spp. (HB2824, HB243, HB2850) et *Aeromonas salmonicida* (HB2840). La souche HB2826 n'a pas pu être identifiée. Les 63 autres isolats ayant une production inférieure à 500 mg/kg n’ont pas été caractérisés.

**Tableau 20 : Identification des bactéries histaminogènes ayant produit des concentrations en histamine supérieures à 500 mg/kg en milieu de Majjala. Le gène HDC a été recherché à l'aide des amorces de Takahashi *et al.* (2003)**

Référence	Identification sur Blastn	Origine Conservation	Gène HDC	Pourcentage d'identité
HB2010	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>sibonii</i>	Sardine - 20°C	Oui	100% - DQ358146
HB2811	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>sibonii</i>	Sardine - 20°C	Oui	100% - DQ358146
HB2824	<i>Pseudomonas</i> spp.	Thon – 4°C	Non	100 % - AM179883
HB2826	Non identifiée	Thon – 4°C	Non	NR <sup>a</sup>
HB2840	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Maquereau – 4°C	Non	100% - X60405
HB2843	<i>Pseudomonas</i> spp.	Thon – 4°C	Non	100 % - AM179883
HB2850	<i>Pseudomonas caeni</i>	Maquereau – 4°C	Non	100% - EU620629
HB2855	<i>Morganella psychrotolerans</i>	Thon – 4°C	Oui	100% - DQ358135

<sup>a</sup>NR : Non réalisé

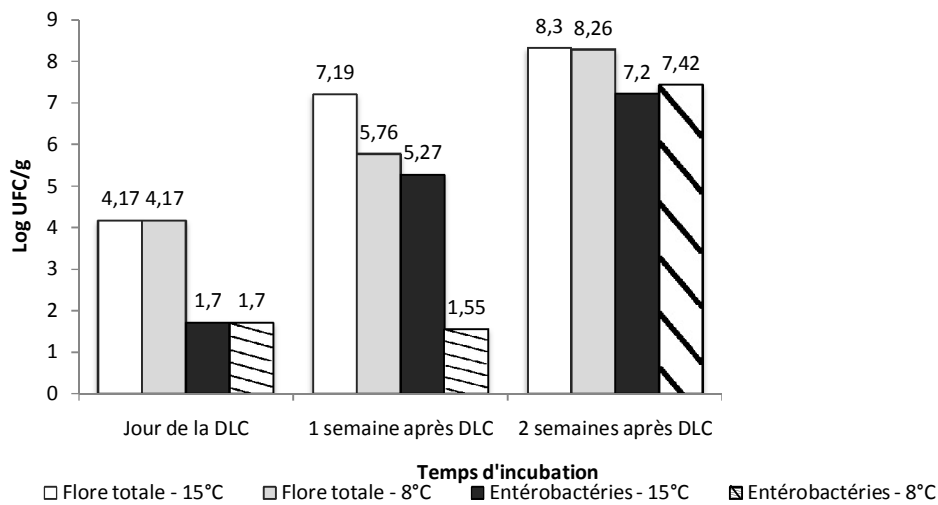
#### 1.1.2. Isolement à partir de produits fumés

Des longes de thon fumé congelées (Saumextra) ont été décongelées à 4°C et conservées à cette température jusqu’à leur DLC. Après cette date limite, les produits ont été vieillies à 15°C ou 8°C pour permettre le développement des flores histaminogènes mésophiles et psychrotolérantes respectivement. Les concentrations bactériennes sont présentées dans la figure 21.

Au jour de la DLC, les longes de thon avaient une flore totale de 4 log UFC/g et les entérobactéries étaient inférieures à 2 log UFC/g. Après une semaine d’incubation à 15°C, la flore totale a augmenté

jusqu'à 7 log UFC/g, puis s'est stabilisée à 8 log UFC/g à 2 semaines. Les entérobactéries ont augmenté jusqu'à 5,7 log UFC/g en 1 semaine, puis se sont stabilisées aux alentours de 7 log UFC/g à 2 semaines.

La flore totale et les entérobactéries des longes de thon conservées à 8°C se sont développées plus lentement qu'à 15°C. Respectivement, de 5 et 2 log UFC/g à une semaine d'incubation, mais au bout de 2 semaines, les concentrations étaient similaires.



**Figure 21 : Evolution de la flore totale et des entérobactéries dans des longes de thon fumées stockées à 15°C et 8°C pendant 2 semaines au-delà de leur DLC**

Le pH et le taux d'histamine ont aussi été suivis dans ces produits, ils sont détaillés dans le tableau 21. Le jour de la DLC, le pH de ce produit était de 5,7. Lors de son stockage, le pH a augmenté au delà de 6 après 1 semaine pour les produits à 15°C et en 2 semaines pour les produits à 8°C.

Des quantités d'histamine plus importantes ont été retrouvées dans les produits conservés à 15°C plutôt qu'à 8°C. A une température de 15°C, une concentration maximale de 230 mg/kg a été retrouvée sur les tranches de thon fumé à 2 semaines de stockage, tandis que les tranches conservées à 8°C sont restées à des concentrations inférieures à 80 mg/kg (Tableau 21).

Tableau 21 : pH et teneur en histamine dans les longes de thon fumé lors de leur incubation à 15°C et 8°C

Incubation des produits	8°C		15°C	
	pH	Histamine (mg/kg)	pH	Histamine (mg/kg)
1 semaine	5,74	80 mg/kg	6,2	10 mg/kg
2 semaines	6,17	10 mg/kg	6,27	230 mg/kg

Une conservation à 15°C favorise principalement la croissance des entérobactéries et parallèlement la teneur en histamine dans les produits.

Quatre-vingt colonies ont été purifiées sur les boîtes dénombrables des entérobactéries (VRBG). Selon les mêmes tests que pour les produits frais, 57 isolats (71 %) ont entraîné une coloration violette du milieu de Majjala modifié. Sur ces isolats, la présence du gène de l'histidine décarboxylase a été directement recherchée par la méthode PCR. Seulement 2 isolats (2,5%) ont donné un produit d'amplification. Un fragment de leur ADN<sub>r</sub>16S (région SP1-SP4) a été séquencé et comparé aux bases de données. Les isolats HB2875 et HB2876 ont été identifiés en tant que *M. psychrotolerans* par le logiciel Blastn (Tableau 22).

#### 1.1.3. Isolément à partir de produits responsables d'intoxications

Les entérobactéries ont été recherchées sur les 8 produits de l'ANSES responsables de toxi-infections alimentaires (anchois, saumon et thon) dont un morceau de thon avec plus de 2 000 mg/kg d'histamine. Suite à la mise en évidence d'une intoxication, ces produits cuits, ont été congelés et expédiés à l'ANSES pour analyse.

Vingt colonies ont été isolées à partir des boîtes dénombrables de VRBG. Suivant le même procédé que les produits frais, 161 isolats ont été testés en milieu de Majjala modifié et uniquement 44 (27%) se sont révélés positifs (10 isolats saumon et 34 isolats thon). Quatre isolats (9.1%), provenant des échantillons de thon, ont présenté un produit d'amplification de 709 pb, tandis que les isolats issus du saumon étaient tous négatifs. Ils ont été identifiés comme *Pseudomonas* spp. d'après le séquençage partiel de leur ADN<sub>r</sub>16S.

#### 1.1.4. Sélection de bactéries histaminogènes parmi des souches de collection publiques ou privées

Huit souches potentiellement histaminogènes ont été commandées auprès de la CRBIP (Tableau 15). Ces espèces ont été reconnues comme productrices d'histamine dans divers poissons. En milieu de Majjala modifié, 6 souches (CIPA231<sup>T</sup>, CIP109403<sup>T</sup>, CIP102761<sup>T</sup>, CIP60.86<sup>T</sup>, CIP76.1<sup>T</sup> et CIP103364<sup>T</sup>) ont entraîné un virement de la coloration et synthétisé plus de 500 mg/kg d'histamine. Les 2 autres souches, *P. phosphoreum* (CIP 102511<sup>T</sup>) et *R. planticola* (CIP 100751<sup>T</sup>), n'ont pas produit d'histamine. Le gène de l'histidine décarboxylase a été repéré uniquement dans 5 souches : *M. morgani* subsp.

*morganii* (CIP A231<sup>T</sup>), *M. psychrotolerans* (CIP 109403<sup>T</sup>), *R. ornithinolytica* (CIP 103364<sup>T</sup>), *P. damsela* subsp. *damsela* (CIP 102761<sup>T</sup>) et *E. aerogenes* (CIP 60.86<sup>T</sup>). La souche d'*E. gergoviae* (CIP 76.1<sup>T</sup>) n'a pas été testée par PCR, l'extraction d'ADN n'ayant pas fonctionné pour cette souche (Tableau 22).

#### 1.1.5. *Bilan et discussion*

Une collection de bactéries à Gram négatif fortement productrices d'histamine a été mise en place avec succès. Au total, 23 bactéries (7%) fortement productrices d'histamine et représentative des intoxications histaminiques ont été identifiées sur 333 isolats issus de produits de la mer (7 souches d'*H. alvei*, 14 souches de *P. phosphoreum*, 8 souches CRBIP, 71 isolats sur produits frais, 80 isolats sur thon fumé et 161 isolats sur produits contaminés), elles ont été listées dans le tableau 22.

La recherche de bactéries histaminogènes a très souvent été mise en œuvre pour débiter des recherches plus approfondies (Bjornsdottir *et al.*, 2009; Ferrario *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2009), permettant par exemple la mise au point de méthodes de quantification par qPCR en temps réel ou l'étude de l'expression des gènes de l'histidine décarboxylase chez *M. morganii*. Dans notre cas, la sélection de bactéries fortement productrices était très importante pour rechercher des bactéries bioprotectrices permettant de prévenir la formation d'histamine dans des produits marins à risque.

Pour y parvenir, la formation d'histamine par les 333 isolats a été étudiée en milieu de Maijala supplémenté en histidine, avec un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol). Le milieu de Maijala a été testé sur des bactéries lactiques et le nombre de faux positif était nul (Maijala, 1993). Sur le même principe, le milieu de Niven testé contre des bactéries à Gram négatif avait aussi présenté le même ratio (Niven *et al.*, 1981). Ces milieux ont été ensuite modifiés et testés sur un plus grand panel de bactéries à Gram négatif en boîte de Pétri par Mavromatis and Quantick (2002) avec un succès moins important. En effet, l'utilisation d'un milieu gélosé a induit la diffusion de la coloration au-delà de la colonie bactérienne. Le dénombrement ne pouvait alors s'effectuer qu'avec un maximum de 80 colonies par boîte. Un grand nombre de faux-positif, de 38 à 63,1 %, ont finalement été mis en évidence après quantification de la production d'histamine (Bjornsdottir *et al.*, 2009b; da Silva *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001b; López-Sabater *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 2009). De plus, des souches qui n'ont pas induit une augmentation du pH peuvent être aussi productrices d'histamine, suite à la formation d'autres composés acides. Il serait judicieux de tester l'ensemble des isolats pour déterminer le ratio faux négatif/faux positif engendré par ce type de milieu (Bjornsdottir *et al.*, 2009b; Tao *et al.*, 2009). Cette méthode doit donc impérativement être associée à la mesure de la concentration en histamine. Par ailleurs, un test PCR pour repérer le gène de l'histidine décarboxylase, tel que la méthode de Takahashi *et al.* (2003), peut être envisagé. Cependant,

certaines bactéries possédant ce gène ne sont pas forcément de grosses productrices (Morii and Kasama, 2004; Morii *et al.*, 2006). A l'inverse, d'autres espèces bactériennes comme *Pseudomonas* ne sont pas toujours détectées par cette méthode.

Tableau 22 : Collection de bactéries histaminogènes constituée pour cette étude

N°	Réf.	Identité	Produit et température de stockage	Maijala	Séquençage ADN <sub>r</sub> 16S	Gène <i>hdc</i> (Takahashi <i>et al.</i> , 2003)
1	CIP A231	<i>M. morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	CRBIP	+	Complet	+
2	HB2810	<i>M. morganii</i> subsp. <i>sibonii</i>	Sardine (20°C)	+	Complet	+
3	HB2811	<i>M. morganii</i> subsp. <i>sibonii</i>	Sardine (20°C)	+	Complet	+
4	HB2824	<i>Pseudomonas</i> spp.	Thon germon (4°C)	+	Complet	-
5	HB2826	Non identifié	Thon germon (4°C)	+	Complet	-
6	HB2840	<i>A. salmonicida</i>	Maquereau (4°C)	+	Complet	-
7	HB2843	<i>Pseudomonas</i> spp.	Thon germon (4°C)	+	Complet	-
8	HB2850	<i>Pseudomonas caeni</i>	Maquereau (4°C)	+	Complet	-
9	HB2871	<i>Pseudomonas</i> spp.	ANSES	+	SP1-SP4	+
10	HB2872	<i>Pseudomonas</i> spp.		+	SP1-SP4	+
11	HB2873	<i>Pseudomonas</i> spp.		+	SP1-SP4	+
12	HB2874	<i>Pseudomonas</i> spp.		+	SP1-SP4	+
13	CIP 109403	<i>M. psychrotolerans</i>	CRBIP	+	Complet	+
14	HB2855	<i>M. psychrotolerans</i>	Thon germon (4°C)	+	Complet	+
15	HB2875	<i>M. psychrotolerans</i>	Thon fumé (15°C)	+	SP1-SP4	+
16	HB2876	<i>M. psychrotolerans</i>		+	SP1-SP4	+
17	CIP 102761	<i>P. damsela</i>	CRBIP	+	Complet	+
18	CIP 60.86	<i>E. aerogenes</i>		+	Complet	+
19	CIP 103364	<i>R. ornithinolytica</i>		+	Complet	+
20	MIP2439	<i>H. alvei</i>		+	SP1-SP4	-
21	MIP2467	<i>H. alvei</i>	Darne de saumon	+	Complet	NC
22	MIP2468	<i>H. alvei</i>		+	SP1-SP4	NC
23	CCUG16288	<i>P. phosphoreum</i>	CCUG	+	Complet	+

Souches fortement productrices d'histamine utilisées pour la sélection des bactéries bioprotectrices ou lors des challenge-tests

Certains auteurs utilisent un autre milieu pour quantifier la production d'histamine, communément dénommé bouillon histidine décarboxylase (HDB, 1% Bacto Proteose Peptone, 0.3% d'extrait de levure, 1.5% NaCl et 0.5% de L-histidine). Ce milieu permet la quantification précise de la production d'histamine jusqu'à 10 000 mg/kg par la méthode HPLC ou à l'aide de kit ELISA (Bjornsdottir *et al.*, 2009).

Les bactéries histaminogènes font partie d'un très grand nombre de familles telles que les *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*. Notre étude a permis de mettre en évidence des espèces productrices d'histamine dans chacune de ces 3 familles.

Lors de la mise en place d'une collection de bactéries histaminogènes, *Morganella* est le genre le plus fréquemment rencontré. Bjornsdottir *et al.* (2009) ont analysé 152 souches potentiellement productrices et ont identifié parmi elles, 30 souches de *Morganella*. De même, Ferrario *et al.* (2012) ont identifié 16 *M. morganii* sur 43 souches entériques possédant le gène de l'histidine décarboxylase. Dans notre étude, sur 23 bactéries histaminogènes issues de produits de la mer, nous avons isolé des *Morganella* (30%) mais avec une prévalence moindre, puisque nous avons également 30% de *Pseudomonas*.

*Pseudomonas* a souvent été associé à l'altération de la chair et plus rarement à la production d'histamine. Dans notre étude, suite à la mesure d'histamine en milieu Majjala modifié, 7 isolats ont été sélectionnés et identifiés comme *Pseudomonas* spp. Seulement 4 isolats ont présenté un produit d'amplification du gène *hdc* par la méthode de Takahashi *et al.* (2003). Cette méthode PCR a été réalisée sur les séquences protéiques de *M. morganii* (ATCC 35200), *R. planticola* (ATCC 43176) et *E. aerogenes* (ATCC 43175). L'absence d'amplification peut s'expliquer par la différence de séquence protéique de la protéine *hdc* chez les *Pseudomonadaceae* (LG TGNEY S) par rapport à celle des *Enterobacteriaceae* (CGDWGEYC) sur laquelle a été créée l'amorce sens *hdc*-f (Mercado-Blanco *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2003), ce qui empêche sa fixation et l'amplification. Le même constat est fait pour *Aeromonas salmonicida* (HB2840) isolée sur maquereau, membre de la famille des *Pseudomonadaceae*, où le gène *hdc* n'a pas été amplifié (CGDWSQQS). Ces deux genres bactériens ont été rapportés comme responsables de l'altération et de la production d'amines biogènes dans de la sardine ou du saumon fumé lorsqu'ils représentent la flore dominante au cours du stockage (Mercado-Blanco *et al.*, 2001). A l'heure actuelle, 6 souches de *Pseudomonas* spp. (3 *Pseudomonas fluorescens*) et 4 souches d'*Aeromonas salmonicida* ont fait l'objet d'études en rapport avec le gène *hdc* (Charette *et al.*, 2012; Izquierdo *et al.*, 2001; Lakshmanan *et al.*, 2002; Reith *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2003).

L'approche consistant à cribler les bactéries histaminogènes en utilisant les amorces proposées par Takahashi *et al.* (2003) a montré ses limites puisqu'elle ne nous a pas non plus permis de sélectionner des souches de *P. phosphoreum*, espèce pourtant connue pour comporter des souches fortement productrices d'histamine (Dalgaard *et al.*, 2008).

Nous avons cependant souhaité centrer ce criblage sur la détection du gène *hdc* de façon à augmenter notre collection de *Morganella* pour développer une méthode de qPCR spécifique de ce



genre bactérien. Une quantification de la production de l'histamine sur les isolats non retenus dans cette étude permettra probablement d'augmenter la collection de bactéries histaminogènes pour des travaux ultérieurs.

Parmi les 23 souches mises en évidence, 5 d'entre-elles ont été choisies pour la sélection de bactéries lactiques bioprotectrices et/ou les essais par challenge-tests sur produits : *M. morgani* (CIP A231<sup>T</sup>), *M. psychrotolerans* (CIP 109403<sup>T</sup>), *H. alvei* (MIP2467), *P. phosphoreum* (CCUG 16288) et *P. damsela* (CIP 102761<sup>T</sup>). Ces souches bien identifiées et fortement productrices d'histamine ont fait l'objet d'expérimentations détaillées dans la suite de ce chapitre.

### **1.2. Recherches de bactéries lactiques à propriétés antimicrobiennes issues de produits de la mer**

A notre connaissance, cette étude est la première à porter sur la sélection de bactéries lactiques bioprotectrices face à des bactéries histaminogènes pour une application dans des produits marins riches en histidine.

Dans un premier temps, 140 souches de bactéries lactiques ont été isolées des produits marins riches en histidine, également utilisés pour la recherche de bactéries histaminogènes. Ces souches ont été isolées à partir des boîtes de dénombrement de la flore lactique. Le nombre d'isolats obtenus sur chaque matrice est présenté dans le tableau 23. Trente huit bactéries lactiques isolées d'autres produits de la mer (saumon frais, saumon fumé, crevette cuite décortiquée, grenadier, co-produits de crevette et poulpe) issues de la collection Ifremer/Oniris ainsi que deux souches commerciales (ferment LLO et BLN, Biocéane, France) ont également été utilisées (Tableau 24).

Le potentiel d'inhibition a été testé selon la technique des doubles couches de Matamoros *et al.* (2009) face à 4 bactéries fortement productrices d'histamine. En utilisant le milieu MRS pour le développement des bactéries lactiques, la plupart d'entre elles ont montré une très forte inhibition des bactéries histaminogènes, probablement liée à une forte acidification.

Afin d'être dans les conditions les plus proches possibles d'une méthode de biopréservation applicable dans le thon, ce test a été réitéré sur une sous couche et une double couche de milieu jus de thon gélosé. Ce test a permis de sélectionner 20 souches issues des produits riches en histidine et 7 souches parmi celles de la collection Ifremer/Oniris et des ferments commerciaux, capables d'inhiber au moins une des bactéries histaminogènes testées (Tableaux 23 et 24). Les souches sélectionnées appartiennent aux espèces *L. fuchuensis* (10 sur 25), *L. sakei* (5/25), *C. alterfunditum*, *C. jeotgali*, *V. fluvialis*, *L. piscium* et *L. gelidum*. La plupart des souches ont inhibé la croissance de *M. morgani*, *H. alvei* et *M. psychrotolerans*. La taille des halos d'inhibition est très variable puisqu'elle se situe entre 0,1 et 1,65 cm de rayon (tableau 25).

**Commentaire [MFP2]:** Revois ton commentaire du tableau 25, ce n'est pas cohérent de ne parler que des 7 souches de la collection

Tableau 23 : Potentiel d'inhibition de bactéries lactiques, isolées de produits marins riche en histidine, contre 4 bactéries histaminogènes (*M. morgani*, *H. alvei*, *M. psychrotolerans* et *P. phosphoreum*) par la méthode en double couche de Matamoros *et al.* (2009) sur jus de thon gélosé

Produits	Conditionnement (a)	Nombres de souches isolées	Nombres de souches inhibitrices	<i>M. morgani</i> (CIP A231 <sup>T</sup> )	<i>H. alvei</i> (MIP24687)	<i>P. phosphoreum</i> (CCUG 16288)	<i>M. psychrotolerans</i> (CIP 109403 <sup>T</sup> )
Maquereau frais entier	SV	16	0	0	0	0	0
	AM	16	0	0	0	0	0
Filet de maquereau frais	SV	8	0	0	0	0	0
	AM	16	1	0	0	1	0
Filet de sardine fraîche	SV	2	0	0	0	0	0
	AM	8	0	0	0	0	0
Sardine fraîche entière	SV	8	2	2	1	0	2
	AM	14	4	4	4	0	4
Longe de thon	SV	12	1	0	0	0	1
	AM	16	2	1	0	0	2
Thon fumé	SV	8	1	1	1	0	1
Filet de harengs fumés	SV	8	8	8	8	6	8
Maquereau fumé	SV	8	1	1	1	1	1
<b>Total</b>	-	140	20	17	15	8	19

a : SV = Conditionnement sous-vide ; AM = Conditionnement sous atmosphère modifié (50% CO<sub>2</sub>, 50% N<sub>2</sub>)

Tableau 24 : Potentiel d'inhibition de bactéries lactiques issues de la collection Ifremer/Oniris et de 2 ferments contre 4 bactéries histaminogènes (*M. morganii*, *H. alvei*, *M. psychrotolerans* et *P. phosphoreum*) par la méthode en double couche de Matamoros *et al.* (2009) sur jus de thon gélosé

Espèces	Nombres de souches	Nombres de souches inhibitrices	<i>M. morganii</i> (CIP A231 <sup>T</sup> )	<i>H. alvei</i> (MIP24687)	<i>P. phosphoreum</i> (CCUG 16288)	<i>M. psychrotolerans</i> (CIP 109403 <sup>T</sup> )
<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	1	1	1	1	0	1
<i>Carnobacterium divergens</i>	3	0	0	0	0	0
<i>Carnobacterium groupe XI</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Carnobacterium piscicola</i>	4	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus farciminis</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus fuchuensis/plantarum</i>	2	2	2	2	0	2
<i>Lactobacillus sakei</i>	1	1	1	1	0	1
<i>Lactococcus piscium</i>	7	1	1	1	0	1
<i>Leuconostoc gelidium</i>	8	0	0	0	0	0
<i>Vagococcus inhae</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Vagococcus fluvialis</i>	1	1	1	1	0	0
Bactéries lactiques non identifiées issues de crevettes caramotes	4	1	1	1	0	1
Ferments commerciaux Biocéane	2	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>6</b>

Les tests sur *P. phosphoreum* n'ont pas toujours pu être interprétés car cette bactérie n'a pas bien poussé dans la double couche de gélose molle (Tableau 24). *P. phosphoreum* est une espèce très sensible à la chaleur et il est probable qu'elle ait été détruite lors de son introduction dans la gélose en surfusion.

**Tableau 25 : Liste récapitulative des bactéries lactiques bioprotectrices et halos d'inhibitions contre 4 bactéries histaminogènes**

Référence	Identification des bactéries lactiques inhibitrices Identification ADNr 16S	Rayon du halo d'inhibition (cm) contre...			
		<i>M. morganii</i> (CIP A231 <sup>T</sup> )	<i>H. alvei</i> (MIP24687)	<i>P. phosphoreum</i> (CCUG 16288)	<i>M. psychrotolerans</i> (CIP 109403 <sup>T</sup> )
EU2257	<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	1,55	1,1	NT	1,65
EU2255	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	1,15	0,65	NT	1,05
EU2256	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	1,05	0,65	NT	0,85
EU2202	<i>Lactobacillus sakei</i>	0,85	0,55	NT	1,1
EU2258	<i>Lactococcus piscium</i>	1,05	0,9	NT	1,65
CD264	<i>Vagococcus fluvialis</i>	0,65	0,55	NT	0
HOU2743	NC (bactérie lactique crevette)	0.25	0.15	NT	0.15
LHIS2995	<i>Carnobacterium jeotgali</i>	0,5	0,4	0,5	0,7
LHIS2996	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	0,7	0,1	0,7	1,2
LHIS2997	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	0,7	0,1	0,7	1,2
LHIS2998	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	0,8	0,8	0,9	1
LHIS2999	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	0,7	0,1	0,7	1,2
LHIS3000	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	0,7	0,1	0,7	1,2
LHIS2883	NC	0,6	0,2	1	0
LHIS2885	<i>Lactobacillus sakei</i>	0,8	0,2	1	0
LHIS2890	<i>Lactobacillus sakei</i>	0,75	0,25	1,2	0
LHIS2897	<i>Lactobacillus sakei</i>	0,9	0,4	1,2	0
LHIS3001	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	0,8	0,8	0,8	0
LHIS3002	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	0,7	0,8	0,8	0
LHIS3003	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	0,7	0,8	0,8	0
LHIS3006	<i>Lactobacillus sakei</i>	0,6	0,4	0,3	0
LHIS2886	<i>Lactobacillus curvatus</i>	0,2	0	0,3	0
LHIS2959	<i>Leuconostoc gelidum</i>	0	0	0	0,4
LHIS2917	NC	0,2	0	0,3	0
LHIS2929	NC	0	0	0	0.2
LHIS2924	NC	0	0	0	0,4
LHIS2959	NC	0	0	0.4	0,2

NC : Non connue

Parmi les 140 souches isolées dans cette étude, 20 (11,1 %) ont présenté une inhibition d'au moins une des 4 bactéries histaminogènes avec des halos d'inhibition supérieurs à 0,1 cm (Tableaux 23 et 25). En dessous de cette valeur, les souches n'ont pas été considérées comme inhibitrices. *M.*

*psychrotolerans* a été inhibée par 19 souches de bactéries lactiques. Toutes ces souches, exceptées 2 souches de longe de thon, étaient également inhibitrices de *M. morgani*. *H. alvei* a été inhibé par 15 souches (communes avec celles inhibant *M. psychrotolerans* et *M. morgani*), avec un halo en général moins important. Enfin, *P. phosphoreum* était la moins sensible. Seulement 8 souches (4,4 %) ont présenté des rayons d'inhibition de 0,2 à 1,2 cm.

Les bactéries inhibitrices provenant des produits riches en histidine ont été identifiées au niveau phénotypique et sont toutes à Gram positif, sans activité catalase, ni oxydase (Tableau 25). Le séquençage partiel ou complet de leur ADNr 16S a permis d'identifier 16 de ces souches. 40% appartiennent à l'espèce *L. fuchuensis* et 20% à *L. sakei*. Puis différentes espèces de bactéries lactiques ont été retrouvées telles que *C. jeotgali* isolé de maquereau frais, *L. curvatus* isolé de sardine fraîche conditionnée sous-vide et *L. gelidum* isolé de filet de maquereau conditionné sous atmosphère protectrice. Ces expérimentations ont permis de mettre en évidence chez différents genres et espèces de bactéries lactiques, leur capacité à inhiber la croissance de diverses bactéries histaminogènes.

#### **Bilan et discussion**

Au final, 27 souches sur 178 (14%) bactéries lactiques, issues de produits marins, ont présenté une inhibition en milieu jus de thon d'au moins une des 4 bactéries histaminogènes, avec des halos d'inhibition entre 0,1 et 1,65 cm. Afin de poursuivre nos expériences sur matrices, par le biais de challenge-tests, 12 bactéries lactiques ont été choisies selon leur potentiel d'inhibition et leurs caractéristiques en lien avec les applications de biopréservation (adaptation aux basses températures, absence d'altération de produits marins et de synthèse d'amines biogènes) (Tableau 26).

Les bactéries lactiques sont particulièrement utilisées dans le domaine de la biopréservation, de nombreux genres tels que *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* ou encore *Leuconostoc* ont fait l'objet d'études sur des produits frais ou fermentés à base de viande (bœuf, porc), de vin, mais aussi de poisson (Leroi, 2010; Ghanbari *et al.*, 2013).

Deux souches de *Carnobacterium*, *C. jeotgali* LHS2995 et *C. alterfunditum* EU2257, ont présenté des inhibitions contre 4 bactéries histaminogènes, à l'exception de *P. phosphoreum* pour *C. alterfunditum* EU2257, avec des rayons d'inhibitions supérieurs à 0,5 cm. Le genre *Carnobacterium*, et plus particulièrement certaines souches de *C. maltaromaticum* et *C. divergens* inhibent la croissance de *L. monocytogenes* sur du saumon fumé (Brillet *et al.*, 2005b; Leroi, 2010; Yamazaki *et al.*, 2003). Dans la

plupart des cas, l'inhibition est liée à la production d'une bactériocine (Brillet *et al.*, 2004) et ces souches n'ont en général pas d'action contre les bactéries histaminogènes à Gram négatif.

**Tableau 26 : Sélection de 12 bactéries bioprotectrices pour les challenge-tests**

Souches	Identification	Produit d'origine
LHIS2995	<i>Carnobacterium jeotgali</i>	Maquereau
EU2258	<i>Lactococcus piscium</i>	Saumon ou Grenadier
CD264	<i>Vagococcus fluvialis</i>	Crevette cuite décortiquée
BLN	<i>Lactococcus</i>	Ferment Biocéane
EU2202	<i>Lactobacillus sakei</i>	Saumon fumé
LHIS2886	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Sardine
EU2257	<i>Carnobacterium alterfunditum</i>	Grenadier
EU2256	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	Dorade
LHIS2996	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	Hareng fumé
LHIS2959	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Maquereau
LHIS2885	<i>Lactobacillus sakei</i>	Sardine
LHIS3006	<i>Lactobacillus sakei</i>	Thon fumé

Sept souches de *L. piscium*, dont une bactérie isolée de saumon (tab. 24) (Williams *et al.*, 1990), ont aussi été étudiées. La souche *L. piscium* EU2258 est la seule ayant inhibé la croissance de *M. morgani*, *M. psychrotolerans*, et d'*H. alvei* avec des halos d'un rayon supérieur à 0,9 cm. Cette espèce a récemment été mise en valeur dans des procédés de biopréservation sur de la crevette tropicale contre *L. monocytogenes* et des bactéries d'altération comme *Brochotrix thermosphacta* (Fall *et al.*, 2010a; Fall *et al.*, 2010b; Matamoros *et al.*, 2009a). De plus, son adaptabilité au froid, la rend particulièrement intéressante pour lutter contre les bactéries histaminogènes psychrotrophes (Garnier *et al.*, 2010). Elle a aussi été retrouvée dans des produits carnés, où elle peut être responsable de l'altération lors du stockage (Rahkila *et al.*, 2012; Sakala *et al.*, 2002a, 2002b).

Le genre *Lactobacillus* est très étendu avec 192 espèces référencées en 2013 qui ont été retrouvées dans divers produits fermentés tel le fromage, le vin ou encore le pain. Certaines peuvent être impliquées dans leur altération alors que d'autres participent à leur préservation en inhibant la flore pathogène ou altérante. Dans notre étude, 10 souches de *L. fuchuensis*, 6 souches de *L. sakei*, 1 souche de *L. curvatus* et de *L. farciminis* ont été testées. Tout d'abord, *L. fuchuensis*, initialement isolé de bœuf (Sakala *et al.*, 2002c) et retrouvé par la suite dans du hareng mariné (Lyhs and Björkroth, 2008), a révélé un fort potentiel d'inhibition contre les 4 bactéries histaminogènes avec des rayons d'inhibitions allant jusqu'à 1,2 cm. Une souche de *L. fuchuensis* a déjà été testée pour la

biopréservation des crevettes, mais sans succès puisqu'elle s'est révélée responsable d'altération sur cette matrice (Matamoros *et al.*, 2009a).

Une autre espèce *L. sakei* a fait l'objet de nombreuses études dans le domaine des aliments fermentés ou non. Sur les 6 souches testées, 5 d'entre elles ont présenté une inhibition contre 3 bactéries histaminogènes avec des rayons compris entre 0,3 et 1,1 cm. Au final, trois souches ont été retenues arbitrairement, *L. sakei* LHIS2885, LHIS3006 et EU2202. L'effet bioprotecteur de cette espèce a été testé sur de la truite par Katikou *et al.* (2007), qui ont démontré une augmentation de la durée de vie du produit au niveau sensoriel. De plus, dans cette étude, la croissance des entérobactéries naturellement présentes dans la chair a été ralentie de 2 log UFC/g, tout en observant une réduction de la synthèse d'amines biogènes (putrescine et cadavérine). D'autres études sur des produits carnés ont aussi révélé des activités anti-microbiennes de *L. sakei* contre *L. monocytogenes* et *B. thermosphacta*. Le mécanisme d'action le plus souvent associé à cette espèce correspond à la production de bactériocines, essentiellement des sakacines (Gálvez *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Vermeiren *et al.*, 2004). Enfin, certaines souches de *L. sakei* sont psychrotrophes et sont d'autant plus intéressantes pour des applications en produits réfrigérés (Champomier-Vergès *et al.*, 2001). Pour compléter notre panel de souches, des souches appartenant à deux espèces productrices de bactériocines, *L. curvatus* et *L. gelidum*, (Stiles, 1996; De Vuyst and Leroy, 2007) et une souche de *V. fluvialis* ont aussi été choisies. L'espèce *V. fluvialis* isolée à plusieurs reprises de saumon, (Macé *et al.*, 2012) n'a jamais été étudié pour ses propriétés inhibitrices.

A l'heure actuelle, aucune étude publiée n'a encore porté sur l'utilisation de la biopréservation pour limiter la croissance des bactéries histaminogènes dans le thon. L'objectif de la suite de ce travail a donc été de tester ces 12 bactéries lactiques par challenge-test sur différentes matrices de thon en présence de bactéries productrices d'histamine, artificiellement inoculées ou naturellement présentes.

## **2. Sélection d'une bactérie bioprotectrice par challenge-tests sur du thon**

Dans un premier temps, les douze bactéries lactiques issues du criblage précédent ont été sélectionnées pour des essais par challenge-tests sur produits de la mer.

Plusieurs types de pratique sont mises en œuvre par les professionnels des conserveries. La plupart des procédés, utilisés pour la fabrication de thon en boîte, conduisent à un emboîtement et une appertisation en l'espace de quelques heures qui ne comportent pas d'étapes permettant d'appliquer le procédé de biopréservation. En revanche, certaines pratiques passent par une étape de conditionnement des longes cuites sous-vide pouvant s'associer à une méthode de biopréservation. Le procédé choisi se décompose en plusieurs étapes :

- ✓ Capture puis congélation des thons à bord des navires
- ✓ Décongélation et cuisson
- ✓ Prélèvement des longes et conditionnement sous-vide
- ✓ Congélation
- ✓ Stockage et expédition
- ✓ Décongélation à l'eau ou à l'air
- ✓ Emboitage avec milieu de couverture et stérilisation

La production d'histamine peut avoir lieu lors de plusieurs étapes critiques du procédé telles que la réception de la matière première, la décongélation des longes cuites ou encore les mises en attente avant emboitage. La chair du thon peut alors atteindre des températures avoisinant les 15°C.

Trois challenge-tests successifs ont été réalisés sur du thon cuit afin de sélectionner une bactérie lactique d'intérêt par rapport à ce type de pratique. Dans certains cas, le thon appertisé a été utilisé pour disposer d'une matrice paucimicrobienne la plus proche de la matrice ciblée. Ces challenge-tests ont tous été effectués contre la bactérie histaminogène *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup>, choisie pour deux raisons. Elle a d'une part été récemment découverte isolée sur du thon et impliquée dans des intoxications histaminiques (Emborg *et al.*, 2006); d'autre part, elle est capable de se multiplier et de produire de l'histamine à faible température jusqu'à 0°C/2°C.

### **2.1. Première sélection - Sélection de 4 bactéries lactiques inhibitrices par challenge-test sur du thon cuit**

Douze bactéries lactiques, sélectionnées par criblage sur boîte de Pétri et listées dans le tableau 26, ont été testées face à *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> sur du thon cuit conservé sous-vide à 15°C pendant 72 h.

La concentration initiale de *M. psychrotolerans* dans la chair de thon était de 10 UFC/g. Après 24, 48 et 72 h de conservation à 15°C, la concentration de *M. psychrotolerans* a atteint 2,5, 4 et 8 log UFC/g respectivement.

Les bactéries lactiques ont été inoculées à une concentration variant entre 4,8 et 7,3 log UFC/g selon les souches (pour une concentration souhaitée de l'ordre de 10<sup>6</sup> UFC/g). Après 72 h de conservation, elles ont atteint des valeurs comprises entre 7,2 et 8,9 log UFC/g. En co-culture, la croissance de *M. psychrotolerans* a été inhibée de 1 log UFC/g par *V. fluvialis* CD264, de 1,6 log UFC/g par *L. piscium* et de 2,8 log UFC/g par le ferment BLN. Cependant, après 72 h de stockage, plus aucune inhibition n'a été observée contre *M. psychrotolerans* (Fig. 22 et 23).



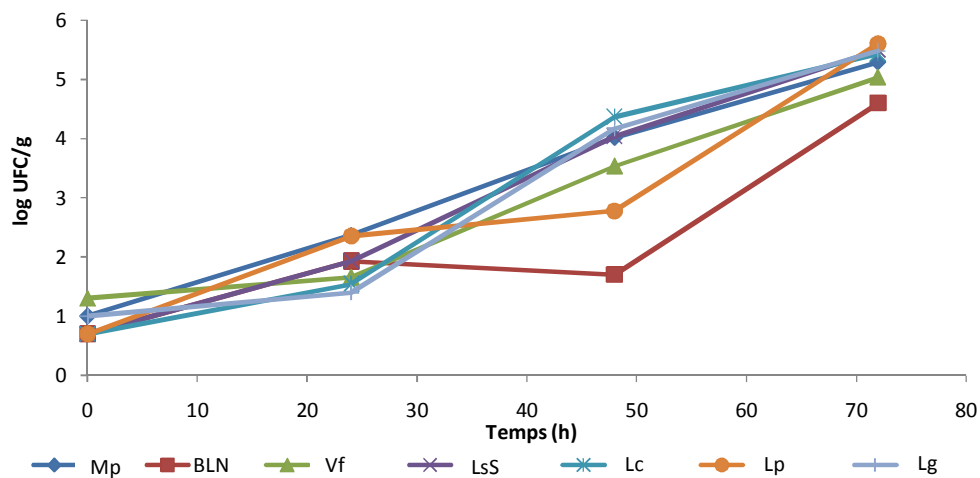


Figure 22 : Challenge-test sur thon appertisé contaminé avec *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> en co-culture avec une bactérie lactique et conservé sous-vide 72 h à 15°C. Croissance de Mp : *M. psychrotolerans* pur ; avec BLN : Ferment BLN ; avec Vf : *V. fluvialis* CD264 ; avec LsS : *L. sakei* EU2202 ; avec Lp : *L. piscium* EU2258 ; avec Lc : *L. curvatus* LHIS2886 et avec Lg : *L. gelidum* LHIS2959

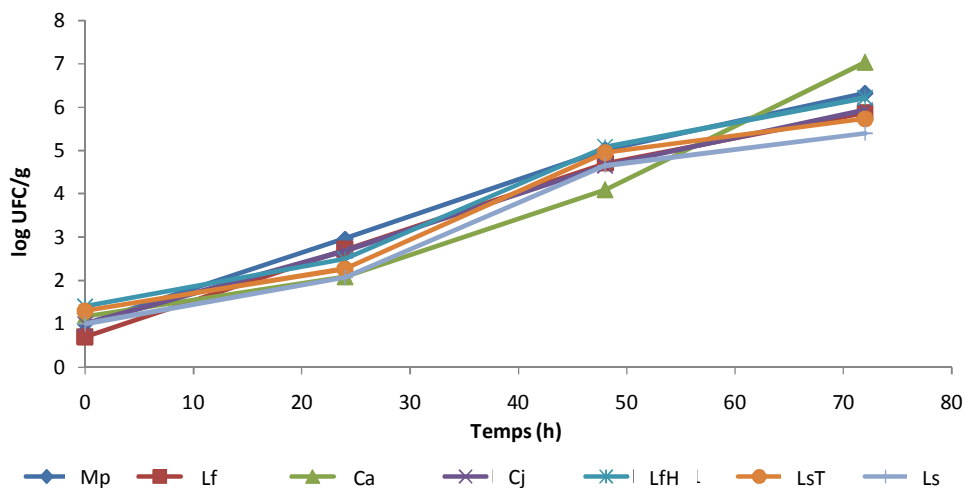


Figure 23 : Challenge-tests sur thon appertisé artificiellement contaminé avec *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> conservé sous-vide 72 h à 15°C. Croissance de Mp : *M. psychrotolerans* pur ; avec Lf : *L. fuchuensis* EU2256 ; avec Ca : *C. alterfunditum* EU2257 ; avec Ls : *L. sakei* LHIS2885 ; avec LfH : *L. fuchuensis* LHIS2996 ; avec Cj : *C. jeotgali* LHIS 2995 et avec LsT : *L. sakei* LHIS3006

La concentration en histamine est présentée dans le tableau 27. Jusqu'à 48 h de conservation, les concentrations en histamine dans les différents lots étaient toutes inférieures à 5 mg/kg. Lors de l'analyse à 48 h, *M. psychrotolerans* en culture pure a produit plus de 500 mg/kg d'histamine. Toutes les bactéries lactiques ont réduit la production d'histamine, qui n'a alors jamais dépassé 100 mg/kg. Après 72 h, il est néanmoins difficile d'évaluer l'effet bioprotecteur puisque toutes les concentrations

étaient supérieures à 500 mg/kg, excepté en présence de *L. sakei* LHS2885 qui a maintenu la concentration dans la chair à 380 mg/kg.

Sur les 12 bactéries lactiques choisies initialement pour ce challenge-test, 4 d'entre-elles ont été sélectionnées pour des challenge-tests plus approfondis. Parmi ces 4 bactéries, le ferment BLN, *V. fluvialis* CD264 et *L. piscium* ont été choisis car elles ont ralenti la croissance de *M. psychrotolerans* dans le thon. Le 4<sup>ème</sup> choix s'est porté sur *L. sakei* LHS2885 car cette souche a inhibé la production d'histamine au-delà de 48 h de stockage.

**Tableau 27 : Concentration en histamine, mesurée par le kit Veratox (Neogen), dans les lots de thon cuitensemencés par *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> en co-culture avec une bactérie lactique inhibitrice à différents temps de stockage**

Bactéries	Code	Concentration en histamine en fonction du temps d'incubation (mg/kg)			
		Après ensemencement	24 h	48 h	72 h
<i>Aucune</i>	CIP109403 <sup>T</sup>	4,7	4,65	> 500	> 500
<i>Carnobacterium jeotgali</i>	LHS2995	4,7	ND	ND	ND
<i>Lactococcus piscium</i>	EU2258	4,7	ND	60	> 500
<i>Vagococcus fluvialis</i>	CD264	4,7	ND	60	> 500
<b>Ferment Biocéane</b>	BLN	4,7	ND	80	> 500
<i>Lactobacillus sakei</i>	EU2202	4,7	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus curvatus</i>	LHS2886	4,6	ND	80	> 500
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	EU2257	4,6	ND	95	> 500
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	EU2256	4,6	ND	92	> 500
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	LHS2996	4,6	ND	80	> 500
<i>Leuconostoc gelidum</i>	LHS2959	4,6	ND	100	> 500
<i>Lactobacillus sakei</i>	LHS2885	4,6	ND	80	380
<i>Lactobacillus sakei</i>	LHS2885	4,6	ND	80	> 500

ND : Non déterminée

## 2.2. Deuxième sélection - Challenge-test approfondi sur une sélection de 4 bactéries lactiques inhibitrices

Dans cette deuxième sélection, l'effet des 4 bactéries lactiques choisies précédemment a été testé en duplicat contre *M. psychrotolerans*. Afin de se rapprocher des pratiques industrielles, les propriétés anti-microbiennes de *V. fluvialis* (CD264), *L. piscium* (EU2258), *L. sakei* (LHS2885) et du ferment BLN ont été testées sur du thon cuit ayant subi une étape de congélation de 48 h à -20°C, suivi de 8 jours d'incubation à 15°C.

Le jour de l'inoculation, *M. psychrotolerans* était à 8,0 UFC/g ( $\pm 0.6$ ). Suite à l'étape de congélation, sa concentration est descendue en dessous du seuil de détection (5 UFC/g). La reprise de croissance de *M. psychrotolerans* est ensuite assez rapide puisqu'elle atteint 8,4 log UFC/g ( $\pm 0,5$ ) en 4 jours (fig. 24).

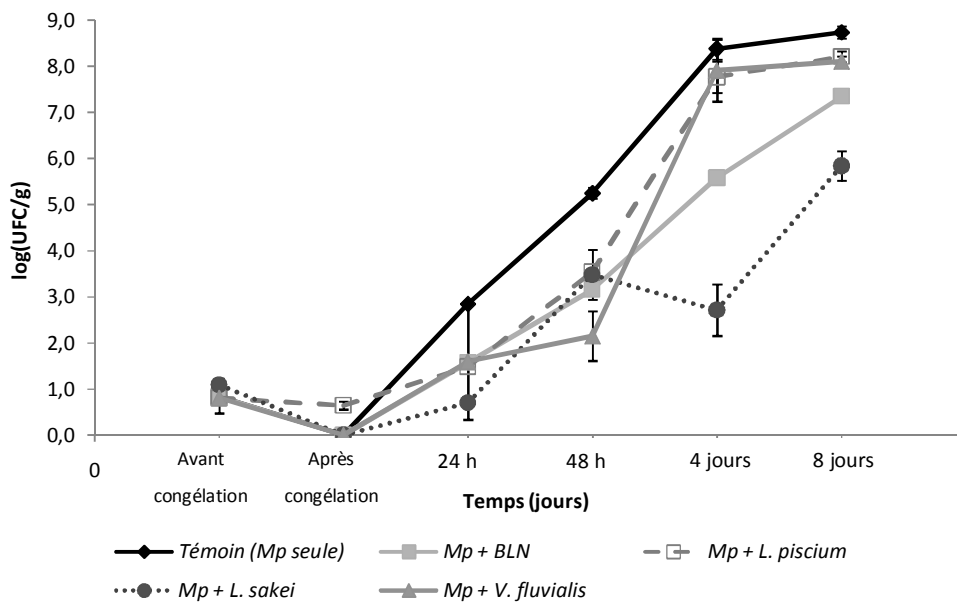


Figure 24 : Croissance de *M. psychrotolerans* seul ou en présence d'une bactérie lactique dans du thon cuit conservé à 15°C pendant 8 jours : *L. piscium* EU2258, *V. fluvialis* CD264, *L. sakei* LHIS2885 et le ferment BLN. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types

L'ensemencement initial des bactéries lactiques sur la chair de thon en co-culture avec *M. psychrotolerans* a été très variable (fig. 25) par rapport à la concentration souhaitée de  $10^6$  UFC/g. : 5,1 log UFC/g pour *V. fluvialis* ( $\pm 0,1$ ), 6,4 ( $\pm$  ND) log UFC/g pour *L. piscium*, 6,7 ( $\pm 0,2$ ) log UFC/g pour le ferment BLN et 7,6 ( $\pm 0,1$ ) log UFC/g pour *L. sakei*.

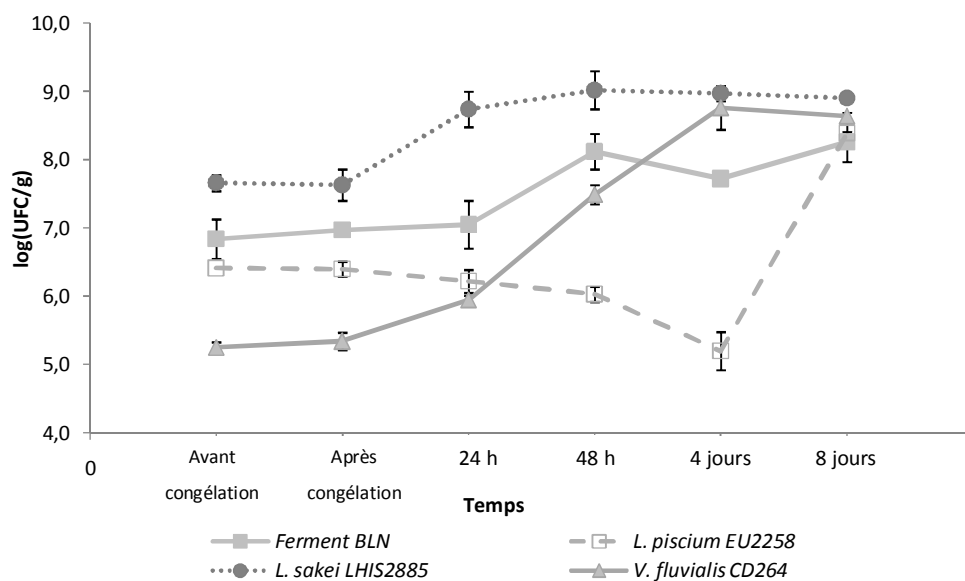


Figure 25 : Croissance des 4 bactéries lactiques en fonction du temps dans le thon cuit artificiellement contaminé par *M. psychrotolerans* incubé 8 jours à 15°C après une étape de congélation. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types

Les bactéries lactiques se sont bien implantées dans la matrice, tout en résistant parfaitement à l'étape de congélation. Aucune baisse du niveau de population n'a été observée à cette étape. Durant les 8 jours de stockage, les bactéries lactiques se sont bien développées, excepté *L. piscium* qui a chuté à 5 log UFC/g à 4 jours pour finalement remonter à 8 log UFC/g à 8 jours.

Dans les lots en co-culture, *M. psychrotolerans* a vu sa croissance réduite de 1 à 2 log UFC/g après 24 et 48 heures de co-culture avec l'ensemble des bactéries lactiques. Après 4 jours, l'inhibition est restée effective uniquement en présence du ferment BLN et de *L. sakei* qui ont réduit respectivement de 3 et 5 log UFC/g le niveau de population de la bactérie histaminogène après 4 jours de stockage (Fig. 24).

Les concentrations en histamine dans la chair, mesurées par la méthode HPLC de référence, sont présentées dans le tableau 28. Avant congélation, chaque sachet de thon cuit contenait moins de 50 mg/kg d'histamine. Le taux d'histamine est resté constant après décongélation, et après 24 et 48 h à 15°C (< 50 mg/kg).

La quantité d'histamine a fortement évolué après 4 jours de stockage, où elle a atteint 3600 ( $\pm$  44) mg/kg avec *M. psychrotolerans* seul. Cette forte production d'histamine a été maîtrisée par 2

bactéries lactiques, le ferment BLN et *L. sakei* LHS2885 avec des teneurs respectives de 209 ( $\pm$  15) et 38 ( $\pm$  3) mg/kg.

**Tableau 28 : Mesure de la concentration en histamine dans le thon par HPLC au cours du stockage du thon cuit à 15°C en présence de *M. psychrotolerans* et d'une des 4 bactéries lactiques. Les écart-types sont présentés entre parenthèses.**

Lot analysé	Concentration en histamine dans les produits en mg/kg au cours du temps					
	Avant congélation	Après congélation	24 h	48 h	4 jours	8 jours
<i>M. psychrotolerans</i>	45 ( $\pm$ 17)	18 ( $\pm$ 18)	13 ( $\pm$ 3)	23 ( $\pm$ 3)	3603 ( $\pm$ 44)	8900 ( $\pm$ 1768)
<i>M. psychrotolerans</i> + BLN	23 ( $\pm$ 4)	13 ( $\pm$ 4)	15 ( $\pm$ 0)	18 ( $\pm$ 4)	209 ( $\pm$ 15)	3650 ( $\pm$ 2190)
<i>M. psychrotolerans</i> + <i>Lc. piscium</i> EU2258	13 ( $\pm$ 3)	16 ( $\pm$ 9)	15 ( $\pm$ 7)	15 ( $\pm$ 0)	1279 ( $\pm$ 233)	7425 ( $\pm$ 1096)
<i>M. psychrotolerans</i> + <i>L. sakei</i> LHS2885	23 ( $\pm$ 3)	15 ( $\pm$ 14)	23 ( $\pm$ 18)	8 ( $\pm$ 3)	38 ( $\pm$ 3)	245 ( $\pm$ 113)
<i>M. psychrotolerans</i> + <i>V. fluvialis</i> CD264	25 ( $\pm$ 7)	5 ( $\pm$ 0)	23 ( $\pm$ 7)	20 ( $\pm$ 14)	926 ( $\pm$ 285)	8975 ( $\pm$ 389)

Enfin, après 8 jours d'incubation, seul *L. sakei* a permis de maintenir le taux d'histamine à 245 ( $\pm$  13) mg/kg, alors qu'en présence de *M. psychrotolerans* seule, 8900 ( $\pm$  1768) mg/kg d'histamine ont été quantifiées. Les deux autres bactéries lactiques, *V. fluvialis* et *L. piscium*, ont faiblement réduit la production d'histamine à 4 et 8 jours et n'ont donc pas permis de maintenir les produits à des teneurs inférieures à 200 mg/kg (seuil de rejet Européen). Il en a été de même pour le ferment BLN, pour lequel 3650 ( $\pm$  2150) mg/kg d'histamine ont été mesurés lors de l'analyse finale à 8 jours.

### 2.3. Acceptabilité sensorielle des bactéries lactiques et étude de l'altération par *M. psychrotolerans* sur du thon cuit

Afin de déterminer si l'une des 4 bactéries lactiques est utilisable pour maîtriser la formation d'histamine sur des produits à base de thon, leur impact sur les propriétés sensorielles de la chair de thon cuit en culture pure ou en co-culture avec *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> a été étudié en duplicat. Ces challenge-tests ont été réalisés sur 10 lots : un lot non inoculé, un lot témoin avec *M. psychrotolerans* en culture pure, ainsi qu'un lot pour chaque bactérie lactique en culture pure et en co-culture avec *M. psychrotolerans*.

Les taux d'inoculation et les conditions de stockage étaient identiques au challenge-test précédent.

Lors de cette expérience, les dénombrements de *M. psychrotolerans* et des bactéries lactiques ont été effectués jusqu'à 8 jours de stockage. Néanmoins, ces données ne seront pas présentées. En effet, suite à une contamination des tubes de dilutions de tryptone-sel, les énumérations sur boîtes ont été faussées. La concentration en histamine a cependant été suivie sans problème, après 4 et 8 jours d'incubation par la méthode HPLC de référence. Le dosage de l'histamine et des autres amines biogènes reste un bon indicateur de la qualité microbiologique de nos produits (Duflos *et al.*, 1999).

L'analyse sensorielle a été effectuée à 4 et 8 jours de stockage par le jury interne d'Ifremer qui a une longue expérience des produits de la mer.

Le thon cuit non inoculé a peu évolué au niveau sensoriel entre 4 et 8 jours. Ce produit a été cuit puis congelé (Tableau 29), ce qui explique sa bonne stabilité. Les notes sensorielles ont été de 1 et 1,7 à 4 et 8 jours respectivement.

**Tableau 29 : Notes sensorielles et caractérisation par attributs dans les lots témoins et bactéries lactiques à 4 et 8 jours de stockage à 15°C. BLN : Ferment BLN, Lp : *Lactococcus piscium* EU2258, Ls : *Lactobacillus sakei* LHIS2885, Vf : *Vagococcus fluvialis* CD264, Mp : *Morganella psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup>**

Stockage	Témoin	BLN	Lp	Ls	Vf
<b>4 jours</b>	<b>1</b> thon, (rance, grillée)	<b>2.3</b> thon, acide, soufrée	<b>2.3</b> thon, pyrrolidine	<b>2.9</b> thon, aigre, acide, soufrée	<b>1.6</b> thon, marine, beurre, fruitée
<b>8 jours</b>	<b>1.7</b> thon, acide (grillée)	<b>5.2*</b> soufrée, aigre	<b>3.9*</b> thon, aigre, soufrée, acide, (pyrrolidine)	<b>2.1</b> thon, acide, aigre	<b>1.5</b> thon, marin

Différence significative: \* ( $p < 0.05$ )

De plus, une caractérisation sensorielle des produits par attribut a été effectuée. Sur les 22 descripteurs d'odeurs proposés, le critère "aminé/urine" a été supprimé car très rarement cité. Des regroupements de fréquence de citations ont été effectués pour les 4 premiers descripteurs représentés par :

- ✓ poisson gras/thon
- ✓ rance/végétal
- ✓ aigre/fermenté avec pied/fromage devenant aigre/fromage
- ✓ chou/gaz avec H<sub>2</sub>S devenant soufrée

Les juges ayant cités de 1 à 5 descripteurs d'odeurs par produit, le nombre de citations n'est pas toujours le même pour chaque échantillon. Aussi, la fréquence de citation, pour un produit et un critère d'odeur donné, a été calculée en prenant en compte le nombre de citation total pour le produit. Pour le témoin non inoculé, 70 % et 50 % des descripteurs d'odeurs, respectivement à 4 et 8

jours, ont été associés à poisson gras/thon (Fig. 26). Pour les lots inoculés avec les bactéries lactiques pures, les notes sont toutes restées inférieures à 6 (défini comme le seuil de rejet) après 4 et 8 jours (Tableau 29). Le ferment BLN et *L. piscium* sont les plus malodorantes avec des notes respectives de 5,2 et 3,9 après 8 jours de stockage. Ces notes résultent d'odeurs soufrées et aigres qui se dégagent de la chair et représentent alors de 40% à 70% des fréquences de descripteurs. *L. sakei* a présenté des notes comprises entre 2,1 et 2,9, caractérisés par des odeurs légèrement acide (40 % thon et 25 % acide à 8 jours). Enfin, le lot avec *V. fluvialis* n'a présenté aucun changement sensoriel et a conservé ses caractéristiques « thon » et « marin » à des fréquences de 52% et 13% respectivement.

En plus de l'acceptabilité sensorielle des bactéries lactiques, il nous a semblé intéressant d'évaluer l'effet des bactéries lactiques sur l'altération provoqué par *M. psychrotolerans* (Tableau 30). En effet, le lot de thon cuit artificiellement contaminé par *M. psychrotolerans* a été fortement altéré au niveau sensoriel dès 4 jours de stockage. Une note de 6 avec des odeurs soufrées et aigres ont ainsi été relevées par le jury (Fig. 27).

En co-culture, le lot BLN + Mp a présenté dès 4 jours, une note de 4 avec des odeurs aigres et soufrées qui se sont intensifiées à 8 jours. Ces descripteurs sont caractéristiques de *M. psychrotolerans* sur thon cuit. Des observations similaires ont été effectuées pour le lot *L. piscium* + Mp avec des notes plus importantes de 5,4 et 7,2 à 4 et 8 jours. Néanmoins, *L. sakei* a permis de réduire significativement l'altération avec des notes de 3,2 et 2,3 à 4 et 8 jours. Une légère odeur soufrée, représentative de 20 % des descripteurs, a été retrouvée à 4 jours. Elle s'est finalement estompée à 8 jours pour laisser place à des notes poisson gras/thon légèrement acide (Fig. 27). Enfin, *V. fluvialis* a permis de réduire fortement l'altération du thon à 4 jours, mais après 8 jours le lot a présenté les mêmes caractéristiques que le lot inoculé avec *M. psychrotolerans*.

**Tableau 30 : Notes sensorielles et caractérisation par attributs dans les lots du challenge-test. BLN : Ferment BLN, Lp : *Lactococcus piscium* EU2258, Ls : *Lactobacillus sakei* LHIS2885, Vf : *Vagococcus fluvialis* CD264, Mp : *Morganella psychrotolerans* CIP 109403<sup>†</sup>**

Stockage	Mp	BLN + Mp	Lp +Mp	Ls + Mp	Vf +Mp
4 jours	6 soufrée, aigre	4.0* thon, aigre, soufrée	5.4 soufrée, (aigre, rance)	3.2* soufrée	1.9* thon, beurre (laiteuse, acide, aigre)
8 jours	6 soufrée, aigre, acide	6.6 soufrée, aigre	7.2 soufrée, aigre (acide, rance)	2.3* thon, acide (aigre)	6.5 soufrée, (aigre, acide)

Différence significative: \* (p < 0.05)

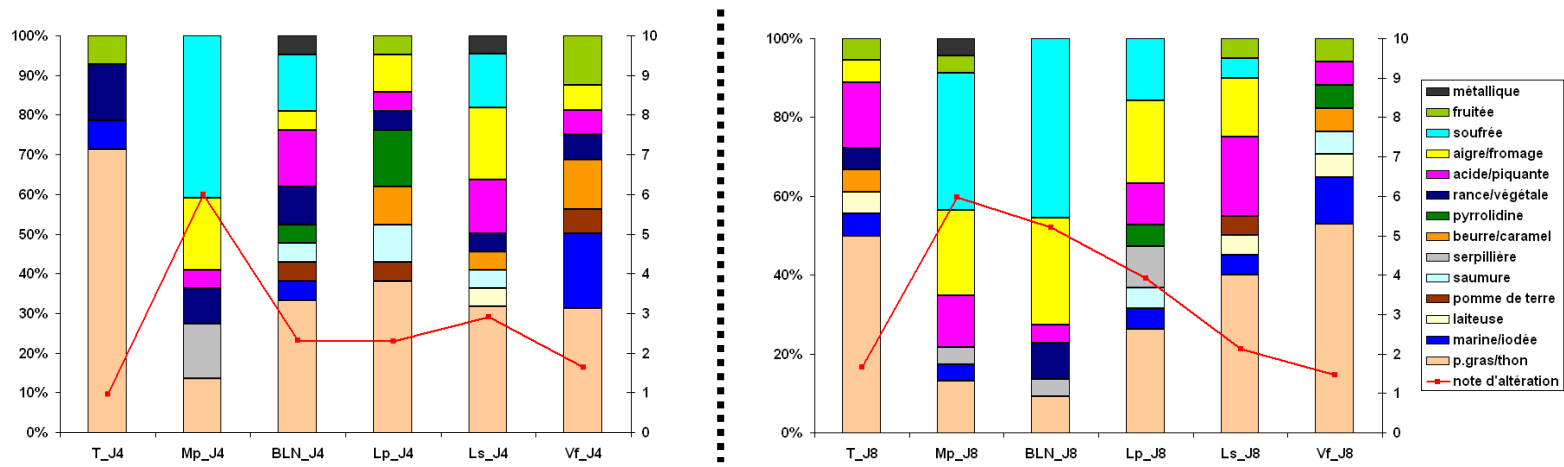


Figure 26 : Fréquence des odeurs citées à 4 et 8 jours pour les souches en culture pure

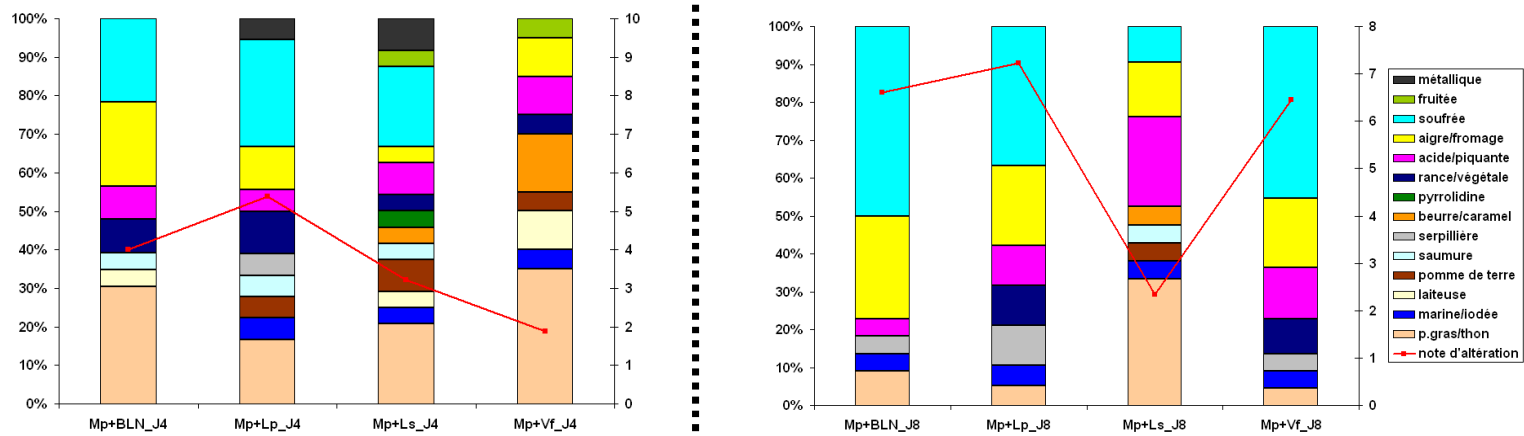


Figure 27 : Fréquence des odeurs citées à 4 et 8 jours pour les souches en co-culture avec *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup>



La production d'histamine qui a été suivie à 4 et 8 jours de stockage, est présentée dans le tableau 31. Les mesures ont été effectuées par la méthode HPLC de référence de l'ANSES.

**Tableau 31: Mesure de la production d'histamine à 4 et 8 jours de stockage dans les 8 lots de thon cuit. Les écart-types sont représentés entre parenthèses.**

Lot analysé	Concentration en histamine dans les produits en mg/kg au cours du temps (mg/kg)	
	4 jours	8 jours
Témoin	5 (± 3)	2 (± 1)
<i>M. psychrotolerans</i>	3903 (± 549)	>5000 (NC)
BLN	4 (± 3)	Ech 1 : 4000 Ech 2 : 200
<i>Lc. piscium</i> EU2258	458 (± 110)	18 (± 12)
<i>L. sakei</i> LHS2885	2 (± 2)	1 (± 1)
<i>V. fluvialis</i> CD264	3 (± 1)	1 (± 1)
Mp + BLN	2136 (± 170)	700 (± 565)
Mp + <i>Lc. piscium</i> EU2258	2700 (± 1415)	7050 (± 2758)
Mp + <i>L. sakei</i> LHS2885	15 (± 1)	673 (± 463)
Mp + <i>V. fluvialis</i> CD264	920 (± 350)	5150 (± 70)

Le lot témoin n'a présenté aucune production d'histamine, ceci peut s'expliquer par l'absence de croissance bactérienne dans ce lot. Dans le lot artificiellement contaminé par *M. psychrotolerans*, la synthèse d'histamine a été très importante dès 4 jours de stockage, après lesquels 3903 (± 548) mg/kg ont été quantifiés. Cette production s'est poursuivie jusqu'à 8 jours avec des teneurs supérieures à 5000 mg/kg.

La plupart des bactéries lactiques en culture pure n'ont pas produit d'histamine au cours de la conservation. Cependant, à 4 jours de stockage, le lot avec *L. piscium* a présenté 458 (± 109) mg/kg d'histamine, alors qu'à 8 jours de stockage uniquement 18 (± 11) mg/kg d'histamine ont été mesurées. Avec le ferment BLN, qui à 4 jours n'a présenté aucune production d'histamine, des teneurs de 4000 et 200 mg/kg ont été quantifiés dans le duplicat à 8 jours de conservation. Il est difficile d'identifier la source de production d'histamine par rapport au lot non inoculé qui n'a présenté aucune synthèse d'histamine. Ces valeurs sont peut-être liées à un mauvais nettoyage de la colonne après le passage d'un échantillon fortement concentré. Les autres souches *V. fluvialis* et *L. sakei*, qui ont présenté le meilleur profil organoleptique, n'ont pas synthétisé d'histamine.

Dans les lots en co-culture, les productions d'histamine sont similaires aux résultats précédents. En effet, *L. sakei* est la souche la plus inhibitrice avec seulement 15 et 673 mg/kg d'histamine à 4 et 8 jours d'incubation. A 4 jours, les autres bactéries lactiques n'ont que très faiblement ralenti la

synthèse d'histamine. Ce n'est qu'à 8 jours que le ferment BLN a présenté une forte inhibition, où seulement 700 mg/kg d'histamine ont été quantifiés alors que le lot *M. psychrotolerans* seule a alors atteint plus de 5000 mg/kg.

#### 2.4. Bilan et discussion

Actuellement, la production d'histamine par des bactéries histaminogènes dans des produits riches en histidine libre est prévenue par l'application stricte des normes de température et par le respect des bonnes pratiques d'hygiène. La mise en place d'un plan HACCP dans certaines usines a en effet permis d'améliorer la qualité microbiologique des produits (Hwang *et al.*, 2011).

Une seule alternative est pour l'instant disponible pour réduire la production d'histamine sans modifier les propriétés organoleptiques du produit. Cette alternative s'appuie sur l'utilisation d'un conditionnement sous atmosphère protectrice composé de 40 % CO<sub>2</sub> et 60 % O<sub>2</sub> (Emborg *et al.*, 2005).

Des études rapportent l'ajout de bactérie à Gram positif tels que *Staphylococcus* ou *Tetragenococcus* permettant de dégrader l'histamine formée durant un processus de fermentation pour la fabrication de sauces de poissons (Tapingkae *et al.*, 2010). Toutefois, même si l'histamine est détruite, les bactéries histaminogènes, pour certaines altérantes, ont probablement atteint des concentrations supérieures à 5 log UFC/g puisqu'une concentration d'au minimum 4,5 log UFC/g est nécessaire pour voir apparaître une production d'histamine (Jørgensen *et al.*, 2000b). Une méthode permettant de ralentir la croissance des bactéries histaminogènes et de limiter la production d'histamine peut constituer un procédé additionnel pouvant permettre de limiter le risque d'intoxication histaminique ainsi que l'altération des denrées

Aucune étude publiée de biopréservation sur du thon cuit artificiellement contaminé par *M. psychrotolerans* n'a été effectuée à ce jour. L'étude de Katikou *et al.* (2007), réalisée sur des truites naturellement contaminées et biopréservées par 2 souches de *L. sakei* peut s'en rapprocher puisqu'elle a permis d'inhiber de 2 log UFC/g la croissance de bactéries histaminogènes mais sans néanmoins inhiber la production d'histamine. De plus, tout récemment, un ferment industriel appelé LLO proposé par Biocéane, a permis de maintenir la production d'histamine en dessous de 100 mg/kg après 10 jours de stockage à 5°C sur du thon frais.

Notre étude, faisant partie intégrante du projet National Histabio (FranceAgriMer), qui a porté sur l'étude la faisabilité de l'inhibition de l'histamine dans de la chair de thon destinée à la conserve, a

orienté nos recherches sur une matrice à base de thon cuit. Sur les 12 bactéries lactiques sélectionnées par criblage selon la méthode en double-couche de Matamoros *et al.* (2008), ces premiers challenge-tests ont servi à identifier une bactérie lactique applicable sur du thon, apte à respecter les principes de la méthode de biopréservation.

Notre choix s'est porté sur la bactérie lactique *L. sakei* LHS2885, isolée de sardine fraîche emballée sous atmosphère modifiée (50% N<sub>2</sub> / 50 % CO<sub>2</sub>). La bactérie *L. sakei* LHS2885 a été identifiée par séquençage complet de son ADNr 16S et par amplification du gène *kata* qui permet de différencier l'espèce *L. sakei* des autres *Lactobacillus* et plus particulièrement de *L. curvatus* (Ammor *et al.*, 2005; Najjari *et al.*, 2008). La physiologie, le métabolisme et la production de différentes bactériocines par *L. sakei* ont été décrits dans l'article de Champomier-Vergès *et al.* (2001).

Cette souche a permis de ralentir la production d'histamine par *M. psychrotolerans* après 72 h de stockage à 15°C. Elle a révélé un fort potentiel d'inhibition contre *M. psychrotolerans* lors du second challenge-test, où une inhibition de 5 log UFC/g de *M. psychrotolerans* à 4 jours de stockage a été observée. Parmi les 3 autres bactéries lactiques testées, le ferment BLN a également permis de ralentir la croissance de 3 log UFC/g de *M. psychrotolerans* tout en limitant dans une moindre mesure la production d'histamine. De plus, lors de l'analyse sensorielle, les caractéristiques organoleptiques des échantillons ensemencés avec *L. sakei* sont restées satisfaisantes. Quelques notes acides ont été relevées par le jury et sont probablement liées à la production d'acide lactique. L'odeur souffrée ressentie à 4 jours dans la co-culture, s'est estompé à 8 jours de stockage. Cette bactérie lactique semble donc la plus adaptée pour cette technique de biopréservation par rapport aux trois autres souches de bactéries lactiques testées et elle a été retenue pour les études ultérieures visant à évaluer son efficacité vis à vis d'autres bactéries productrices d'histamine mésophiles ou psychrotolérantes et à différentes températures de conservation pour envisager une future application en produits.

### **3. Recherche d'activités antimicrobiennes de *L. sakei* LHS2885 contre diverses bactéries histaminogènes dans 3 matrices différentes à base de thon**

L'effet bioprotecteur de *L. sakei* LHS2885 a été démontré contre *M. psychrotolerans* sur du thon cuit conservé sous-vide à 15°C.

En dehors de *M. psychrotolerans*, l'histamine est produite par différentes espèces bactériennes. Parmi celles-ci, *M. morgani*, *P. damsela* et *P. phosphoreum* ont été isolés d'échantillons responsables d'intoxications histaminiques. Les propriétés inhibitrices de *L. sakei* LHS2885 ont donc été testées face à ces espèces productrices d'histamine sur du thon cuit mais aussi sur du thon fumé.

Enfin, l'effet de la température de conservation a été étudié, avec des tests de co-culture de *M. psychrotolerans* et *L. sakei* LHS2885 sur du thon cuit conservé à 4°C.

### 3.1. Propriétés inhibitrices de *L. sakei* LHS2885 contre différentes bactéries histaminogènes

#### 3.1.1. Propriétés inhibitrices contre *M. morgani* CIP A231<sup>T</sup>

Les propriétés bioprotectrices de *L. sakei* LHS 2885 ont été testées face à *M. morgani* CIP A231<sup>T</sup> sur du thon appertisé conditionné sous-vide. Ce produit a été congelé pendant 48 h après ensemencement, puis incubé à 15°C pendant 7 jours.

*M. morgani* CIP A231<sup>T</sup>, inoculé à 1 log UFC/g avant congélation (concentration souhaitée), n'a pas évolué jusqu'à 48 h de stockage (Fig. 28). A partir de là, sa croissance s'est accélérée pour atteindre 6,57 log UFC/g à 4 jours, concentration à laquelle il s'est stabilisé jusqu'à 7 jours. *L. sakei* LHS 2885 inoculé à 7,34 log UFC/g, a atteint sa croissance maximale après 4 jours de stockage et s'est stabilisé jusqu'à 7 jours à 8,6 log UFC/g, à l'identique des challenge-tests contre *M. psychrotolerans*.

En co-culture avec *L. sakei* (Fig. 28), la croissance de *M. morgani* a été fortement ralentie. Après l'étape de congélation, *M. morgani* se trouvait en dessous du seuil de dénombrement, puis son développement a été significativement ralenti de 3,1 log UFC/g à 4 jours et 2,6 log UFC/g à 7 jours.

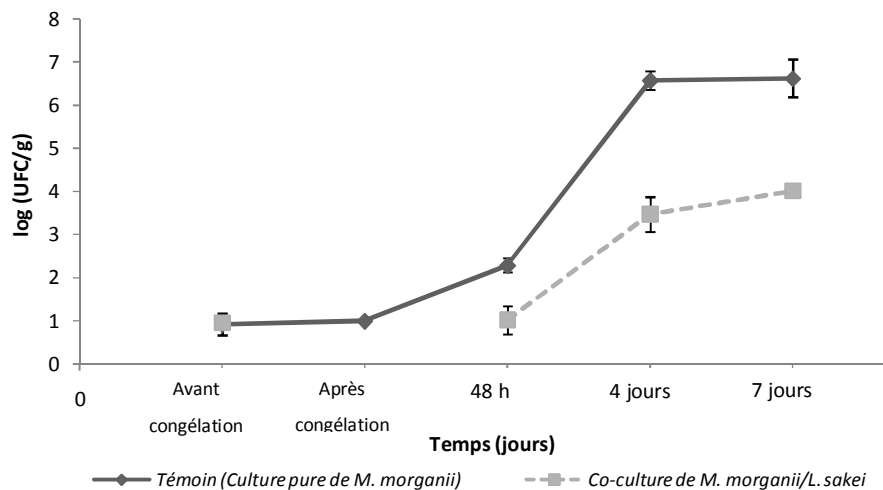


Figure 28 : Cinétique de croissance de *M. morgani* CIP A231 sur du thon en boîte en culture pure ou en co-culture avec *L. sakei* LHS2885 durant 7 jours de stockage à 15°C, après une étape initiale de congélation. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types

Au niveau biochimique, le pH a évolué différemment entre la matrice en culture pure et celle en co-culture. En effet en culture pure, d'un pH initial de 5,9, la matrice a atteint un pH de 6,3 après 7 jours. A l'inverse, le pH de la matrice en co-culture a diminué en dessous de son seuil initial de 5,9 pour atteindre 5,7 à 7 jours. Finalement, une inhibition de la production d'histamine a été observée dans la matrice en co-culture (Tableau 32).

Après 2 jours de stockage, la concentration en histamine dans le thon était toujours inférieure à 10 mg/kg. En culture pure, une forte production d'histamine de 1709 mg/kg, est apparue après 4 jours de stockage. Elle s'est poursuivie jusqu'à 7 jours. Cependant, en co-culture, la production d'histamine a été ralentie. Elle est restée à une concentration 100 fois inférieure avec seulement 11 mg/kg et 229 mg/kg d'histamine après 4 jours et 7 jours de stockage respectivement.

**Tableau 32: Concentration en histamine en mg/kg dans la chair de thon artificiellement contaminée par *M. morganii* CIP A231 en culture pure ou en co-culture avec *L. sakei* LHIS2885, après une étape de congélation et 7 jours de stockage à 15°C**

Lots	Moyenne des concentrations en histamine dans les produits en mg/kg				
	Avant congélation	Après congélation	2 jours	4 jours	7 jours
<i>M. morganii</i>	2 (± 2)	6 (± 2)	5 (± 2)	1709 (± 2)	2954 (± 2)
<i>M. morganii</i> + <i>L. sakei</i> LHIS2885	2 (± 2)	4 (± 2)	2 (± 2)	11 (± 2)*	229 (± 2)*

\* Données significativement différentes (p < 0.05)

### 3.1.2. Propriétés inhibitrices de *L. sakei* LHIS2885 contre 2 espèces bactériennes du genre *Photobacterium*

La bactérie lactique *L. sakei* LHIS2885 a démontré des propriétés inhibitrices contre les deux espèces du genre *Morganella* sur du thon cuit ou appertisé stocké à 15°C. Deux espèces du genre *Photobacterium*, *P. phosphoreum* et *P. damsela*, sont aussi fortement productrices d'histamine. Elles ont, parmi d'autres, été responsables d'intoxications histaminiques (Dalgaard *et al.*, 2006). Dans cette étude, le potentiel d'inhibition de *L. sakei* LHIS2885 a donc été testé contre *P. phosphoreum* CCUG 16288 et *P. damsela* CIP 102761<sup>T</sup>, inoculés séparément sur du thon en boîte stocké à 15°C pendant 8 jours. A la différence des autres challenge-tests, aucune étape de congélation n'a été effectuée.

Les cinétiques de croissance de *P. phosphoreum* et *P. damsela* en culture pure ou en co-culture avec *L. sakei* dans la chair de thon sont présentées sur les figures 29 et 30. Le jour de la contamination, *P. phosphoreum* a été inoculé à 3,5 log UFC/g. Son développement a été très rapide dans la matrice. Cette souche a atteint sa concentration maximale de 8 log UFC/g en 2 jours, puis a finalement

diminué à 6 log UFC/g à 7 jours. *P. damselae* qui a été inoculé à 3,4 log UFC/g, a aussi suivi une croissance similaire de 8,4 log UFC/g dans la matrice en 2 jours et 6,3 log UFC/g à 7 jours. La bactérie bioprotectrice, *L. sakei* a étéensemencée entre 6,7 et 6,8 log UFC/g. Aucun changement de croissance n'a été observé par rapport au challenge-test précédent. Sa concentration était de 8,5 log UFC/g à 2 jours et ce niveau s'est maintenu jusqu'à 7 jours de stockage.

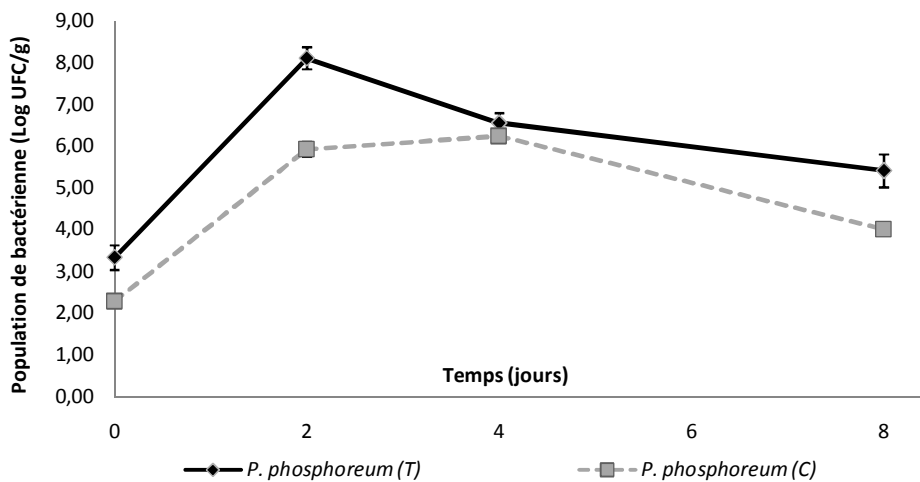


Figure 29 : Suivi de la croissance de *P. phosphoreum* CCUG 16288 en culture pure (T) et en co-culture (C) avec *L. sakei* LHIS2885 sur du thon en boîte stocké sous-vide à 15°C pendant 8 jours

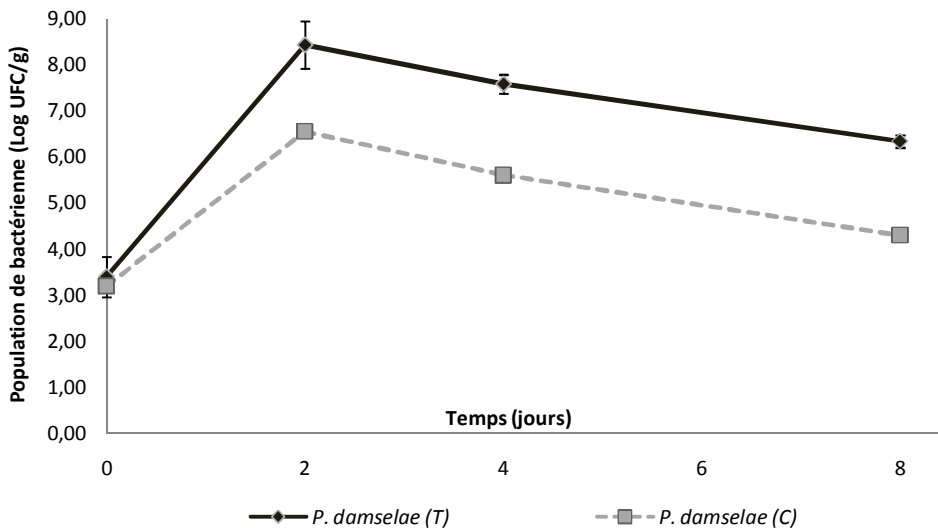


Figure 30 : Évolution de *P. damselae* CIP 102761<sup>T</sup> en culture pure (T) et en co-culture (C) avec *L. sakei* LHIS 2885 sur du thon appertisé conservé sous-vide à 15°C

En co-culture avec *L. sakei*, les croissances de *P. phosphoreum* et *P. damsela*e ont été significativement ralenties ( $p < 0.05$ ). En effet, durant toute la durée de conservation, ces 2 bactéries avaient des concentrations inférieures de 2 log UFC/g par rapport aux cultures pures.

Malgré cela, la production d'histamine n'a pas été suffisamment ralentie (Tableau 33). D'une part, les concentrations en histamine dans notre produit initial se sont avérées importantes avec une moyenne de 215 mg/kg, ce qui est déjà supérieure au seuil autorisé par la réglementation européenne.

**Tableau 33 : Concentration en histamine en mg/kg, dosée avec le kit Veratox, dans la chair de thon artificiellement contaminée par *P. phosphoreum* CCUG 16288 ou *P. damsela*e CIP 102761 en culture pure ou en co-culture avec *L. sakei* LHS2885, après 7 jours de stockage à 15°C.**

Lots	Moyenne des concentrations en histamine dans les produits en mg/kg			
	Jour de l'inoculation	2 jours	4 jours	7 jours
<i>P. phosphoreum</i>	215	> 5000	> 5000	> 5000
<i>P. phosphoreum</i> + <i>L. sakei</i>	215	1091	3739	3545
<i>P. damsela</i> e	215	> 5000	> 5000	> 5000
<i>P. damsela</i> e + <i>L. sakei</i>	215	> 5000	> 5000	> 5000

D'autre part, après 2 jours de stockage, les 2 lots inoculés avec les souches de *Photobacterium* en culture pure ont présenté des concentrations en histamine supérieures à 5000 mg/kg, ce qui est bien plus important que lors de nos essais avec le genre *Morganella*.

Une inhibition assez faible a cependant été retrouvée sur les lots en co-culture avec *L. sakei* et *P. phosphoreum*. En l'espace de 2 jours, la concentration en histamine, alors à 5000 mg/kg dans le témoin, était de 1091 mg/kg dans le lot en co-culture. Par ailleurs, cette inhibition a aussi été observée à 4 et 8 jours avec 3739 mg/kg et 3545 mg/kg d'histamine. Aucune inhibition n'a été observée en co-culture avec *P. damsela*e. Le pH dans les lots était au jour de l'inoculation entre 5,85 et 5,97. Il a évolué vers des valeurs comprises entre 6,0 et 6,4 après 7 jours.

### **3.2. Propriétés inhibitrices de *L. sakei* LHS2885 contre *M. psychrotolerans* sur du thon cuit conditionné sous-vide à 4°C**

*M. psychrotolerans* est une bactérie psychrophile, capable de produire d'importantes concentrations en histamine dans des produits riche en histidine même à faible température (0 à 4°C). Etudier le potentiel d'inhibition de *L. sakei* LHS2885 à une température de 4°C, était donc important pour vérifier les propriétés anti-histaminogènes à faible température de *L. sakei*, pour une application sur du thon cuit lors du processus de décongélation. Lors de ce challenge-test, les propriétés inhibitrices

de *L. sakei* ont donc été testées contre *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> sur du thon cuit, conditionné sous-vide à 4°C pendant 18 jours.

*M. psychrotolerans* s'est très bien adapté au froid, (Fig. 31). A partir d'un taux d'inoculation souhaité de 1 log UFC/g, la bactérie psychrophile s'est progressivement multipliée jusqu'à 6,8 log UFC/g à 11 jours et 8,5 log UFC/g à 18 jours de stockage. La bactérie *L. sakei* LHS 2885 n'a pas été affectée non plus par la température (Fig. 32), puisqu'à partir d'une concentration initiale souhaitée de 6,5 log UFC/g, 8,9 log UFC/g ont été dénombrés après 11 jours. Cependant, une baisse de sa concentration à 7,5 log UFC/g a été observée au 18<sup>ème</sup> jour de stockage.

Les dénombrements de *M. psychrotolerans* et *L. sakei* en co-culture n'ont présenté aucune différence significative par rapport à leur témoin. C'est la première fois qu'aucune inhibition de la croissance en présence de *L. sakei* LHS 2885 n'est observée.

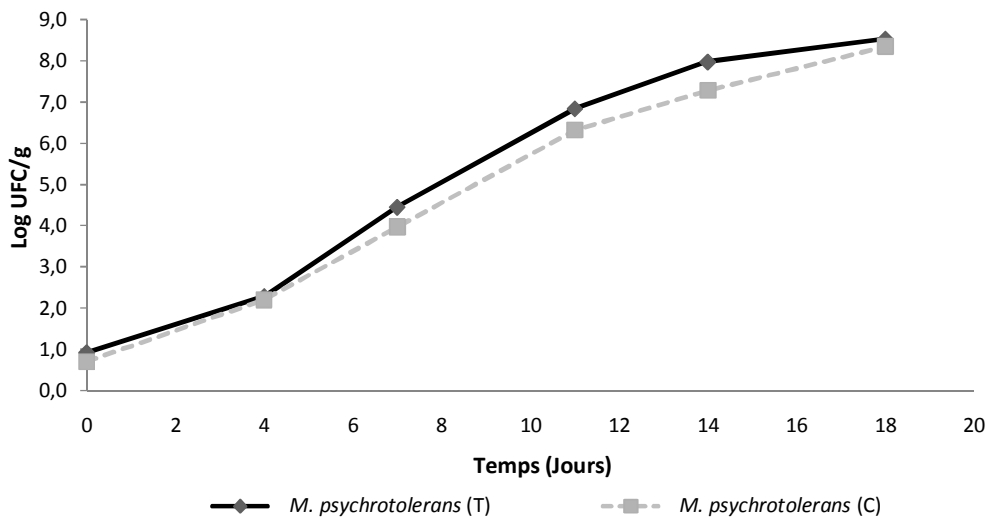


Figure 31 : Croissance de *M. psychrotolerans* en absence (T) ou présence de *L. sakei* LHS2855 (C) à 4°C pendant 18 jours. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types



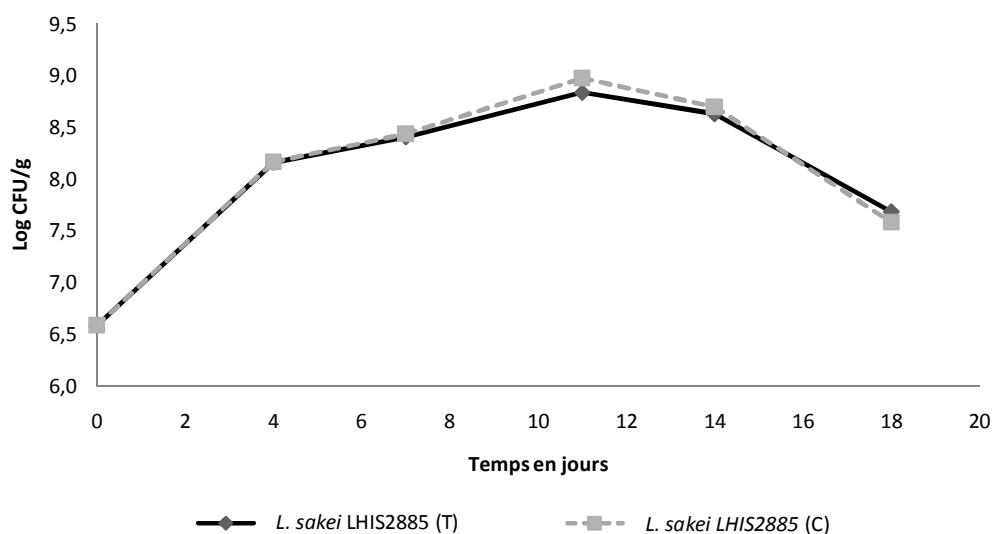


Figure 32 : Croissance de *L. sakei* en absence (T) ou présence de *M. psychrotolerans* (C) à 4°C pendant 18 jours. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types

L'absence d'inhibition n'a cependant pas eu d'impact sur le ralentissement de la synthèse d'histamine (Tableau 34). Tous les lots en co-culture ont présenté des concentrations en histamine inférieures à ceux en culture pure. Ce n'est qu'au 11<sup>ème</sup> jour de stockage qu'une production d'histamine a été relevée. Après 11 jours à 4°C, *M. psychrotolerans* en culture pure a produit 93 (± 32) mg/kg d'histamine, tandis qu'en co-culture, cette bactérie histaminogène n'a produit que 23 (± 6) mg/kg soit une réduction de l'ordre de 75%. Après 14 jours, les teneurs en histamine ont été réduites de 57 % dans le lot en co-culture avec 249 (± 14) mg/kg d'histamine par rapport au lot avec la bactérie histaminogène seule qui était alors à 582 (± 75) mg/kg.

Tableau 34 : Concentration en histamine en mg/kg, dosée par HPLC, dans la chair de thon cuite artificiellement contaminée par *M. psychrotolerans* CIP 109403 en culture pure ou en co-culture avec *L. sakei* LHS2885, après congélation et 14 jours de stockage à 4°C. Les écart-types sont indiqués entre parenthèses

Lots	Moyenne des concentrations en histamine dans les produits en mg/kg					
	Avant congélation	Après congélation	5 jours	7 jours	11 jours	14 jours
<i>M. psychrotolerans</i>	NM <sup>a</sup>	NM <sup>a</sup>	NM <sup>a</sup>	16 (± 14)	93 (± 32)	583 (± 75)
<i>M. psychrotolerans</i> + <i>L. sakei</i>	NM <sup>a</sup>	NM <sup>a</sup>	NM <sup>a</sup>	9 (± 2)	23 (± 6)*	249 (± 14)*

<sup>a</sup> Teneur en histamine non mesurée // \* Valeur significativement différente (p < 0.05)

### 3.3. Propriétés inhibitrices de *L. sakei* LHS2885 sur du thon fumé artificiellement contaminé par des cocktails de bactéries histaminogènes

La biopréservation est une technique qui s'applique idéalement sur les produits frais ou les produits légèrement préservés (produits fumés par exemple). Les propriétés bioprotectrices de *L. sakei* LHS28885, observées auparavant sur thon appertisé et thon cuit, ont été testées contre des cocktails de souches histaminogènes. Deux cocktails différents ont été préparés, un cocktail composé de bactéries mésophiles représentées par *M. morgani* CIP A231<sup>T</sup> et *P. damselae* CIP 102761<sup>T</sup> et un cocktail psychrophile composé de *P. phosphoreum* CCUG 16288 et *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup>. Les challenge-tests ont été réalisés en triplicat sur des tranches de thon fumé (Saumextra) conservées sous-vide à 8°C pendant 4 semaines. En général, l'altération de produits marins fumés est analysée selon le protocole suivant : 1/3 temps à 4°C et 2/3 temps à 8°C. Afin d'accélérer la production d'histamine, une température de 8°C a été fixée pour l'ensemble de l'expérimentation. A notre connaissance, ce challenge-test est le premier réalisé sur thon fumé contre des bactéries histaminogènes.

En tout premier lieu, la flore totale (L&H) et les entérobactéries (VRBG) ont été énumérées sur un lot témoin non inoculé durant toute la durée de l'expérimentation (Fig. 33).

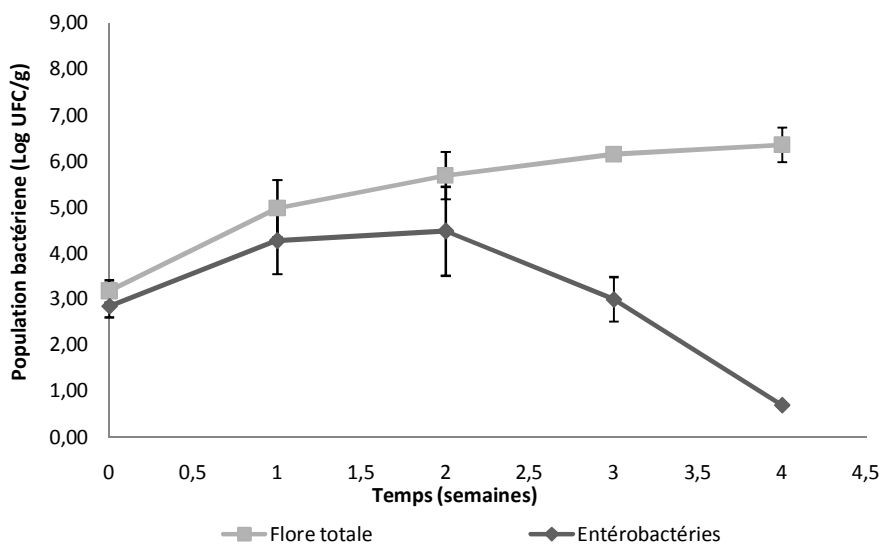


Figure 33 : Cinétique de croissance de la flore totale (L&H) et des entérobactéries (VRBG) sur des tranches de thon fumé conservées sous-vide pendant 4 semaines à 8°C. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types

Les tranches de thon fumé, commercialisées congelées, ont été décongelées en une nuit à 4°C. Suite à cette étape, la flore totale et les entérobactéries étaient respectivement de 3,2 log et de 2,8 log UFC/g. La flore totale a progressivement augmenté durant les 4 semaines de stockage pour atteindre au final 6,3 log UFC/g. Parallèlement, les entérobactéries ont atteint leur concentration maximale de 4,5 log UFC/g à 2 semaines, puis ont progressivement diminué jusqu'à devenir indénombrable à 4 semaines (< 0,70 log UFC/g).

*L. sakei* a été inoculé à la fois en culture pure et en co-culture avec chaque cocktail de souches, mésophiles et psychrophiles. Les croissances de *L. sakei* dans le thon fumé et dans les 3 lots sont présentées sur la figure 34. *L. sakei* a été déposé initialement sur les tranches de thon fumé entre 5,2 et 6,0 log UFC/g. Après avoir atteint sa concentration maximal de 8,6 log UFC/g à 2 semaines, sa concentration n'a plus évolué jusqu'à 4 semaines.

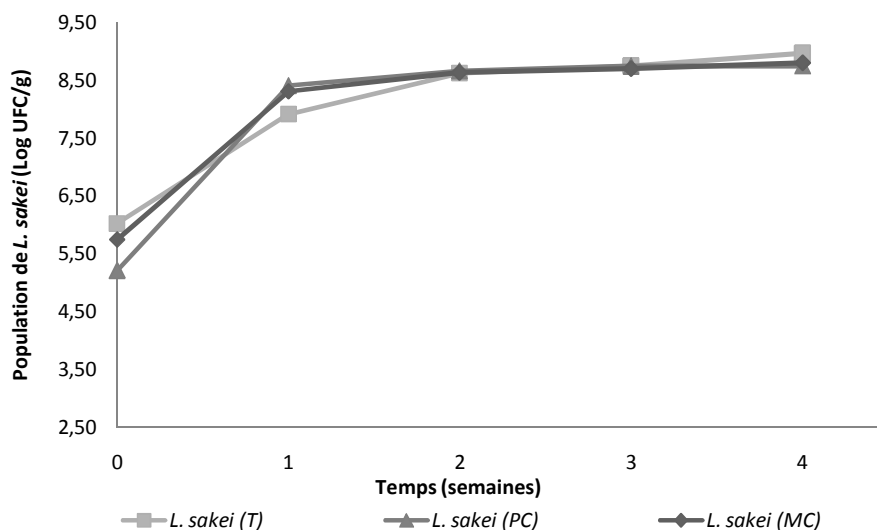
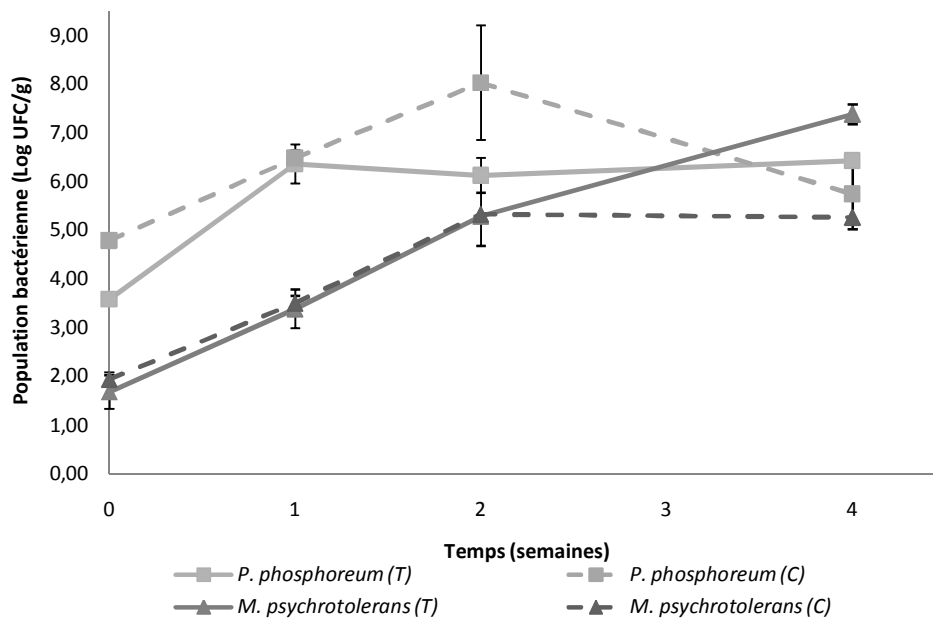


Figure 34 : Suivi de la croissance de *L. sakei* LHIS2885 dans le thon fumé conservé sous-vide à 8°C en culture pure (T) ou en co-culture avec un cocktail de bactéries psychrotolérantes (*M. psychrotolerans* et *P. phosphoreum*) (PC) ou de bactéries mésophiles (*M. morgani* et *P. damselae*) (MC). Les barres d'erreur représentent les écart-types

Le jour de l'ensemencement, pour le cocktail *M. psychrotolerans*/*P. phosphoreum*, les concentrations étaient de 1,6 et 3,5 log UFC/g respectivement. Ces 2 bactéries se sont bien développées sur le thon fumé stocké à 8°C. *M. psychrotolerans* a atteint sa concentration maximale de 7,4 log UFC/g à 4 semaines, tandis que *P. phosphoreum* était à 6,2 log UFC/g à 3 et 4 semaines (Fig. 35).

En co-culture avec *L. sakei*, l'inoculation et le développement de *M. psychrotolerans* étaient identiques à ceux de la culture pure. Cependant, une inhibition de 2,2 log UFC/g de la croissance a été observée à 4 semaines. Concernant *P. phosphoreum*, la concentration initiale, alors à 4,8 log UFC/g, était largement supérieure à celle souhaitée. Ainsi, des différences de + 3 log UFC/g et - 1 log UFC/g ont été observées à 2 et 4 semaines en co-culture par rapport au lot avec la bactérie histaminogène seule.



**Figure 35 : Suivi de la croissance du cocktail de souches psychrotolérantes fortement productrices d'histamine *P. phosphoreum* et *M. psychrotolerans* en culture pure (T) et en co-culture avec *L. sakei* (C) sur des tranches de thon fumé conservées sous-vide à 8°C pendant 4 semaines. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types**

Dans cette même étude, le cocktail mésophile composé de *M. morgani* et *P. damsela* a été artificiellement inoculé sur de nouvelles tranches de thon fumé. La figure 36 représente les cinétiques de croissance de ces 2 bactéries histaminogènes en culture pure ou en co-culture avec *L. sakei*. Le jour de l'ensemencement, les bactéries *P. damsela* et *M. morgani* ont étéensemencées aux concentrations voulues, avec des valeurs respectives de 2,0 et 1,5 log UFC/g. Au cours des 4 semaines de stockage, aucune croissance de *M. morgani* n'a été observée. Or, d'après les données obtenues du logiciel de microbiologie prévisionnel SSSP, *M. morgani* aurait du atteindre 8,2 log

UFC/g en 2 semaines et produire 2000 mg/kg d'histamine. On peut penser que l'effet combiné du froid et de métabolites issus du processus de fumage soit à l'origine de cette inhibition, d'autant plus que les prévisions du SSSP sont associées à du thon frais. Pour *P. damsela*, une croissance jusqu'à 3,3 log UFC/g a été notée après 1 semaine de stockage mais l'écart-type qui y est associé est très important ( $\pm 0,88$ ). Sa concentration est finalement descendue à 1,7 log UFC/g à 4 semaines. Hormis après 1 semaine de stockage pour *P. damsela*, aucune différence significative de développement n'a été relevée entre le lot en culture pure et celui en co-culture.

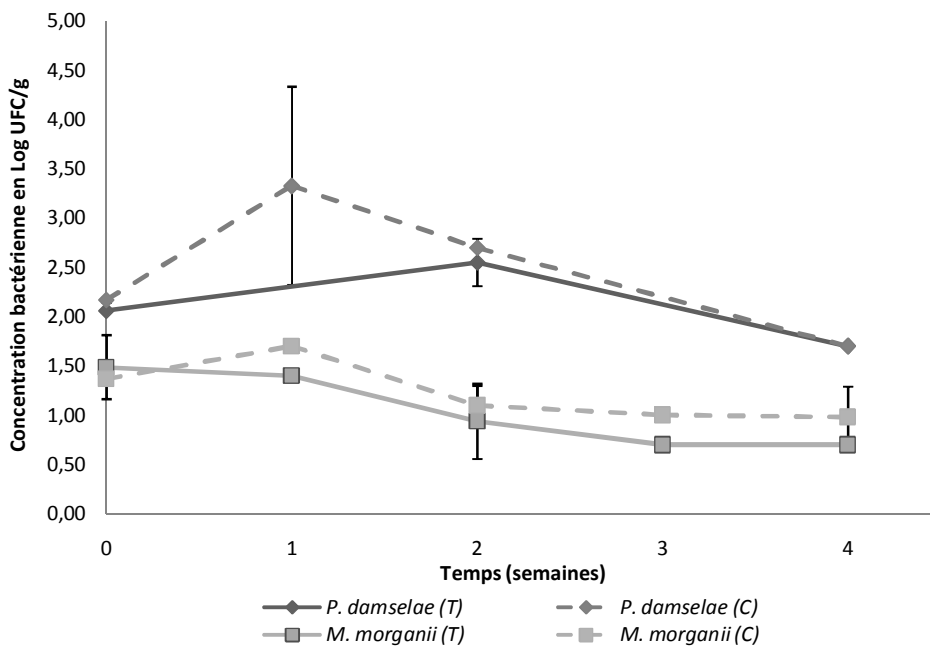


Figure 36 : Suivi de la croissance du cocktail de souches mésophiles fortement productrices d'histamine *P. damsela* et *M. morganii* en culture pure (T) et en co-culture avec *L. sakei* (C) sur des tranches de thon fumé conservées sous-vide à 8°C pendant 4 semaines. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types

Les concentrations en histamine dans les tranches de thon fumé sont présentées dans le tableau 35. La mesure de la production d'histamine a été effectuée sur les triplicats pour les 2 lots du cocktail psychrophiles. Le cocktail mésophile ne s'étant pas développé dans la matrice thon fumé, des analyses d'histamine ont été réalisées uniquement sur un échantillon par triplicat.

Dans le lot témoin non inoculé et le lot avec *L. sakei* pur, les concentrations d'histamine après décongélation étaient respectivement de 111 mg/kg et 186 mg/kg. Ces concentrations, importantes pour un premier point d'analyse, sont par la suite restées inférieures à 100 mg/kg.

**Tableau 35 : Concentration en histamine dans le thon fumé en présence de *L. sakei* en culture pure ou en co-culture avec *M. psychrotolerans* (Mp) et *P. phosphoreum* (Pp) ou avec *M. morgani* (Mm) et *P. damsela* (Pd). Les écart-types sont indiqués entre parenthèses pour les échantillons analysés en triplicat.**

Concentration en histamine dans les tranches de thon fumé (mg/kg)						
Semaine	Témoin	<i>L. sakei</i>	Mm / Pd	Mm / Pd <i>L. sakei</i>	Mp / Pp	Mp / Pp <i>L. sakei</i>
0	111	186	143	69	71	107
1	19	47	40	69	64 (± 39)	260 (± 87)
2	98	95	82	126	2107 (± 1987)	6004 (± 4092)
3	96	102	133	94	4848 (± 5245)	7162 (± 3075)
4	37	26	297 (± 448)	30	>10000	3462 (± 5562)

En présence des bactéries mésophiles, aucun changement notable dans les concentrations en histamine n'a été observé au cours des 3 semaines, où elles sont toujours restées inférieures à 150 mg/kg. Au bout de 4 semaines, une moyenne de 297 (± 448) mg/kg a été quantifiée dans le lot inoculé avec les bactéries histaminogènes mésophiles en culture pure. En effet, l'un des échantillons du triplicat a présenté une concentration de 815 mg/kg d'histamine alors que les deux autres échantillons du triplicat étaient inférieurs à 50 mg/kg. En co-culture avec *L. sakei*, la teneur en histamine n'a pas dépassé les 100 mg/kg, sauf à la 2<sup>ème</sup> semaine avec une valeur de 126 mg/kg.

La production d'histamine dans les lots inoculés avec les bactéries histaminogènes psychrotrophes a débuté dès la première semaine, où 260 mg/kg d'histamine ont été mesurés dans le lot en co-culture avec *L. sakei*. La production d'histamine a été très aléatoire dans ces deux lots et aucune tendance n'a pu être mise en avant. Par exemple, à 2 semaines la production d'histamine était supérieure de 4000 mg/kg en moyenne dans le lot en co-culture, puis cette tendance s'est inversée à 4 semaines. De plus, les écart-types sont très importants entre nos triplicats.

Au final, il est difficile d'évaluer l'efficacité de *L. sakei* LHS 2885 contre des cocktails de bactéries histaminogènes inoculées sur du thon fumé. D'une part, les niveaux d'inoculation souhaités n'ont pas pu être atteints, en particulier pour *P. phosphoreum*. D'autre part, la très grande variabilité de production d'histamine ne nous permet pas de déterminer si *L. sakei* a réussi à inhiber la production d'histamine.

### 3.4. Bilan et discussion sur les challenge-tests

La biopréservation consiste à appliquer sur un produit des souches bactériennes sélectionnées, de manière à inhiber la flore indésirable qui pourrait s'y trouver, sans modifier les caractéristiques organoleptiques et sensorielles de ce produit. L'efficacité de cette méthode est évaluée après sélection de bactérie d'intérêt, la plupart du temps par criblage sur boîtes de pétri et ensuite par des challenge-tests sur produits impliquant le plus souvent une analyse sensorielle.

De nombreux challenge-tests ont été réalisés lors de cette étude, incluant 3 matrices différentes (thon appertisé, cuit ou fumé), 4 bactéries cibles productrices d'histamine (*M. morganii*, *M. psychrotolerans*, *P. phosphoreum* et *P. damsela*) et 3 températures différentes de stockage (15°C, 8°C et 4°C). Au final, les propriétés antimicrobiennes de *L. sakei* LHS 2885 ont été principalement mises en évidence contre le genre *Morganella*, sur thon appertisé et thon cuit à 15°C et 4°C. Les niveaux d'inhibition compris entre 2 et 5 log UFC/g sont équivalents à ceux retrouvés sur crevette cuite ou saumon contre *L. monocytogenes* ou *B. thermosphacta* (Brillet *et al.*, 2005; Fall *et al.*, 2010a, 2010b; Matamoros *et al.*, 2009b). A l'inverse, les résultats des challenge-tests contre le genre *Photobacterium* et sur thon appertisé et thon fumé à 8°C ont été moins concluants.

Lors des challenge-tests de la partie 3, le but principal était d'évaluer, les potentialités antimicrobiennes de *L. sakei* LHS2885 contre d'autres bactéries histaminogènes. En effet, cette problématique est difficile à traiter car il n'existe pas une seule bactérie productrice, mais un ensemble de bactéries associées à 4 genres et 24 espèces (Cf. Etude bibliographique § 6.1.2). Nos recherches se sont donc focalisées sur les principales bactéries productrices référencées et représentées ici par les bactéries mésophiles *M. morganii* et *P. damsela* et les bactéries psychrotrophes *P. phosphoreum* et *M. psychrotolerans*. Pour nos challenge-tests, les taux d'inoculation compris entre 10 et 100 UFC/g ont été définis d'après les données du projet Seafood Plus et selon les prévisions du logiciel SSSP (Seafood Spoilage and Safety Predictor) (<http://sssp.dutaqua.dk>). Ce logiciel est basé sur des modélisations de *M. psychrotolerans* et *M. morganii* obtenues à partir de résultats d'expériences sur du thon en boîte (Dalgaard *et al.*, 2008).

La contamination de produits riches en histidine par *M. morganii* est la plus référencée, son inhibition en produits par *L. sakei* LHS2885 était donc une nécessité pour que cette souche ait un intérêt en industrie. Avec une inhibition de 2 à 3 log UFC/g, légèrement inférieure à celle observée contre *M. psychrotolerans*, cette bactérie semble avoir un impact important sur la croissance du

genre *Morganella*. De futurs challenge-tests contre d'autres bactéries histaminogènes mésophiles comme *H. alvei*, *R. planticola* ou encore *E. aerogenes* devraient être envisagés.

La famille des Vibrionacées est associée à deux espèces bactériennes fortement productrices d'histamine, *P. phosphoreum* et *P. damsela*. A la fois pathogènes pour les poissons, altérantes et productrices d'histamine, l'inhibition de ces espèces permettrait d'améliorer la qualité des produits de la mer. Les premiers essais sur thon cuit en co-culture avec *L. sakei* n'ont pas été concluants, l'inhibition engendrée par *L. sakei* LHS2885 était insuffisante pour maintenir un taux d'histamine inférieur au seuil de rejet Européen. Pour expliquer cette différence avec *Morganella*, on peut remarquer que le taux d'inoculation des *Photobacterium* était déjà supérieur à 2 log UFC/g et leur croissance a dépassé 5 log UFC/g en seulement 24 h. Or, Jørgensen *et al.* (2000b) a démontré qu'une concentration en bactéries histaminogènes supérieures à 4,5 log UFC/g en produit correspond au seuil de production d'histamine. L'adaptation de *P. phosphoreum* à cette matrice et son développement rapide sont problématiques pour la mise au point d'une méthode de biopréservation. De nouveaux tests d'inhibition en produits ciblés sur cette espèce, avec d'autres souches de bactéries lactiques pourront peut-être permettre de sélectionner des bactéries inhibitrices.

Finalement, des challenge-tests ont été initiés sur un produit légèrement préservé, le thon fumé. A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'inhibition des bactéries histaminogènes par biopréservation sur ce type de matrice. Seuls quelques articles font état de l'amélioration de différents procédés technologiques sur la texture, l'aspect et la préservation dans le temps après fumage (Paleari *et al.*, 1990; Pivarnik *et al.*, 2011; Visciano *et al.*, 2009; Zotos *et al.*, 2001). Pourtant, des bactéries histaminogènes psychrotrophes ont été retrouvées dans cette matrice et plus particulièrement *M. psychrotolerans* (Emborg and Dalgaard, 2006).

Lors de ce challenge-test, il n'y a pas eu de production d'histamine dans le lot témoin non inoculé sur les 4 semaines; ceci peut être lié à la fois au procédé de fumage et/ou au conditionnement et à la conservation à 8°C. Aucune production d'histamine n'a été retrouvée non plus dans les études citées précédemment. La problématique des intoxications histaminiques tient principalement de l'hétérogénéité de contamination des poissons, ce qui fait qu'il est difficile de travailler sur des produits naturellement contaminés. L'ensemencement des bactéries mésophiles sur thon fumé à 8°C a été effectué en se basant sur les prévisions du logiciel SSSP (Seafood Spoilage and Safety Predictor) (<http://sssp.dutaqua.dk>) qui prévoyait une croissance de 8 log UFC/g en 14 jours de *M. morganii* à 8°C. Cependant le niveau des bactéries histaminogènes mésophiles est resté bien en dessous de 4,5 log UFC/g ce qui explique la faible production d'histamine par ces bactéries. Cette limitation de



croissance pourrait être liée aux composés de la fumée ou à l'écologie microbienne spécifique de cette matrice par rapport au thon frais sur lequel les prédictions du SSSP s'appuient.

Ainsi, le thon fumé est un produit dont les communautés microbiennes nous sont inconnues, la qualité microbiologique de ce produit est donc difficile à maîtriser. Entre autres, nous avons travaillé sur des tranches de thon fumé achetées chez un industriel, les tranches pouvant alors provenir de poissons différents ce qui peut expliquer la forte hétérogénéité des concentrations bactériennes et de production d'histamine lors de nos essais. Des observations similaires ont été effectuées sur du saumon fumé lors de l'étude de Brillet *et al.* (2005) dans laquelle l'énumération de la flore totale a présenté une forte hétérogénéité. Pour faciliter des expérimentations futures sur cette matrice et améliorer l'homogénéité de nos résultats, le fumage de longe de thon dans la halle pilote du laboratoire EM<sup>3</sup>B, pourrait nous permettre d'avoir un contrôle plus important sur les différentes phases du procédé de fabrication et de conditionnement.

En définitive, les résultats de ces différents challenge-tests montrent que la bactérie *L. sakei* LHS2885 a un potentiel intéressant pour limiter la formation d'histamine dans les produits riches en histidine. Il est nécessaire néanmoins d'approfondir son profil d'inhibition ainsi que les mécanismes d'action impliqués. Son application sur des produits frais conditionnés sous atmosphère protectrice demeure un point important à étudier. Ces produits ne représentent qu'une part infime des achats mais la présence d'une bactérie histaminogène psychrotrophe sur ces produits peut rapidement les altérer, en particulier lors de la rupture de la chaîne du froid entre le supermarché et le réfrigérateur du consommateur. Développer une méthodologie pour que *L. sakei* LHS2885 soit utilisé comme ferment de biopréservation, évaluer de façon plus approfondie son impact microbiologique et sensoriel sur des produits frais naturellement ou artificiellement contaminés (longes de thon ou autres filets de poissons riche en histidine libre) et enfin passer au stade de l'application industrielle sont des objectifs futurs qui pourront être initiés grâce au dépôt du brevet "Utilisation de *Lactobacillus sakei* pour la biopréservation des produits de la mer" (Annexe).



## CHAPITRE II

Quantification de *Morganella morganii* et *Morganella psychrotolerans* par PCR quantitative en temps réel

(Article en préparation)



## INTRODUCTION

*Morganella morganii* et *Morganella psychrotolerans* sont deux espèces bactériennes fortement productrices d'histamine. Elles ont été identifiées dans des produits responsables d'intoxications histaminiques tels que le thon ou l'orpie ([Dalgaard et al., 2006](#)). *M. morganii* synthétise de l'histamine entre 8°C et 37°C en milieu de culture tandis que *M. psychrotolerans* peut se développer et produire de l'histamine jusqu'à 0-2°C (Emborg and Dalgaard, 2008b). Ces caractéristiques font de ces bactéries, des acteurs importants dans les intoxications histaminiques ; d'autant plus que toutes les souches bactériennes de ces 2 espèces sont considérées comme fortement productrices d'histamine (plus de 5000 mg/kg) (Bjornsdottir et al., 2009) à l'inverse de *P. phosphoreum* ~~ou pour laquelle~~ seule une part minoritaire des souches est fortement productrice (Dalgaard et al., 2006).

Malgré cela, il existe très peu de données de prévalence sur ces bactéries à la fois dans l'environnement, mais aussi lors d'un processus industriel (Kim et al., 2002a). Il est possible que ces lacunes soient dues à une absence de dénombrement spécifique de ces bactéries. ~~En effet, Afin~~ d'identifier et de quantifier les bactéries histaminogènes, des milieux supplémentés en histidine avec un indicateur de pH ont été utilisés et ont permis de détecter des bactéries potentiellement productrices d'histamine dans de nombreux produits riches en histidine ([Maijala et al., 1993](#); Mavromatis and Quantick, 2002; Niven et al., 1981; [Tao et al., 2009](#)). Cette méthode a cependant démontré ses limites. ~~En la comparant, Par comparaison avec~~ à la méthode ~~de PCR-PCR~~ de Takahashi et al. (2003) ciblant un fragment ~~de 709 pb du gène de l'histidine décarboxylase et à par~~ la mesure de la synthèse d'histamine dans un bouillon enrichi en histidine, Bjornsdottir et al. (2009) ont observé un grand nombre de faux positifs lié ~~au milieu de Niven~~ à ces milieux colorimétriques. Le pH peut ainsi être modifié par ~~divers autres~~ métabolismes, autres que la décarboxylation de l'histidine.

-En l'absence d'un milieu sélectif fiable pour dénombrer les bactéries histaminogènes, d'autres méthodes de détection par PCR ou PCR quantitative ont été développées. Une équipe américaine (Bjornsdottir-Butler et al. 2011a, 2011b) a ainsi proposé en 2011, une méthode de qPCR ciblant le gène de l'histidine décarboxylase, en se basant sur les amorces de Takahashi et al. (2003), des principales bactéries mésophiles fortement productrices d'histamine. Plus récemment, une méthode spécifique d'un fragment de l'ADNr\_16S a été mise au point pour quantifier *M. morganii* dans des matrices de poisson (Ferrario et al., 2012).

Un des points critiques des méthodes de PCR en temps réel est associé à la limite de quantification proche de 3 à 4 log UFC/g dans une matrice alimentaire ([Postollec et al., 2011](#)). Dans ce contexte, il est difficile d'obtenir en utilisant ces méthodes, des informations sur les étapes critiques de contamination tout au long d'un procédé de fabrication, puisque la contamination initiale a été

estimée entre 10 et 100 UFC/g pour ces bactéries histaminogènes (Dalgaard *et al.*, 2008). Pour améliorer cette limite de quantification, des étapes d'enrichissement ont été développées dans des milieux sélectifs. Par exemple, qui permettent par exemple de détecter une quantification jusqu'à 1-10 UFC/g est possible pour de *L. monocytogenes* et *Salmonella* en produits (O' Grady *et al.*, 2008; Rossmanith *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). Cependant, il est important de préciser que les méthodes citées précédemment ne sont que semi-quantitatives et qu'aucun lien n'a été effectué entre la vitesse de croissance et le temps d'enrichissement. Dans notre étude, une étape d'enrichissement permettant une quantification précise dans nos produits a été recherchée.

L'objectif de ce chapitre a porté sur le développement de deux méthodes spécifiques et sensibles de PCR en temps réel pour quantifier *M. morgani* et *M. psychrotolerans* dans des produits à base de poisson riche en histidine. Une étape d'enrichissement sélective a été mise en place pour améliorer la sensibilité et la sélectivité de la méthode. Ces méthodes ont finalement été testées sur des produits naturellement contaminés pour quantifier les deux espèces.

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées lors de cette étude sont listées dans le tableau 3436. Les souches de *Morganella* ont été cultivées en bouillon BHI (Biokar) et incubées à 20°C pendant 24 h. Les autres souches ont été cultivées en bouillon BHI (Biokar) à 20°C pendant 24 h à 48 h sauf *P. phosphoreum* qui a été cultivée en BHI supplémenté avec 15 g/l de NaCl (BHI salé).

### 2. Méthode d'extraction de l'ADN bactérien

L'extraction d'ADN sur culture bactérienne a été réalisée à partir de 1,5 ml de pré-culture ayant atteint une concentration d'au moins 8 log UFC/ml. Ce volume est centrifugé à 8 500 x g pendant 10 min. L'ADN chromosomique de toutes les bactéries listées dans le tableau 364 a ensuite été extrait avec le kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN La concentration et la pureté de l'ADN chromosomique obtenue après extraction a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre Nanovalve (Applied Biosystem, Saint Aubin, France), puis il a été -et a été dilué à 4 ng/μl pour réaliser le test de spécificité.

La méthode d'extraction d'ADN sur de la chair de poisson utilisée dans cette étude provient est inspirée d'une méthode développée sur du saumon cru pour quantifier *P. phosphoreum* par PCR en temps réel (Macé *et al.*, 2013). Une portion de 30 g de produits marins (thon, maquereau, hareng) a

été pesée en condition stérile dans un sac stomacher et diluée au 1/5<sup>ème</sup> avec un diluant tryptone-sel à 0,85 % (Intersciences).

Tableau 36 : Liste des souches de bactéries productrices ou non d'histamine utilisées dans ce chapitre

Souches bactériennes	Références	Production d'histamine	Collection	Produits impliqués
<b><i>Morganella psychrotolerans</i></b>	U2/3 <sup>T</sup>	Forte <sup>a</sup>	CIP 109403 <sup>T</sup>	Thon fumé à froid
	U2/4		DTU Food	Thon fumé à froid
	U2/5		DTU Food	Thon fumé à froid
	U2/6		DTU Food	Thon fumé à froid
	U2/7		DTU Food	Thon fumé à froid
	FD24		DTU Food	Thon frais sous-vide
	1F10		DTU Food	Orphie
	2F6		DTU Food	Orphie
	JB-T11		DTU Food	Thon frais sous-vide
	JB-T12		DTU Food	Thon frais sous-vide
	JB-T16		DTU Food	Thon frais sous-vide
	F39-1		DTU Food	Oeufs de Lompe
F39-3	DTU Food	Oeufs de Lompe		
<b><i>Morganella morganii</i></b>	LMG7874 <sup>T</sup>	Forte <sup>a</sup>	CIP A231 <sup>T</sup>	Fécès humain
	DSM14850 <sup>T</sup>		CIP 103648 <sup>T</sup>	Expectorations humaines
	25a32		DTU Food	Thon
	M04090		DTU Food	Isolat clinique
	U6/1		DTU Food	Thon
	NCIMB865		DTU Food	Poisson altéré
	AP28		DTU Food	Thon jaune
	03A11		DTU Food	Poisson fumé
	03B10		DTU Food	Poisson fumé
	HB2810		Ifremer EM3B	Sardine
HB2811	Ifremer EM3B	Sardine		
<b><i>Hafnia alvei</i></b>	DSM30163 <sup>T</sup>	Forte <sup>a</sup>	DTU Food	NC
	MIP2438,		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
	MIP2439,		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
	MIP2461,		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
	MIP2467,		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
	MIP2468,		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
	MIP2613,		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
MIP2625	Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré		
<b><i>Raoultella planticola</i></b>	DSM3069 <sup>T</sup>	Forte <sup>a</sup>	CIP100751 <sup>T</sup>	Radis
<b><i>Photobacterium phosphoreum</i></b>	EU2182	Forte <sup>a</sup>	CCUG16288	<i>Etelis marshi</i>
	4-PP		DTU Food	NC
	5-PP		DTU Food	NC
	EBP3067		Ifremer/Oniris	Saumon
	EBP3079		Ifremer/Oniris	Saumon
	MIP2560,		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
	MIP2562		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
	MIP2588,		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
	MIP2591,		Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
MIP2613	Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré		
<b><i>Photobacterium damsela</i></b>	RF227	Forte <sup>a</sup>	CIP102761 <sup>T</sup>	Poisson-demoiselle
<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	LMG2094 <sup>T</sup>	Forte <sup>a</sup>	CIP60.86 <sup>T</sup>	Expectorations
	SF1469		Ifremer EM3B	Saumon fumé
	SF1470		Ifremer EM3B	Saumon fumé

<i>Klebsiella oxytoca</i>	LMG3055 <sup>T</sup>	Forte <sup>a</sup>	DTU Food	NC
<i>Enterococcus faecalis</i>	RF195	Faible <sup>b</sup>	CIP105042	Volaille
<i>Pseudomonas spp.</i>	HB2843	Faible <sup>b</sup>	Ifremer EM3B	Thon
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	RF228	Forte <sup>a</sup>	CIP103364 <sup>T</sup>	Urine (Homme)
<i>Serratia liquefaciens</i>	SF1465	Faible <sup>b</sup>	Ifremer EM3B	Saumon fumé
<i>Staphylococcus xylois</i>	EU2178	Faible <sup>b</sup>	DSMZ20029	Viande rouge fermenté
<i>Listeria monocytogenes</i>	RF190	Faible <sup>b</sup>	Ifremer EM3B	Crevette
<i>Shewanella putrefaciens</i>	RF45		CIP6929	NC
	RF47	Faible <sup>b</sup>	Ifremer EM3B	Truite sous-vide
	RF49		Ifremer EM3B	Filets de morue
<i>Psychrobacter spp.</i>	EU2199		CCUG 42949	Morue dessalée
	EBP3029	Faible <sup>b</sup>	Ifremer EM3B	Saumon
<i>Psychrobacter aquaticus</i>	MIP2412	Faible <sup>b</sup>	Ifremer/Oniris	Saumon frais altéré
<i>Acinetobacter spp.</i>	EBP3044	Faible <sup>b</sup>	Ifremer/Oniris	Saumon
<i>Vibrio cholera</i>	RF184	Faible <sup>b</sup>	60087 CEVPM	Crevette cuite
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	RF37 (V1)	Faible <sup>b</sup>	CNCM I-2027	NC
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RF179	Faible <sup>b</sup>	Ifremer EM3B	Eau
<i>Enterococcus faecium</i>	RF192	Faible <sup>b</sup>	CIP 54.33	Poisson appertisé
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	EBP3084	Faible <sup>b</sup>	Ifremer/Oniris	Saumon
<i>Carnobacterium jeotgali</i>	RF210	Faible <sup>b</sup>	KCTC 13251	Crevette
<i>Leuconostoc gelidum</i>	LHIS2959	Faible <sup>b</sup>	Ifremer/Oniris	Filets de maquereau
<i>Carnobacterium divergens</i>	RF36 (V41)	Faible <sup>b</sup>	CNCM I-2028	NC
<i>Escherichia coli</i>	RF174	Faible <sup>b</sup>	CIP 76.24	NC
<i>Lactobacillus curvatus</i>	LHIS2886	Faible <sup>b</sup>	Ifremer/Oniris	Sardine fraîche
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	LHIS2997	Faible <sup>b</sup>	Ifremer/Oniris	Maquereau frais
<i>Lactobacillus sakei</i>	LHIS2855	Faible <sup>b</sup>	Ifremer/Oniris	Sardine fraîche

a : Forte: Production d'histamine entre 200-5000 mg/kg dans un milieu supplémenté en histidine ; Faible: 0 à 200 mg/kg d'histamine dans un milieu supplémenté en histidine

NC : Non communiqué

Après broyage à vitesse normale, 10 ml de solution homogène ont été filtrés sur un filtre Nucleospin L (Macherey-Nagel, Hoerd, France) par centrifugation à 11 700 x g pendant 10 min à 4°C pour séparer les particules de chair de poisson et les cellules eucaryotes, des cellules bactériennes.

Après élimination du surnageant, le culot bactérien a été remis en suspension dans 400 µl de solution de lyse enzymatique (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM sodium EDTA, 1.2% Triton X-100, 20 mg/ml lysozyme, 29 U/ml mutanolysine), puis incubé à 37°C pendant 1 heure au minimum. Les réactifs utilisés lors de cette étape proviennent de Sigma Aldrich. L'extraction se poursuit par une lyse mécanique, réalisée par addition de billes de verre d'un diamètre de 150 à 200 µm (Sigma). Les tubes ont été agités deux fois 2 minutes dans un « bead beater » à une vitesse de 30 battements/sec (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) puis les protéines ont été digérées par traitement avec une protéinase K (20 mg/ml) à 56°C pendant 30 à 45 min dans 200 µl de tampon de lyse AL fourni dans le kit Qiagen (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen).



Pour retirer les billes de verre, les tubes ont été centrifugés à 9500 x g pendant 3 min et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube, où les acides nucléiques ont été précipités avec 200 µl d'éthanol pur glacé (conservation à -20°C). La purification de l'ADN a été poursuivie selon les instructions du kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Qiagen).

### 3. Données génomiques et réalisation des amorces de PCR en temps réel

Un séquençage génomique par méthode shotgun a été effectué par le LTD au Danemark sur *M. morganii* U6/1 et sur *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> (Emborg *et al.*, 2006). Les contigs obtenus pour chacune des souches ont été assemblés et annotés avec le serveur d'annotation RAST (Aziz *et al.*, 2008). L'annotation des génomes a révélé des gènes cibles potentiels pour la réalisation d'amorces de qPCR spécifiques des espèces *M. morganii* et *M. psychrotolerans*. Trente paires d'amorces ont été créées pour *M. psychrotolerans* et *M. morganii* avec le logiciel Geneious (Geneious version 6.1, Biomatters Ltd), dont la méthode de calcul s'appuie sur le programme Primers3, ainsi qu'avec le logiciel Primer-Blast (NCBI, UK). Ces amorces ont été initialement contrôlées *in silico* sur le programme Blastn pour vérifier leur spécificité envers *M. morganii* ou *M. psychrotolerans* contre les séquences nucléotidiques disponibles sur GenBank (NCBI, UK) puis testées *in vitro*.

Les amorces sélectionnées MpVasD-F4 (5'-AAA TCG CCA TCA CAC TCC TTG-3') et MpVasD-R4 (5'-TTC AAA ACG GGA GTC CTC ACT G-3') ont été créées sur le gène *vasD* du système de sécrétion de type VI de *M. psychrotolerans* et sont positionnées aux nucléotides 146 -166 et 234-255 du gène *vasD* de *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup>. Pour *M. morganii*, les amorces MmGalK-F4 (5'-ACA GTG CTT CGG CGC ATC CC-3') et MmGalK-R4 (5'-GCA GCC ACC ACG CAG ACC TT-3') ont été dessinées sur le gène de la galactokinase (*galK*) et se trouvent en position 39-58 et 190-209 du gène de la galactokinase de *M. morganii* U6/1.

### 4. Développement de la méthode de PCR en temps réel

Les 30 paires d'amorces réalisées ont été testées *in vitro* contre diverses familles et espèces bactériennes pour vérifier leur spécificité vis-à-vis de *M. morganii* ou *M. psychrotolerans*. Les amorces ont été produites par la société TAG Copenhagen (Danemark) ou par la société Invitrogen (Illkirch, France). La spécificité de ces amorces, pour l'une des deux souches cibles, a été testée sur les extraits d'ADN des souches listées dans le tableau 36.

La réaction de qPCR a été effectuée dans un volume de 15 µl en incorporant le mélange suivant : 1 U de Iq SYBR® Green Supermix (Biorad), 300 nM de chaque amorce sens (MpVasD-F4 et MmGalK-F4) et antisens (MpVasD-R4 et MmGalK-R4), de l'eau de qualité biologie moléculaire et 1 µl d'ADN de

chaque souche. Le cycle de PCR en temps réel a été réalisé dans un appareil Biorad CFX-96 (Biorad). Les paramètres du cycle ont été définis ci-après : 95°C pendant 180 secondes en tant que dénaturation initiale qui permet aussi l'activation de la polymérase hot-start. Cette première étape est suivie de 40 cycles d'amplification composés d'une dénaturation à 95°C pendant 15 s, d'une hybridation des amorces et d'une élongation à 60°C pour *M. morganii* et 62°C pour *M. psychrotolerans* durant 30 s. La fluorescence est lue à la fin de chaque cycle d'amplification. A la fin des 40 cycles d'amplification, une courbe de fusion est réalisée entre 55°C et 95°C avec une incrémentation en température de 0,5°C / 5 s, suivie d'une lecture de la fluorescence.

En tant que témoin positif, un extrait d'ADN provenant de chair de thon cuite artificiellement contaminé par une concentration connue de *M. morganii* ou *M. psychrotolerans* a été utilisé. De l'eau distillée stérile ou un extrait d'ADN obtenue sur de la chair de thon appertisé ont été utilisés comme témoin négatif.

## 5. Développement d'un milieu d'enrichissement sélectif

Un milieu d'enrichissement spécifique a été développé pour permettre la croissance optimale de chaque espèce de *Morganella* et pour inhiber celle d'autres bactéries histaminogènes récurrentes en produits. Plusieurs antibiotiques et un substrat, le 2-deoxy-D-galactose (Sigma) ont été testés à différentes concentrations pour inhiber la croissance en milieu liquide de bactéries histaminogènes n'appartenant pas au genre *Morganella*. Les bactéries fortement productrices d'histamine *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup>, F39-1, JB-T11, *M. morganii* LMG7874<sup>T</sup>, DSM14850<sup>T</sup>, 03A11, *R. planticola* DSM3069<sup>T</sup>, *E. aerogenes* LMG2094<sup>T</sup>, *K. oxytoca* LMG3055<sup>T</sup> et *H. alvei* DSM30163<sup>T</sup> (Tableau 36) ont été sélectionnées pour tester l'effet de 15 antibiotiques et d'un substrat, le 2-deoxy-D-Galactose (Tableau 38). Selon l'étude d'Alper et Ames (1975), cet analogue du galactose est létal pour les bactéries qui le métabolisent suite à la formation d'un produit de la réaction toxique.

Les souches ont été inoculées en bouillon nutritif (NB, Difco) une nuit à 25°C et leurs concentrations ont été déterminées par microscopie en phase directe. Chaque puit d'une plaque de Bioscreen C (Labsystem, Helsinki, Finlande) a été inoculé avec 10<sup>2</sup> UFC/ml de pré-culture de chaque souche dans 300 µl de milieu BN préparé avec différentes concentrations d'antibiotiques (Tableau 38) ou avec le substrat. Pour tester, l'effet du 2-deoxy-D-galactose, le milieu BN a été supplémenté avec 0.2 mg/ml de substrat, les cultures ont été incubées en aérobie ou en anaérobie par l'ajout d'un film d'huile de paraffine. Un témoin négatif a été réalisé avec du bouillon NB stérile. La croissance a été suivie pendant 48 h à 25°C par mesure de l'absorbance à 540 nm toutes les 20 minutes après agitation pendant 10 s de la plaque à vitesse moyenne. Ces essais ont été réalisés en duplicat et les données ont été analysées sur le logiciel Excel (Microsoft).

## 6. Développement d'une étape d'enrichissement quantitative

Pour calculer la concentration initiale dans les poissons après l'étape d'enrichissement, des expériences de cinétique ont été réalisées à la fois sur solution tryptone sel et à partir de produits de la mer artificiellement contaminés pour mesurer la vitesse de croissance des deux espèces de *Morganella* dans le milieu d'enrichissement (MoE). Deux mélanges de 4 souches de *M. psychrotolerans* (CIP 109403<sup>T</sup>, JB-T11, JB-T12, U2/5) et de *M. morganii* (25a32, AP28, LMG7874<sup>T</sup>, DSM14850<sup>T</sup>) ont été préparés à partir de 2,5 ml de préculture de chaque souche effectuée à 25°C pendant 12 h en BN (Difco). Ces mélanges ont été dilués jusqu'à 5000 UFC/ml et inoculés à hauteur de 0,5 ml dans 9,5 ml de milieu tryptone-sel stérile, ou avec 10ml sur 190 g de thon en boîte et 190 g de crevettes cuites pour obtenir une concentration finale à 250 UFC/ml ou 250 UFC/g.

Pour les matrices alimentaires, l'étape d'enrichissement est ensuite réalisée sur 30 g de produits artificiellement contaminés, pesés en conditions stériles dans un sac stomacher (Intersciences) et dilués au 1/5<sup>ème</sup> dans du diluant tryptone-sel à 0,85 %. Un ml de la solution homogénéisée au stomacher a été transféré dans un tube de 9 ml de milieu MoE puis incubé à 10°C pour *M. psychrotolerans* et à 37°C pour *M. morganii*. Un dénombrement et une extraction d'ADN ont été effectués après 0, 14, 24, 38, 49, 63 et 86 h d'incubation à 10°C pour *M. psychrotolerans* et après 0, 1, 3, 4, 6, 7, et 9 h d'incubation à 37°C pour *M. morganii*. Le dénombrement des entérobactéries a été effectué sur milieu gélosé tryptone-soja (TSA) en surface après une incubation à 25°C durant 36 h. L'extraction d'ADN a été réalisée à partir d'un ml de milieu d'enrichissement comme décrit précédemment. Pour définir la vitesse de croissance des solutions de *M. psychrotolerans* et de *M. morganii* dans différentes matrices alimentaires, un modèle mathématique a été utilisé pour transformer ces données en valeur  $\mu_{max}$ . L'équation suivante a été utilisée pour déterminer le taux de croissance dans le milieu MoE (Eq. 1)

$$(Eq. 1) \quad \text{Log}(Nt) = \text{Log}(N0) + (\mu_{max} * \text{time}) / \text{Ln}(10)$$

*N0* : nombre initial de bactéries en milieu MoE (50 CFU/ml)

*Nt* : nombre de bactéries au temps *t* (CFU/ml)

## 7. Quantification de *Morganella* en produits marins par la méthode de PCR en temps-réel

La méthode de qPCR a été testée sur des produits marins achetés en supermarché, auprès d'un poissonnier ou directement auprès d'un pêcheur (Tableau 37). La présence de *Morganella* a été

quantifiée dans 3 types de produits frais (thon et hareng) et de produits légèrement préservés conditionnés sous-vide (maquereau, saumon fumé, matjesfilets).

**Tableau 37 : Liste des produits marins utilisés pour la recherche des 2 espèces de *Morganella* par la méthode de qPCR en temps réel**

Produits marins testés	Origines	Conditionnement
<b>Longe de thon</b>	Poissonier	VP - 2°C
<b>Steak de thon congelé</b>	Supermarché	VP - 2°C
<b>Hareng</b>	Pêcheur	VP - 2°C
<b>Maquereau fumé à chaud</b>	Supermarché	VP - 10 °C
<b>Matjesfilets</b>	Supermarché	PA - 10°C
<b>Saumon fumé à froid</b>	Supermarché	PA - 10°C

Après une nuit dans un bain de glace concassée, les produits frais sont préparés de la façon suivante : Les longes de thon ont été découpées en 8 pièces de 60 g et mises sous-vide. Le hareng a été éviscéré, la queue et la tête retirée et les filets ont été conditionnés sous vide. Tous ces produits ont été analysés le jour même, puis après 1 semaine d'incubation à 2°C pour les produits frais et 1 semaine d'incubation à 10°C pour les autres produits. Les expérimentations ont été réalisées en triplicats. Trente grammes de produits pesés en condition stérile en sac stomacher (Intersciences), ont été dilués au 1/5<sup>ème</sup> avec du diluant Tryptone-sel à 0,85%. Cette solution, une fois homogénéisée, a été utilisée pour le dénombrement de la flore totale et des entérobactéries. Cette même solution est utilisée pour la quantification par qPCR avec ou sans étape d'enrichissement. La flore totale a été énumérée à chaque point d'analyse sur milieu L&H en surface, après incubation à 15°C pendant 3 jours. Le dénombrement de *P. phosphoreum* a été effectué à partir des boîtes de L&H en comptant les colonies fluorescentes à l'obscurité. Les colonies violettes caractéristiques des entérobactéries ont quant à elles été dénombrées au deuxième point d'analyse sur milieu VRBG en profondeur après incubation à 25°C pendant 36 heures.

Pour la quantification spécifique de *M. psychrotolerans* et *M. morganii*, 1 ml de la solution homogénéisée en stomacher a été ajoutée à 9 ml de milieu MoE. Ces enrichissements ont été ensuite incubés à 10°C et 37°C durant respectivement 72 h et 7 h. L'extraction d'ADN a été réalisée sur 1 ml de culture selon le protocole décrit précédemment.

# RESULTATS

## 1. Spécificité des amorces de la méthode de PCR en temps réel

Trente paires d'amorces ont été sélectionnées et testées sur toutes les souches de *M. psychrotolerans* et *M. morganii*. Sur l'ensemble de ces amorces, seules les paires MpVasD-FR4 et MmGalk-FR4 ont été identifiées comme spécifiques à 100 % de *M. psychrotolerans* et *M. morganii* respectivement.

Les amorces MmGalkF-F4/MmGalk-R4 ont présenté 100 % d'homologie avec les séquences du gène de la galactokinase de *M. morganii* disponible sur la base GenBank. Les amorces MmVasD-F4/MmVasD-R4 n'ont présenté aucune homologie complète sur cette base de données par le biais du programme Blastn. Ce qui peut s'expliquer par le peu de données génomiques pour *M. psychrotolerans* disponibles sur cette base.

Les amorces MmGalk-FR4 permettent d'identifier correctement toutes les souches de *M. morganii* avec des cycles seuils de  $15.2 \pm 0.5$  tandis que les amorces MpVasD-FR4 identifient les souches de *M. psychrotolerans* avec des cycles seuils ( $C_t$ ) de  $16.8 \pm 0.3$  à partir de 4 ng d'ADN extrait de cultures bactériennes. Pour le test d'exclusion réalisé sur 49 souches HPB ou non HPB, les valeurs de  $C_t$  étaient toutes supérieures à 29 qui a ainsi été considéré comme la valeur seuil pour la détection spécifique des 2 espèces de *Morganella* à partir de cultures pures. Cette valeur seuil atteint 31 cycles quand l'ADN est extrait à partir de chair de poisson (thon) (données non présentées).

Un pic de fusion reproductible a été observé pour toutes les souches de *M. psychrotolerans* et de *M. morganii* à des températures de 83,5°C et 86°C respectivement. Les tests *in vitro* ont donc montré une bonne spécificité de ces amorces pour les deux espèces de *Morganella* à travers un large éventail de bactéries présentes en produits marins (Bjornsdottir *et al.*, 2009). Ces paires d'amorces ont été choisies pour développer une méthode de PCR quantitative en temps réel sur des produits marins riche en histidine.

## 2. Efficacité et seuil de détection de la méthode de qPCR

La gamme de détection de la méthode de qPCR a été établie sur des poissons contaminés avec des concentrations allant de 2 à 8 log UFC/g des souches de *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> et *M. morganii* CIP A231<sup>T</sup> (Tableau 36). Une droite d'étalonnage a ensuite été établie pour faire correspondre le dénombrement en UFC/g de chaque espèce de *Morganella* avec la valeur du cycle seuil obtenue en qPCR (Fig. 37).

Aucun signal n'a été détecté pour le témoin négatif. L'équation de la droite d'étalonnage est égale à  $C_T = -3,3016 \times \text{énumération (log cfu/g)} + 41,606$  ( $R^2=0.9922$ ) pour *M. psychrotolerans*, ce qui indique une efficacité de 100,8 % sur poisson contaminé. La droite d'étalonnage de *M. morganii* a été déterminée par l'équation :  $C_T = -3,413 \times \text{énumération (log cfu/g)} + 44,161$  ( $R^2=0.9922$ ) avec une efficacité de 96,3 %.

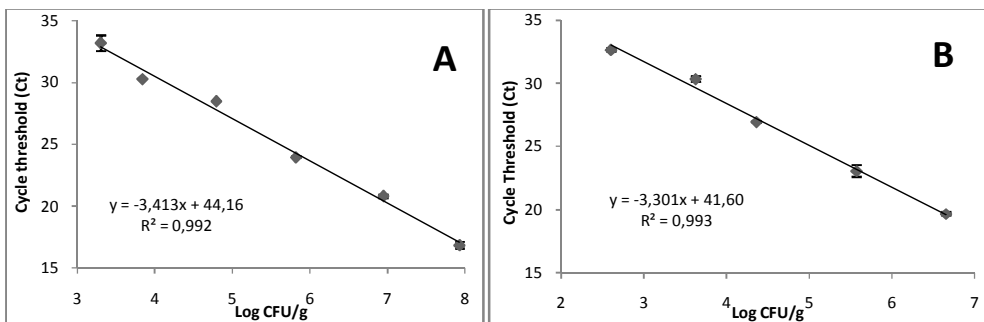


Figure 37 : Droite d'étalonnage développée pour *M. morganii* (A) et *M. psychrotolerans* (B) sur du thon en boîte

Le seuil de détection peut aller jusqu'à 2 log UFC/g dans la chair de poisson, mais dans ce cas les valeurs de  $C_T$  sont supérieures à 31 cycles ce qui peut conduire à des amplifications aspécifiques avec d'autres bactéries. Pour cette raison, la quantification spécifique de *M. psychrotolerans* et *M. morganii* en produits par la méthode de qPCR a été définie dans une gamme allant de 4 à 8 log UFC/g.

### 3. Développement d'un milieu d'enrichissement sélectif

Pour réaliser une étude de prévalence de *M. psychrotolerans* et *M. morganii* en produits de la mer, une amélioration de seuil de détection dans le but de dénombrer des concentrations inférieures à 4 log UFC/g a été proposée en se basant sur une méthode d'enrichissement sélectif. Des tests de spécificité ont été réalisés en testant 15 antibiotiques différents et un substrat particulier dans l'optique de développer un milieu d'enrichissement (Tableau 37). Le substrat 2-deoxy-D-galactose, montrant une inhibition du développement des souches de *M. psychrotolerans*, a été exclu.

Sur les 15 antibiotiques testés, la colistine a été retenue car elle a permis une inhibition des bactéries : *R. planticola* DSM3069<sup>T</sup>, *E. aerogenes* LMG2094<sup>T</sup>, *K. oxytoca* LMG3055<sup>T</sup> et *H. alvei* DSM30163<sup>T</sup> sans modifier la vitesse de croissance des 2 souches de *M. psychrotolerans* et de *M. morganii* testées.

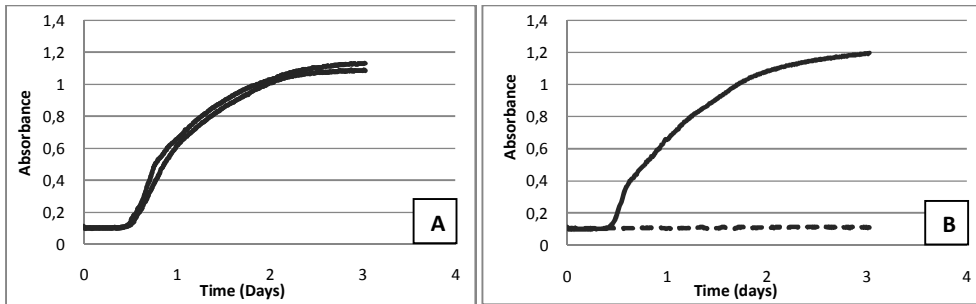


Figure 38 : Croissance de *M. morganii* (A) et *H. alvei* en milieu MoE sans colistine et avec 32 mg/kg de colistine. Les lignes pleines correspondent au milieu MoE sans la colistine et les lignes en pointillées sont pour le milieu avec 32 mg/kg de colistine.

L'inhibition par la colistine a été observée à des concentrations comprises entre 4 et 32 mg/kg en bouillon. A titre d'exemple, l'inhibition d'*Hafnia alvei* comparée à la croissance de *M. psychrotolerans* dans du bouillon nutritif supplémenté à 32 mg/kg en colistine est visible sur la figure 38.

Finalement, le milieu d'enrichissement (MoE) a été réalisé avec la composition suivante : 10 g/l tryptone (Biokar), 5 g/l extrait de levure (Biokar), 7 g/l  $H_2KPO_4$  (Merck, Darmstadt, Allemagne), 7 g/l  $HK_2PO_4$  (Merck) et 32 mg/l de colistine (Sigma). En se basant sur les taux de croissance déterminés auparavant au DTU Food (Données non présentées), la température d'incubation a été fixée à 10°C pour *M. psychrotolerans* et 37°C pour *M. morganii*.

Ce milieu ne permet pas la croissance de la bactérie fortement productrice d'histamine, *P. phosphoreum*, car il ne contient pas de NaCl indispensable à sa croissance (Dalgaard *et al.*, 2008).

Tableau 38 : Antibiotiques utilisés pour le développement du milieu d'enrichissement spécifique. La concentration minimale inhibitrice pour chaque paire d'antibiotiques et de bactéries productrices d'histamine est indiquée entre parenthèses (mg/kg).

Antibiotiques	Concentrations testées (mg/kg)	<i>M. psychrotolerans</i>	<i>M. morgani</i>			<i>R. planticola</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>H. alvei</i>
		U2/3 <sup>T</sup> , JB-T11, F39-1	LMG7874 <sup>T</sup>	DSM14850 <sup>T</sup>	03A11	DSM3069 <sup>T</sup>	LMG2094 <sup>T</sup>	LMG3055 <sup>T</sup>	DSM30163 <sup>T</sup>
Colistine	4 / 8 / 16 / 32	+	+	+	+	- (4)	- (4)	- (4)	- (4)
Ampicilline	1 / 2 / 4 / 8	+	- (8)	+	+	+	+	+	- (2)
Amoxicilline-clavulanate	2;1 / 4;2 / 8;4 / 16;32	+	- (16;8)	+	+	- (2;1)	- (4;2)	+	- (2;1)
Chloramphenicole	1 / 2 / 4 / 8	- (8)	- (4)	+	- (8)	- (4)	- (4)	- (2)	- (2)
Gentamycine	1 / 2 / 4 / 8	- (4)	- (4)	- (8)	- (4)	- (1)	- (4)	- (2)	- (2)
Tobramycine	1 / 2 / 4 / 8	- (4)	- (4)	- (8)	- (4)	- (2)	- (4)	- (4)	- (4)
Florfenicole	1 / 2 / 4 / 8	- (8)	- (1)	- (4)	- (8)	- (4)	- (8)	- (1)	- (1)
Meropeneme	2 / 4	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)				
Thrimethoprim	2 / 4	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)				
Thrimethoprim + sulfamethoxazole	2 / 4	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)				
Oxytetracycline	2 / 4	+ F39-1 / - (2)	- (2)	+	- (2)				
ACide nalidixique	2 / 4	+	+	+	- (2)				
Polymixine B	4 / 8	+	+	+	+				
Ciproflaxine	2 / 4	- (2)	- (2)	- (2)	- (2)				
Norflaxine	2 / 4	- (2)	- (2)	- (2)	+				

+ : Croissance observée pour toutes les concentrations d'antibiotiques testées ; - (...): Inhibition de la croissance à une concentration de ... (mg/l).



#### 4. Quantification par qPCR en temps réel avec une étape d'enrichissement

La concentration initiale de *Morganella* dans les produits marins doit être déterminée par l'utilisation du taux de croissance de chaque espèce dans des conditions de culture contrôlées. Trois matrices (tryptone-sel, thon en boîte, crevettes cuites) ont été utilisées pour suivre la cinétique de croissance d'un mélange de souches de *Morganella*. De plus, de nombreuses espèces de poissons peuvent être les vecteurs d'une intoxication histaminique. L'efficacité du tampon dans le milieu MoE, qui a pour but de réduire l'effet matrice a aussi été évalué.

Le taux de croissance maximal a été calculé à l'aide d'un modèle de croissance exponentiel et s'avère être pour *M. psychrotolerans* de :  $0,182 \text{ h}^{-1}$  en tryptone-sel,  $0,180 \text{ h}^{-1}$  dans le thon en boîte, et  $0,180 \text{ h}^{-1}$  dans les crevettes (Fig. 39). L'analyse statistique ne démontrant pas de différences significatives entre les vitesses de croissance obtenues sur chaque matrice pour *M. psychrotolerans*. Sa valeur  $\mu_{max}$  a donc été définie  $0,180 \text{ h}^{-1}$  en produits marins lors d'une incubation à  $10^\circ\text{C}$ .

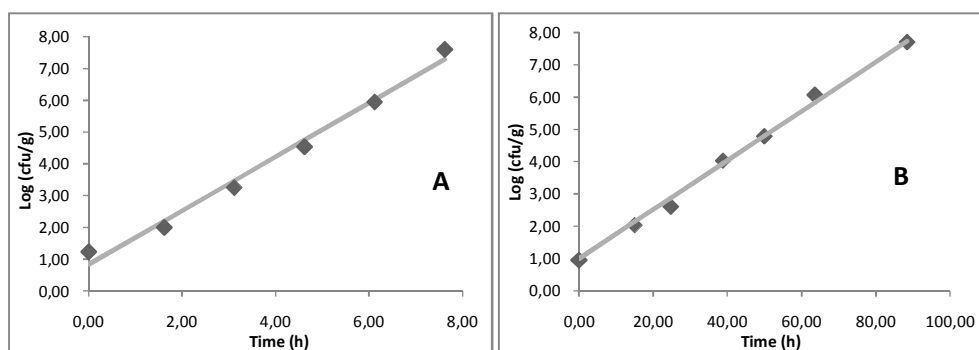


Figure 39 : Croissance de *M. morganii* (A) et *M. psychrotolerans* (B) à  $37^\circ\text{C}$  et  $10^\circ\text{C}$  respectivement en milieu MoE suivie par énumération sur gélose TSA en fonction du temps. La droite en ligne pleine représente le modèle mathématique employé pour déterminer le taux de croissance de chaque espèce.

Pour *M. morganii*, la vitesse de croissance maximale observée dans ces 3 matrices est de :  $1,939 \text{ h}^{-1}$  en tryptone-sel,  $2,002 \text{ h}^{-1}$  en thon en conserve, and  $2,130 \text{ h}^{-1}$  dans les crevettes cuites. A l'identique de *M. psychrotolerans*, il n'y a pas de différences statistiques entre les 3 vitesses de croissance et la valeur  $\mu_{max}$  a été définie à  $2,024 \text{ h}^{-1}$ . Pour compléter la méthode d'enrichissement, il a été nécessaire de déterminer la correspondance entre le cycle seuil obtenu par qPCR et le dénombrement en UFC/g obtenu par comptage sur boîtes de Pétri pour réaliser une gamme d'étalonnage pour chaque espèce en milieu MoE. La relation linéaire déterminée pour chaque espèce a été échelonnée entre  $4 \pm 0,5$  et  $8 \pm 0,5 \text{ log UFC/ml}$ . L'équation de cette relation a été définie pour *M. morganii* selon l'équation :  $C_T = -3,378 \times \text{dénombrement en log cfu/ml} + 44,951$  ( $R^2=0,99$ ) qui a une efficacité de 97,71%. Pour *M.*

*psychrotolerans*, elle est définie par l'équation :  $C_T = -3,4637 \times \text{dénombrément en log cfu/ml} + 47,691$  ( $R^2=0,99$ ) indiquant une efficacité de 94,54%. (Fig. 40).

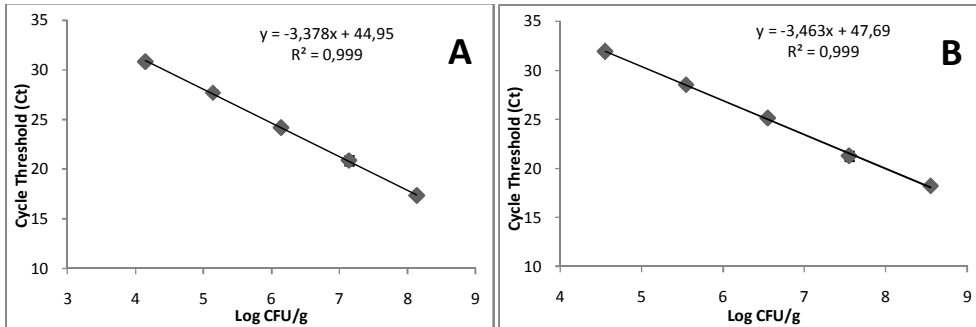


Figure 40 : Gammes d'étalonnage développées sur milieu MoE avec des cultures pures de *M. morganii* (A) et *M. psychrotolerans* (B)

Les temps d'enrichissement ont été fixés à 7 h et 72 h d'incubation d'après les taux de croissance de *M. morganii* à 37°C et *M. psychrotolerans* à 10°C. Ces temps d'enrichissement ont été calculés grâce à l'équation (1) et représentent le prélèvement et la mise en culture dans 9 ml de milieu MoE d'une colonie qui atteindra alors  $10^4$  UFC/ml dans le temps fixé. L'étape d'enrichissement a ensuite été validée sur du thon en boîte artificiellement contaminé et le seuil de détection minimal a été défini à 50 UFC/g. Cette limite est liée à la dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  réalisée lors de l'inoculation du milieu MoE en tubes. Ce seuil de détection peut être amélioré jusqu'à 5 UFC/g si l'enrichissement est réalisé directement sur l'échantillon (30 g de chair diluée dans 120 ml de milieu MoE en container stérile). Pour connaître la concentration initiale dans notre produit en *M. psychrotolerans* ou *M. morganii*, il est donc nécessaire de déterminer sa concentration en milieu MoE après enrichissement grâce à la méthode de qPCR en temps réel. Cette concentration peut ensuite être appliquée à l'équation suivante (Eq. 2) pour calculer la concentration dans le produit :

$$\text{Eq. (2)} \quad IC = CaE \times \left( \frac{2.718^{\mu_{max} \times ET}}{SD} \right) \times 2.718$$

**IC** : Concentration initiale dans le produit (log CFU/g)

**CaE** : Concentration après enrichissement déterminé par qPCR (log CFU/ml)

**ET** : Durée de l'enrichissement (h)

**SD** : Facteur de dilution (x 50)

**$\mu_{max}$**  : Taux de croissance maximal

Le principe de la méthode a été illustré schématiquement sur la page suivante (Fig. 41). Cette méthode doit être testée sur des produits naturellement contaminés pour être pleinement validée.

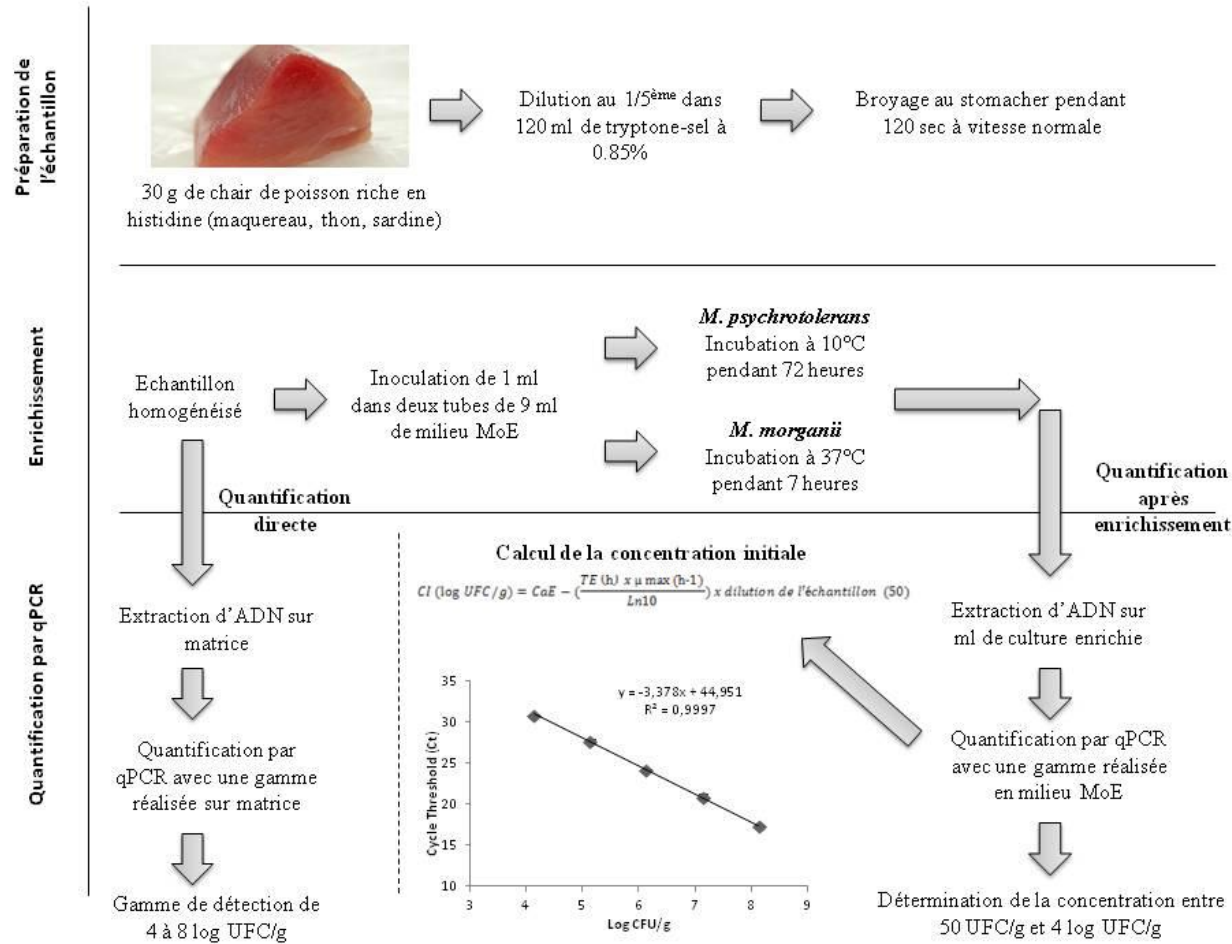


Figure 41 : Protocole de quantification par qPCR en temps réel de *M. psychrotolerans* et *M. morganii* avec ou sans étape d'enrichissement en milieu MoE

Tableau 39 : Dénombrement de la flore totale et des entérobactéries sur 6 types de produits achetés au Danemark

Poissons	Origine et conditionnement	Analyse après achat			Analyse après 1 semaine d'incubation		
		Flore totale (L&H - log UFC/g)	<i>P. phosphoreum</i> (Fluorescence)	Entérobactéries (VRBG log UFC/g)	Flore totale (L&H - log UFC/g)	<i>P. phosphoreum</i> (Fluorescence)	Entérobactérie (VRBG log UFC/g)
Longe de thon	Poissonnier SV	2.90			4,79		2,23
		3.90	ND	< 5 UFC/g	4,51	ND	1,40
		3.66			3,81		1,40
Steack de thon congelé	Supermarché SV	3.70			2,85		1,81
		3.61	ND	< 5 UFC/g	3,06	ND	1,40
		3.60			2,18		1,70
Hareng	Pêcheur SV	4.33			7,90	7,90	2,37
		4.18	ND	< 5 UFC/g	8,00	8,00	2,45
		4.08			7,73	7,73	2,00
Maquereau fumé à chaud	Supermarché SV	ND			7,20	7,20	
		ND	ND	< 5 UFC/g	7,66	7,66	< 5 UFC/g
		3.41			7,22	7,22	
Matjesfillets	Supermarché AP	2.18			ND		2,22
		1.70	ND	< 5 UFC/g	2,60	ND	3,00
		1.70			3,75		3,00
Saumon fumé	Supermarché AP	2.00			1,70		
		ND	ND	< 5 UFC/g	3,41	ND	< 5 UFC/g
		1.70			ND		

ND : Non détecté ; SV : Sous-vide ; AP : Atmosphère protectrice

## 5. Quantification de *Morganella* dans des produits marins par qPCR

Le dénombrement de la flore totale, des entérobactéries et la quantification spécifique de *Morganella* ont été effectués sur des produits de la mer frais et légèrement préservés. L'analyse des produits par méthode traditionnelle sur boîtes après une nuit sur glace a démontré une qualité microbiologique correcte de nos échantillons. La flore était comprise entre 3,5 et 4,2 log UFC/g pour les poissons frais et entre 1,1 et 1,9 log UFC/g pour les produits fumés. Aucune colonie bioluminescente caractéristique de *P. phosphoreum* n'a été observée sur milieu L&H (Tableau 39).

Après une semaine d'incubation à 2°C pour les produits frais et à 10°C pour les produits fumés, la flore totale et les entérobactéries ont été dénombrées sur milieu L&H et VRBG respectivement. Sur les filets de harengs, la flore totale a augmenté jusqu'à 8,0 log UFC/g. Après lecture des boîtes à l'obscurité, les colonies se sont avérées être toutes luminescentes. La flore dominante sur ce produit semble être alors *P. phosphoreum*. La flore totale sur le thon frais ou les steaks après 1 semaine de stockage est restée stable par rapport au premier point d'analyse à des concentrations comprises entre 2,7 et 4,3 log UFC/g. Dans le saumon fumé et les filets de harengs marinés crus, la flore totale reste basse entre 1,7 et 2,1 log UFC/g. Les entérobactéries ont été dénombrées dans tous les produits frais ou dans le maquereau fumé autour de 1,6 à 2,7 log UFC/g. Elles n'ont cependant pas été retrouvées dans le saumon fumé et les matjesfillets et se situent en dessous du seuil de détection de 5 UFC/g.

La qPCR en temps réel avec ou sans étape d'enrichissement n'a pas détecté la présence de *M. psychrotolerans* ou *M. morganii* dans nos échantillons de poisson. Pour confirmer cette observation, les cultures enrichies à 10°C ou 37°C pendant 72 h et 7 h ont été dénombrées sur milieu VRBG. Aucune entérobactérie n'a poussé après la culture à 37°C confirmant l'absence de *M. morganii* dans nos échantillons. Cependant, des concentrations de 5 à 8 log UFC/g ont été dénombrées sur VRBG pour les filets de harengs et le maquereau fumé à partir de la culture enrichie pour la recherche de *M. psychrotolerans*. Après identification, les colonies dénombrées ont été identifiées dans le genre *Pseudomonas* spp. par analyse phénotypique et séquençage partiel de l'ADNr 16S. Ces résultats confirment ceux obtenus par qPCR en temps réel et valident la spécificité de la méthode aux espèces de la famille *Morganella*.

## DISCUSSION

De nos jours, l'intoxication histaminique est la plus importante cause de toxi-infections alimentaires liée à la consommation de poisson à l'échelle mondiale. Pour prévenir cette intoxication et les pertes économiques engendrées par la destruction des denrées alimentaires contaminées, l'histamine est devenue un critère de sécurité dans les produits riches en histidine selon la législation de l'EFSA en Europe et du CDC aux Etats-Unis. La concentration en amines biogènes ne peut excéder 200 mg/kg en Europe (CE 1019/2013) et 50 mg/kg aux Etats-Unis (FDA/CFSAN, 2001). Du fait, de la durée relativement courte des symptômes liés à une intoxication histaminique (urticaires, diarrhée, vomissement), les épidémies et les cas d'intoxications rapportés auprès des autorités sont sous-estimés et l'intoxication histaminique est bien plus courante qu'il n'y paraît (Dalgaard *et al.*, 2008; Hungerford, 2010).

Les études sur l'intoxication histaminique et les bactéries responsables de la production d'histamine ne cessent de croître chaque année (Hungerford, 2010). La législation et les contrôles sanitaires régulent la qualité des poissons disponibles à l'achat, cependant l'occurrence des épidémies liées à l'histamine ne diminue pas dans le temps et continue de représenter un coût important pour l'industrie. Afin d'améliorer la qualité microbiologique de ces produits, des méthodes de biologie moléculaire ont été développées récemment pour identifier les bactéries responsables de la production d'histamine. Des méthodes PCR ont principalement été utilisées pour cette tâche et ont été couplées au séquençage de l'ADNr 16S. Ces méthodes ont permis d'identifier la plupart des bactéries mésophiles et psychrophiles fortement productrices d'histamine (Takahashi *et al.*, 2003). La variabilité intra-espèces observée par exemple chez *P. phosphoreum* qui comprend des souches à la fois non, faiblement et fortement productrices d'histamine peut compliquer la compréhension des mécanismes de synthèse de cette amine biogène. Après 2009, des méthodes de PCR en temps réel ont été développées pour la détection et la quantification des bactéries productrices d'histamine dans des produits de la mer à risque. Ces méthodes se focalisent sur les bactéries mésophiles et n'ont jamais été testées sur les deux principales espèces de bactéries histaminogènes psychrotrophes, *M. psychrotolerans* et *P. phosphoreum* (Bjornsdottir-Butler *et al.*, 2011a). Par ailleurs, ces techniques de PCR en temps réel ont déjà été utilisées pour quantifier des bactéries pathogènes dans les aliments telles que *L. monocytogenes* (O' Grady *et al.*, 2008; O'grady *et al.*, 2009) ou *E. coli* O157:H7 (Chern *et al.*, 2011; Taskin *et al.*, 2011) par qPCR associée à une étape d'enrichissement. Des bactéries altérantes ont aussi été quantifiées de cette manière, dont *Brochotrix thermosphacta* (Mamlouk *et al.*, 2012) et *Photobacterium* (Macé *et al.*, 2013).

Notre étude s'est focalisée sur la quantification des espèces de *Morganella* dans des produits marins. Toutes les souches de cette famille sont fortement productrices d'histamine et ont déjà été associées à plusieurs épidémies à travers le monde. Une méthode de quantification spécifique est actuellement manquante et pourrait permettre d'étudier l'occurrence de ces bactéries dans les produits et sur la chaîne de production pour maîtriser plus facilement la synthèse d'amines biogènes lors des procédés de transformation. Les techniques actuelles sont limitées en spécificité par rapport au dénombrement classique sur milieu VRBG et en sensibilité pour améliorer nos connaissances dans ce domaine. Tout récemment, une méthode de qPCR en temps réel a été proposée pour la quantification de *M. morganii* par Ferrario *et al.* (2012). Bien que cette méthode soit novatrice, la spécificité des amorces n'a pas été testée sur des souches de *M. psychrotolerans*, alors qu'elles sont disponibles en collection depuis 2007 (Emborg *et al.*, 2006). La stabilité du nombre d'intoxications histaminiques chaque année, malgré l'amélioration des normes d'hygiène et de conservation à basse température en complément du conditionnement sous atmosphère protectrice, pourrait être liée à des bactéries psychrotolérantes capable de produire de l'histamine entre 0 et 2°C dans des poissons riches en histidine. Pour obtenir une quantification spécifique de chaque espèce, un important travail a été réalisé sur la sélection du gène cible et des amorces. Les amorces de *M. psychrotolerans* ont été créées sur le gène *vasD* du système de sécrétion de type VI, qui a été découvert chez *Vibrio cholerae* par Filloux *et al.* (2008). Dans le génome de *M. psychrotolerans*, le système de sécrétion de type VI se compose de 17 gènes qui sont absents du génome de *M. morganii* et assurent une bonne spécificité de la qPCR. D'autres amorces développées pour *M. psychrotolerans* sur la section 3' du gène *hdc* ont aussi permis une quantification spécifique de ses souches. Cependant, le gène *vasD* a été choisi afin de différencier cette étude des autres méthodes de PCR ou de qPCR apte à détecter des bactéries histaminogènes par l'amplification d'un fragment du gène *hdc* (Bjornsdottir *et al.*, 2009; Bjornsdottir-Butler *et al.*, 2011a, 2011b). Pour *M. morganii*, le choix a été fait d'utiliser les amorces ciblant le gène de la galactokinase due à l'absence de ce mécanisme chez *M. psychrotolerans*.

Ces deux paires d'amorces sont 100 % espèce-spécifique par rapport à d'autres bactéries histaminogènes et des bactéries à Gram positif et négatif non productrices d'histamine présentes dans l'écosystème des produits marins. Le seuil minimum de quantification en poisson a été défini à 4 log UFC/g. En effet, la présence d'autres bactéries histaminogènes en forte concentration conduit à des amplifications aspécifiques en dessous de ce seuil et limite la gamme de quantification qui peut aller théoriquement jusqu'à 2-3 log UFC/g en général (Macé *et al.*, 2013). Avec ce niveau de détection, notre méthode peut-être utilisée pour détecter ou quantifier spécifiquement des

bactéries connues pour être histaminogènes dans des produits contaminés et responsables de toxico-infections alimentaires. C'est aussi la première méthode de quantification spécifique de *M. psychrotolerans* en produits de la mer.

Néanmoins, la production d'histamine ne s'effectue qu'à partir d'une certaine charge bactérienne dans le produit. Jørgensen *et al.* (2000b) et Emborg *et al.* (2008a) ont déterminé qu'au minimum 4,7 log UFC/g à des températures comprises entre 4°C et 37°C étaient nécessaires pour la synthèse d'histamine par *M. morgani*, *P. phosphoreum* ou encore *P. damsela*. Posséder une méthode de quantification rapide des bactéries histaminogènes à des taux compris entre 2 et 4 log UFC/g serait alors très intéressant pour contrôler la présence de ces bactéries sur la matière première et prévenir la formation d'histamine lors du procédé de transformation.

L'amélioration de la sensibilité de la méthode était le point critique pour son utilisation dans la recherche de deux espèces histaminogènes sur un procédé industriel. Comme pour des bactéries pathogènes, une étape d'enrichissement a été développée pour augmenter le seuil de détection à 50 UFC/g en matrice. Un enrichissement spécifique a été choisi pour empêcher la croissance d'autres bactéries histaminogènes, qui pourraient affecter les taux de croissance définis dans le milieu d'enrichissement en consommant les éléments nutritifs qui s'y trouvent. Le 2-deoxy-D-galactose a été utilisé par Alper et Ames (1975) pour sélectionner des mutants de *Salmonella gal +* et *gal -*. Il a démontré que suite à l'hydrolyse de ce substrat, un composé toxique le 2-deoxy-D-galactose-1-phosphate est libéré ce qui induit la mort des mutants *gal+* et permet la sélection des mutants *gal-*. Lors de nos essais, l'inhibition a été uniquement observée contre *M. psychrotolerans* qui ne métabolise pas le galactose, sans perte de croissance chez *M. morgani*. Deux autres études ont porté sur l'utilisation du 2-deoxy-D-Galactose, Platt (1984) suggère que l'absence d'une galactokinase favorise la résistance contre ce substrat et Nagelkerke et Postma (1978) ont en plus démontré une résistance pour des souches de *Salmonella typhimurium* ayant une délétion du gène de la perméase au galactose, mais précisent que ce substrat peut avoir un effet bactériostatique. De plus, l'hydrolyse de ce substrat semble réellement toxique pour les organismes vivants puisqu'il permet de maîtriser les populations de termites suite à son ingestion (Veillon *et al.*, 2010).

Le milieu MoE supplémenté avec 32 mg/kg de colistine permet la croissance des souches de *Morganella* tout en inhibant la croissance d'autres bactéries histaminogènes. La méthode d'enrichissement est rapide pour *M. morgani* avec une incubation à 37°C pendant 8 h à une valeur  $\mu_{max}$  de 2,024 h<sup>-1</sup>. L'extraction d'ADN et la quantification par qPCR peuvent donc être effectuées dans



la même journée. Pour *M. psychrotolerans*, la température d'incubation a été définie à 10°C pour favoriser le développement de *M. psychrotolerans* par rapport à *M. morganii*. L'incubation dure 72 heures avec une valeur  $\mu_{max}$  de 0,180 h<sup>-1</sup>. Toutefois, une étape d'incubation à 25°C pourrait être intéressante pour travailler à la température optimale de croissance de *M. psychrotolerans* et pour réduire le temps d'analyse. L'étape de latence dans la croissance des souches de *Morganella* n'a pas été étudiée pour le calcul du taux de croissance sur produits. La majorité des produits sont frais ou légèrement préservés et conservés à basse température entre 0 et 2°C. La phase de latence est donc minime sur ce type de produits (Emborg and Dalgaard, 2008b). D'un autre côté, dans les produits congelés, tel que les steaks de thon, une phase de latence pourrait être observée et modifier la croissance maximale de nos bactéries cibles. La quantification sur des produits congelés pourrait donc être un essai supplémentaire à vérifier pour s'assurer de la fonctionnalité de la méthode.

La validation de la méthode sur des produits artificiellement contaminés présente un seuil de détection de 50 UFC/g. Le seuil de détection est limité à cette concentration, si l'enrichissement est réalisé sur 1 ml de la solution homogénéisée au 1/5<sup>ème</sup> et distribué dans 9 ml de milieu MoE. Pour améliorer la sensibilité, il est possible d'effectuer un enrichissement direct, de 30 g de produits dans 120 ml de milieu MoE, pour atteindre un seuil de détection de 5 UFC/g. Enfin, une autre solution développée par Murakami *et al.* (2012) propose l'utilisation d'une méthode de filtration de la solution issue du stomacher permettant d'atteindre théoriquement un seuil de 1 UFC/g.

Une méthode sensible de quantification des *Morganella* en poissons associée à un programme de microbiologie prévisionnelle tel que le Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) pourrait apporter des données intéressantes pour prévenir le développement de certaines bactéries histaminogènes avant que le produit ne soit transformé.

Finalement, la présence des *Morganella* a été étudiée dans différents produits disponibles au Danemark. La méthode a été utilisée sur des produits marins frais et légèrement préservés. Aucune souche de *M. psychrotolerans* ou de *M. morganii* n'a été détectée dans nos échantillons et la qPCR s'est avérée à 100 % négative. *P. phosphoreum* a été retrouvée dans du maquereau fumé à chaud et dans des filets de hareng, une re-contamination durant le procédé de fabrication peut être responsable de la présence de cette bactérie dans le maquereau fumé à chaud. Par contre, sa présence dans les filets de harengs n'est pas surprenante. De telles concentrations après 1 semaine d'incubation à 2°C nous alertent sur l'importance de bonnes conditions de stockage et de traitement des denrées alimentaires (Kanki *et al.*, 2004).

L'outil de qPCR en temps réel développé dans ce travail devra être appliqué à d'autres produits pour détecter les espèces de *Morganella* en poisson. Cette méthode pourrait être associée à l'avenir à

d'autres techniques de qPCR comme celle de Bjornsdottir-Butler *et al.* (2011b) ou Macé *et al.* (2013) pour quantifier toutes les bactéries productrices d'histamine et identifier spécifiquement *P. phosphoreum*, *M. morganii* ou *M. psychrotolerans*.

Les méthodes moléculaires sont de puissants outils pour suivre la contamination bactérienne dans un grand nombre de denrées alimentaires. La spécificité et la sensibilité de ces méthodes sont supérieures aux méthodes de dénombrement classique et permettent d'obtenir des résultats plus rapidement. Notre méthode de quantification de *M. psychrotolerans* et *M. morganii* en poisson riche en histidine est un outil intéressant pour étudier l'occurrence de ces bactéries et pour promouvoir des critères de qualité plus restrictifs en industrie pour réduire la perte économique engendrée la contamination à l'histamine. C'est aussi essentiel pour réduire l'importante fréquence des intoxications histaminiques qui est inacceptable pour la santé du consommateur.

## CHAPITRE III

Approche visant à étudier de l'expression des gènes  
du cluster de l'histidine décarboxylase chez *M.*  
*psychrotolerans* dans différentes conditions  
environnementales



## INTRODUCTION

La maîtrise de la production d'histamine par des bactéries histaminogènes s'appuie sur le respect de la chaîne du froid et plus récemment sur de nouvelles techniques employant un conditionnement approprié, un traitement enzymatique ou comme décrit dans le chapitre I, une méthode impliquant des micro-organismes protecteurs, la biopréservation. La disponibilité de méthodes de détection et quantification de certaines bactéries histaminogènes, telles que celle présentée dans le chapitre II, appliquée le long de la chaîne de transformation des poissons riches en histidine, devrait également permettre de mieux maîtriser le risque d'intoxication histaminique.

D'autres pistes passent par l'élucidation des mécanismes moléculaires de production d'histamine par les bactéries histaminogènes. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, dans les aliments, l'histamine est formée par l'action de l'histidine décarboxylase qui remplace le groupement  $\alpha$ -carboxyl de l'histidine par un proton issu du cytoplasme. L'utilisation des protons internes et la libération des produits issus de la réaction de décarboxylation, préservent la cellule bactérienne des stress acides en créant un effet tampon entre l'environnement intracellulaire et extra-membranaire (Landete *et al.*, 2008; Prester, 2011). L'histidine décarboxylase des bactéries à Gram négatif (*Photobacterium*, *Enterobacteriaceae*) est une enzyme pyridoxal -5'- phosphate dépendante (PLP) pour laquelle la séquence déduite en acides aminés indique la présence d'un composé lysine sur la position 232 où se fixe une molécule de pyridoxal-5'-phosphate afin de former une aldimine interne (Base de Schiff) essentielle à l'activité enzymatique (Kanki *et al.*, 2007; Vaaler and Snell, 1989; Vaaler *et al.*, 1986).

Une meilleure compréhension des conditions qui régulent le fonctionnement de l'histidine décarboxylase au niveau moléculaire permettrait de développer des stratégies d'inhibition de la synthèse de l'histamine ou d'améliorer les méthodes existantes. Par ailleurs, l'action de *L. sakei* LHS 2885 ou de son métabolisme sur ces mécanismes est une hypothèse qui peut expliquer l'inhibition de la formation d'histamine par *M. psychrotolerans* lorsqu'elle est en co-culture avec la bactérie protectrice sans qu'aucune inhibition de la croissance de la bactérie histaminogène ne soit observée (cf. chapitre I, § 3-2).

Parmi les principales bactéries histaminogènes, ce sont les caractéristiques du cluster HDC du genre *Photobacterium* qui ont été les plus étudiées au niveau moléculaire. Chez *P. phosphoreum*, un cadre ouvert de lecture codant pour une histidine décarboxylase phosphate dépendante, avec une

composition en acides aminés très similaire à celles des entérobactéries a été décrite (Morii *et al.*, 2006). En complément, des cadres ouverts de lecture codant pour une perméase à acides aminés (*ydjE*) et pour une histidyl ARN-t synthétase (*hisS*) ont été identifiés dans les régions encadrant le gène *hdc* (Morii and Kasama, 2004; Morii *et al.*, 2006). Chez *P. damselae*, ces 3 gènes, une perméase histidine/histamine (*hdcT*), une histidine décarboxylase (*hdcA*) et une histidyl ARN-t synthétase (*hisRS*) ont été détectés. Des analyses par Northern Blot et RT-qPCR ont démontré un niveau d'expression plus élevé de transcrits mono et bi-cistronique des gènes *hdcA*, *hdcT* et *hisRS* lors d'un stress acide et en présence d'un excès d'histidine libre suggérant une organisation de ces gènes sous la forme d'un opéron (Kimura *et al.*, 2009).

Parmi les entérobactéries, ce cluster, récemment étudié chez *M. morganii*, se structure de manière identique. Deux perméases *hdcT1* et *hdcT2* ont été identifiées, encadrant le gène de l'histidine décarboxylase (*hdc*) avec en aval un gène codant pour une histidyl ARN-t synthétase (*hisRS*). Des expériences de RT-qPCR réalisées à partir d'une expression hétérologue de ces 4 gènes chez *E. coli* ont confirmé les observations faites sur *P. damselae*, pour lesquelles un stress acide et de l'histidine en excès favorisent leurs expressions (Ferrario *et al.*, 2014). Enfin, quelques données sont aussi disponibles sur le gène *hdc* de *R. planticola* et *E. aerogenes* mais aucune recherche n'a été effectuée sur l'*hdcT* ou *hisRS* (Kamath *et al.*, 1991). Les gènes encadrant l'*hdc* d'*E. aerogenes*, *hdcT* et *hisRS*, sont cependant disponibles sur la base de données NCBI suite au séquençage complet et à l'annotation de la souche KCTC 2190 (Shin *et al.*, 2012).

En ce qui concerne, *M. psychrotolerans*, peu de données sont actuellement disponibles avec seulement 3 publications y faisant référence (Emborg and Dalgaard, 2008a, 2008b; Emborg, 2006; Ramanathan *et al.*, 2011). Actuellement, aucune information n'est disponible sur l'organisation génétique et la localisation des gènes reliés à la production d'histamine chez cette espèce.

L'objectif de ce travail est d'une part, d'étudier l'organisation génétique du cluster HDC de *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> en comparaison du cluster de *M. morganii* DSM30164<sup>T</sup> récemment caractérisé, d'autre part, de sélectionner des gènes de référence et des conditions expérimentales qui permettront à terme de déterminer les conditions d'expression du gène de l'histidine décarboxylase chez cette bactérie. Le séquençage et l'annotation du génome de *M. psychrotolerans* réalisés par l'Université Technique du Danemark (DTU) ont permis d'isoler et caractériser les gènes du cluster HDC, de sélectionner et de tester la spécificité de plusieurs gènes de référence qui pourront être utilisés pour déterminer l'impact de différentes conditions environnementales et la présence de la bactérie lactique *L. sakei* LHIS2885 sur l'expression des gènes du cluster HDC.

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Souches et conditions de culture

*M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> = LMG 23374<sup>T</sup> = DSM 17886<sup>T</sup> provenant de la collection du DTU Food (Danemark) a été utilisé pour le séquençage. La méthode de RT-qPCR a été mise au point sur *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> récupéré auprès de la CRBIP (France) et stocké à -80°C dans la souchothèque Ifremer. Cette souche est cultivée en bouillon BHI salée à 20°C pendant 24 h en condition aérobie.

*L. sakei* LHS2885 isolée de sardine fraîche lors des expérimentations de biopréservation est mise en culture en milieu MRS à 26°C pendant 24 h. Les temps de culture les plus appropriés pour étudier l'expression des gènes ont été déterminés avec le logiciel Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) (Emborg and Dalgaard, 2008a).

## 2. Séquençage et annotation du génome de *M. psychrotolerans*

### 2.1. Séquençage du génome

Les génomes de *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> et de *M. morganii* U6/1 ont été séquencés selon la méthode Shotgun par l'Université technique du Danemark (Kunin *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2010).

### 2.2. Identification et annotation des séquences codantes

Une fois assemblés, les génomes de *M. psychrotolerans* et *M. morganii* ont été analysés à l'aide du programme d'annotation RAST (Version 4.0) (Aziz *et al.*, 2008). Le programme RAST, ou programme d'annotation rapide basé sur la technologie des sous-systèmes, utilise une stratégie d'affectation basée sur des sous-systèmes avec des activités biologiques créées manuellement englobant des familles de protéines qui garantissent ainsi un meilleur degré de cohérence lors de l'annotation. Le programme vérifie en parallèle les données par comparaison à d'autres génomes et vérification orthologue des gènes annotés.

Ce programme a fourni aussi quelques éléments sur les ARN ribosomiques et afin d'étayer ces données, les ARNr 5S, 16S et 23S ont été recherchés à l'aide du programme RNAmmer (Lagesen *et al.*, 2007). La recherche des origines de réplication a été initiée en se basant sur l'analyse des « GC-oblique » tout en localisant le gène *dnaA* et les boîtes DnaA sur le génome grâce au programme Ori-finder (Gao and Zhang, 2008).

### 2.3. Recherches de données génomiques et comparaison de séquences

Les données de génomique, autres que celles de *M. psychrotolerans*, ont été obtenues sur la base de données du Centre National des Informations Biotechnologiques (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). L'analyse de ces données a été réalisée sur le logiciel Geneious (version 7.1.2, Biomatters, Auckland, Nouvelle-Zélande).

Les alignements de séquences ont été réalisés en utilisant l'alignement « Geneious » fourni par le programme en question, selon un alignement global avec un coût matriciel de 70%. Les arbres phylogénétiques ont été créés à partir de nos alignements selon la méthode du Neighbor Joining par le calcul des distances génétiques de Tamura-Nei avec un bootstrap de 1000 itérations (Tamura and Nei, 1993).

### 3. Extraction et purification de l'ARN

A partir de 1,5 ml de culture avec le kit Ultraclean Microbial RNA (MoBio, Saint Quentin, France) et suite à une étape de centrifugation à 10 000 x g, l'ARN a été extrait par lyse mécanique des bactéries dans un bead beater à 30 coups/sec pendant 5 minutes dans un tampon de lyse MR1/MR2 fourni avec le kit. La purification de l'ARN est réalisée selon le protocole du fabricant, puis il est élué dans 50 µl d'eau de qualité biologie moléculaire sans RNase et DNase (MoBio). L'ARN est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

La qualité des ARN a été mesurée par mesure des ratios d'absorbance A260/A280 et A260/A230 à l'aide d'un spectrophotomètre Nanovalve (GE Healthcare, Aulnay sous-bois, France). La qualité des extraits d'ARN a également été vérifiée par dépôt sur gel d'électrophorèse en TAE 1X avec 1% d'agar et marqué au Gel Red™ (GelRed, Fluoprobes, Interchim, Montluçon, France). Après migration 45 min à 90 V, deux bandes représentatives de l'ARNr 23S et de l'ARNr 16S ont été recherchées.

Avant l'étape de transcriptase reverse, l'ARN préalablement extrait est traité avec une enzyme DNase I provenant du kit RTS DNase (Mo Bio), pour éliminer l'ADN génomique restant. La réaction a été réalisée dans un volume de 50 µl composé d'un tampon DNase 1X et d'1 µl de RTS DNase. L'enzyme RTS DNase est éliminée à l'aide d'une résine fournie dans le kit lors d'une incubation de 10 min à température ambiante puis d'une centrifugation à 13 000 x g après laquelle le surnageant est récupéré.



## 4. Transcriptase reverse et quantification par PCR en temps réel de l'ARN

### 4.1. Sélection des amorces

Toutes les réactions de transcriptase reverse ont été réalisées à l'aide d'un mélange d'amorces aléatoires et d'amorces oligo dT fourni dans le kit Iscript Reverse transcriptase (BioRad).

Afin d'étudier l'expression des gènes du cluster HDC, 14 paires d'amorces ont été dessinées sur des gènes de ménage (*dnaG*, *priA*, *poll*, *polIII*, *rpoB*, *rpoD*, *rpoN*, *gyrB*, *gyrA*, *rrs*) et des gènes de biosynthèse (*ilvY*, *ilvC*, *slyD*, *cheA*) pour déterminer un à deux gènes de référence (Tableau 40). Pour l'étude du cluster HDC, une paire d'amorces a été synthétisée sur chaque gène (*hdc*, *hdcP1*, *hdcP2*, *hisRS1*, *hisRS2*) ainsi que deux paires d'amorces s'alignant sur les gènes *HdcP1-HisRS1* (P-RS) et *hdc-HdcP2* (H-P) pour déterminer leur modèle de transcription mono ou bis-cistronique mis en évidence chez *P. damselae* (Kimura *et al.*, 2009). Ces amorces sont décrites dans le tableau 40.

Tableau 40 : Taille des gènes cibles, séquences des amorces et taille du produit d'amplification

Gène	Taille du gène (pb)	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)
<i>dnaG</i>	1743	GCGTCAGGTGGATATGAGCA	CTCACTCTGCCGATAACGG	178
<i>priA</i>	2181	GGCATTCTGCAAACCGTTC	ATATGCGGGATAGCCTGTGC	186
<i>poll</i>	2799	GGAAGGACGTCGCTTGATCT	GCAACCAGTCATCTACTGCG	149
<i>polIII</i>	3480	TGCTCACTGGAAGGTCTGGA	GGACCGACCGGAACATCATT	196
<i>rpoB</i>	4041	TCCGTTCCGTTTTCCCGATT	ACCGCGGATTTGACTCTT	180
<i>rpoD</i>	1848	CGCGACCATCCGAGTTCTAA	CGGCATTTTGCTCTGCTCAA	177
<i>rpoN</i>	1446	AACACCTTACATTGCTGGGAAAC	TGCTCCCGTGTTTTCTGA	187
<i>gyrB</i>	2415	CGCGTCTGACTGAGAACGAA	CCAGTTTGAGATACGGGCG	177
<i>gyrA</i>	2631	ATAACCGATGCCGGTACACT	GCGACATCCGACTTTCACT	185
<i>rrs</i>	1356	AACTCTGAGACAGTTGCTGC	CTCCTTTGAGTTCCCGCCAT	123
<i>ilvY</i>	915	AGTGCAGTCACAGGAAGCC	ATATTCTCCAGTCCGGCTCT	168
<i>ilvC</i>	1476	CTGCCGCTGATCGCAATAC	CACGGTCACGGTGAAGAGG	156
<i>SlyD</i>	687	ACGGCGAAGGTGAAGAAGG	ACCCTGGCCTTTACCCTGA	200
<i>CheA</i>	2055	TGATGGGCTCGCAACTTGAT	GTTGTTCCGCCGGTTCATC	175
<i>HisRS1</i>	1236	CACTGCGTCATCAGTTACCGC	GCCAGATCCCACAGACCGATTT	148
<i>HisRS2</i>	1902	ACAGCGTGACACCGACTT	AATGACAGGGTCGAGCATAAACGC	188
<i>HdcP1</i>	1443	TACAGACTGAAGTGCCGCGA	AGTGAGCAAAGACTGCGCT	137
<i>HdcP2</i>	1362	TGAACCGCGGCAGTACGTTT	TTCCCTGTTTTCGCACGGCT	175
<i>HDC</i>	1137	AGCATTGCCTCGCGACTTCCG	CGCGTGTAATTTGCGTCGGC	119
<i>P-RS</i>	SIG <sup>a</sup>	ACCGCTGAGATGGCGTTACC	TTCCAGCCACTGCCAAACCG	154
<i>H-P</i>	SIG <sup>a</sup>	CCGCTGTTACAGCTTTGTGGC	CGCAATATGCCAGAATGCATCG	190

<sup>a</sup> : Séquence Inter-Génique

#### **4.2. Réaction de reverse transcription de l'ARN total**

Les réactions de transcriptase reverse ont été réalisées avec le kit Iscript Reverse transcription Supermix (Biorad) avec 100 ng d'ARN total dans un volume réactionnel de 20 µl en suivant les instructions du fabricant. Le processus de reverse transcription est composé d'une étape d'hybridation de 5 min à 25°C, suivie par une étape de transcription reverse de 30 min à 42°C et finalement d'une inactivation de l'enzyme de RT de 5 min à 85°C. Les ADNc nouvellement formés ont été conservés à -20°C.

#### **4.3. Amplification**

L'amplification de l'ADNc, obtenue après la réaction de transcriptase reverse, a été effectuée sur un appareil de qPCR CFX96 (Biorad) dans un volume réactionnel de 15 µl contenant 1U de Iq SYBR® Green, Supermix (Biorad), 0,5 µmol/l de chaque amorce, 6,2 µl d'eau stérile DNase et RNase free (MoBio) et 1 µl d'ADNc (ou une concentration connue). Les paramètres du cycle ont été définis ci-après : 95°C pendant 180 secondes de dénaturation initiale permettant aussi l'activation de la polymérase hot-start. Cette première étape est suivie de 40 cycles d'amplification composés d'une dénaturation à 95°C pendant 15 s, d'une hybridation des amorces et d'une élongation à 60°C durant 30 s. La fluorescence est lue à la fin de chaque cycle d'amplification. A la fin des 40 cycles d'amplification, une courbe de fusion est réalisée entre 56°C et 95°C avec une incrémentation en température de 0,5°C suivie d'une lecture de la fluorescence. Lors de chaque expérience, des contrôles sans transcriptase-reverse et sans échantillon ont été inclus. Après vérification des courbes de fusion et du produit d'amplification obtenu, les résultats ont été analysés selon la méthode décrite ci-dessous.

### **5. Détermination du contrôle interne dans différentes conditions de culture**

#### **5.1. Vérification de la spécificité des amorces pour *M. psychrotolerans***

La spécificité des 21 paires d'amorces listées dans le tableau 40 (Cf. § 4.1), a été testée sur 1 µl d'ADNc de *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> et *L. sakei* LHS2885. L'ADNc a été obtenue à partir de l'extrait d'ARN d'une culture de 14 h à 20 °C de chacune des souches suivies d'une étape de reverse transcriptase sur 100 ng d'ARN selon la méthode décrite auparavant (Cf. § 4.2). La réaction de qPCR a été décrite dans la section § 4.3. Cette expérience a été réalisée en dupliqué.

## 5.2. Détermination d'un gène de référence

Afin de déterminer un gène de référence pour étudier les variations d'expression des 5 gènes du cluster HDC, *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> a été inoculé à 1% dans 15 ml de milieu BHI salé à 20°C pendant 14 h. Ce temps de croissance permet d'obtenir une culture en fin de phase exponentielle, ce qui apporte une meilleure stabilité en expression génique à contrario d'une culture en phase stationnaire, du fait de la déplétion de certains éléments nutritifs dans le milieu.

Après ce temps d'incubation, les cellules bactériennes ont été centrifugées à 8 500 x g pendant 10 min, puis lavées dans 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7.2). Le culot bactérien est récupéré par centrifugation à 8 500 x g pendant 10 min. Autant de culots bactériens sont réalisés qu'il y a de conditions à tester. Ces culots ont ensuite été placés dans 15 ml d'une solution de PBS à différents pH et/ou température pendant 2 heures. Six conditions environnementales différentes ont été testées en triplicat (soit 18 culots bactériens) :

- Stress acide : PBS à pH 4, 5, 6 (diminution du pH avec une solution d'HCl)
  - Témoin : PBS à pH 7.2
  - « Choc thermique » : PBS à pH 7.2 et incubation à 4°C et 30°C
- } 20°C

Suite à ce délai de 2 heures, 1.5 ml de culture est récupéré pour extraire l'ARN selon la méthode décrite précédemment (Cf. M&M, §3). Après vérification de l'intégrité de l'ARN total, 100 ng d'ARN ont été transformés en ADNc et l'expression de chaque gène de biosynthèse et de ménage a été étudiée selon la méthode expliquée en 4.2 – 4.4.

# RESULTATS

## 1. Analyse du génome

### 1.1. Caractéristiques générales du génome de *M. psychrotolerans*

Le séquençage du génome de la souche type *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup>, a été réalisé par la méthode « Shotgun ». A partir de 292 contigs, une séquence génomique de 4 150 937 pb a été assemblée avec une teneur en GC de 48,0 %. Aucun plasmide n'a été retrouvé lors du séquençage. Le contig le plus grand mesure 195 774 pb, tandis que le plus petit mesure uniquement 500 pb.

En comparaison avec les séquences génomiques de *M. morgani* SC01 et KT qui mesurent respectivement 3 799 359 pb et 3 826 919 pb, une différence de 3,1 % et 2,8 % de la teneur en GC a

été observée (48,0 % pour *M. psychrotolerans* et 51,1 %, 50,8 % pour *M. morganii* SC01 et KT respectivement).

Le logiciel d'annotation RAST ne fournit pas d'informations précises sur la composition en ARN dans le génome, seul le nombre total d'ARN est mis à disposition et s'élève à 59 chez notre souche. Parmi ces 59 ARNs, les ARNr 23S, 16S et 5S ont été recherchés via le programme RNAmmer (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/>) qui a identifié 4 ARNr 5S de 115 pb, 2 ARNr 16S de 1444 et 2509 pb et 2 ARNr 23S de 2906 et 2921 pb. Par rapport à cette première recherche, un ARNr 16S d'une taille de 2509 pb est inhabituel, on peut donc remettre en doute la présence de deux ARNr 16S. La taille des autres ARNr identifiés par RAST est conforme aux données obtenues lors du séquençage du génome de *M. morganii* KT. Ainsi, en comparaison avec le génome de *M. morganii* KT, 8 ARNr 5S (105 pb), 1 ARNr 16S (1530 pb) et 1 ARNr 23S (2906 pb) ont été retrouvés par RNAmmer (Chen *et al.*, 2012).

Sur 3844 séquences codantes (CDS) identifiées avec le programme d'annotation RAST, 57% (2200 CDS) codent pour un ensemble de 307 sous-systèmes. Un sous-système correspond à un ensemble de gènes fonctionnels qui initie des processus biologiques ou des complexes structuraux. Ces gènes peuvent être placés dans des clusters de groupes orthologues qui sont assignés à des fonctions biologiques listées dans la figure 42. Les données génomiques ont été comparées à celles de *P. mirabilis* HI4320 qui sont libres d'accès sur le serveur d'annotation RAST. Les pourcentages de protéines associés à une catégorie fonctionnelle sont très proches entre ces deux entérobactéries avec des variations inférieures à 1%. Seules les catégories d'acquisition du fer et de métabolisme des ARN sont plus importantes pour *P. mirabilis* (1,4 % et 3 %) alors que pour *M. psychrotolerans*, ce sont les protéines régissant les acides gras et lipides et celles du métabolisme des hydrates de carbone qui sont plus nombreuses avec 1,7 % et 1,9 % de différence. Le génome n'a pour l'instant pas été étudié de manière plus approfondie, ce travail ayant été débuté par une équipe de l'Université Technique du Danemark. Parmi ces catégories, nos recherches se sont focalisées sur la catégorie des acides aminés et dérivés où l'on retrouve le sous-système responsable de la production d'histamine représenté par le cluster HDC.

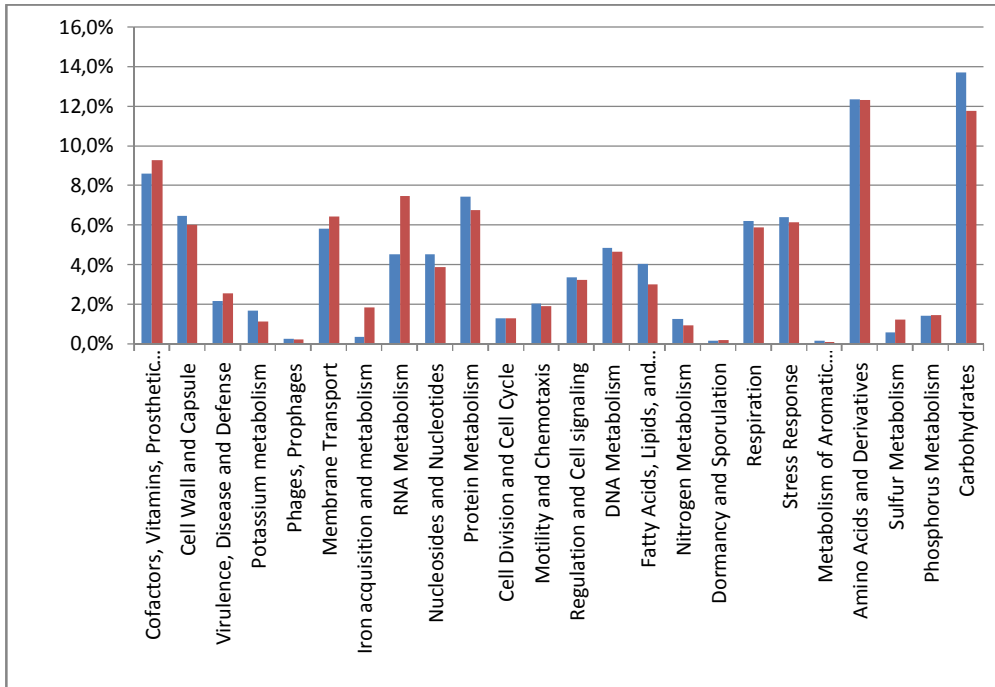


Figure 42 : Catégorie fonctionnelle des protéines prédites *in silico*. Les couleurs représentent différentes espèces : en bleu *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>3</sup> et en rouge *P. mirabilis* HI4320. Les protéines ont été organisées par le programme d'annotation RAST. Les protéines codant pour des métabolismes secondaires ou des régulateurs n'ont pas été représentées sur l'histogramme car absentes du génome de *M. psychrotolerans*.

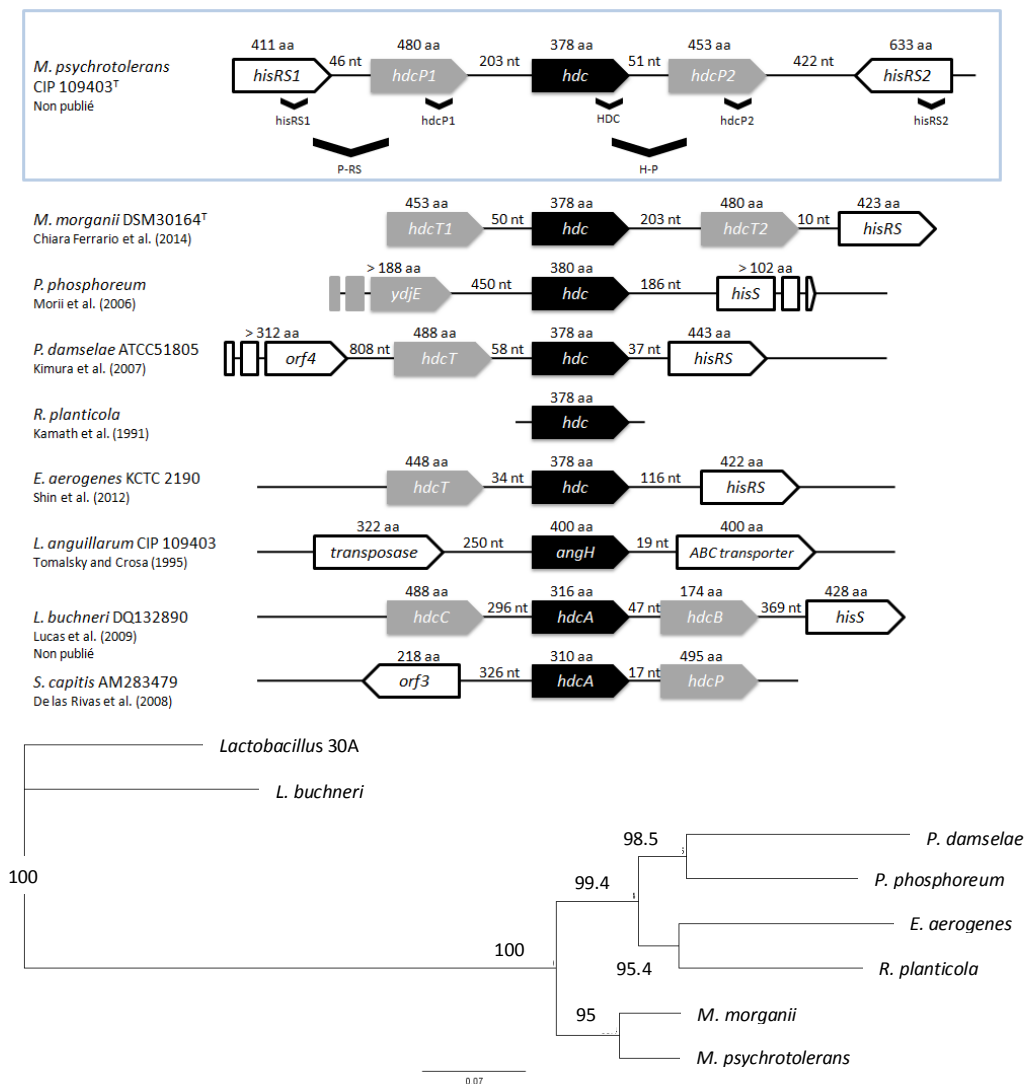
## 1.2. Cluster HDC

Les gènes composant le cluster de l'histidine décarboxylase de *M. psychrotolerans* ont été étudiés après annotation des contigs par le programme RAST. Le gène de l'histidine décarboxylase a été identifié entouré par 3 autres CDS, orientés dans la même direction et un CDS orienté à l'opposé. Nous avons désigné ces CDS sous les appellations suivantes *hisR1*, *hdcP1*, *hdc*, *hdcP2* et *hisR2* (Fig. 43).

Le gène de l'histidine décarboxylase de *M. psychrotolerans* n'a à notre connaissance jamais été décrit au complet dans une étude. Il mesure une taille de 1137 pb, avec un codon d'initiation ATG et un codon stop TAA, caractéristiques qui sont identiques au gène *hdc* de *M. morganii* décrit auparavant (Ferrario *et al.*, 2014). Il code pour une protéine de 378 acides aminés avec une masse moléculaire estimée à 42 640 Da. La séquence déduite du gène *hdc* en acides aminés de *M. psychrotolerans* partage une similarité de 80 à 95 % avec celle de *P. phosphoreum*, *P. damsela*, *E. aerogenes*, *R. planticola* et *M. morganii*.

Comme signalé par d'autres auteurs (Takahashi *et al.*, 2003 ; Landete *et al.*, 2008 ; Kanki *et al.*, 2007), cette enzyme, qui est distribuée parmi les bactéries à Gram négatif, semble avoir évolué partir d'un

gène ancestral commun (Fig. 43). Un même constat a été fait pour le gène *hdc* des bactéries à Gram positif tel que *Lactobacillus* 30A ou *L. buchneri* (Ferrario *et al.*, 2014). Les souches de *Photobacterium* semblent les plus distantes des souches de *Morganella*. Les séquences en acides aminés du gène *hdc* de *M. morganii* et *M. psychrotolerans* sont très proches avec 95% de similarité.



Le CDS de 1443 pb, encodant une protéine de 480 acides aminés (51 590 Da), positionné à 203 nucléotides en amont du gène *hdc* a été identifié comme étant un transporteur d'acides aminés/polyamine (*hdcP1*). Sa séquence nucléotidique est similaire à 88 % à l'*hdcP1* de *M. morgani*, à 82% avec la perméase de *P. damsela* (*hdcT*) et à 73 % par rapport à celle de *K. oxytoca* ou *E. coli*. Un autre gène *hdcP2* ayant la même fonction a été identifié à 51 nucléotides en aval du gène *hdc*. D'une taille de 1362 pb soit 453 acides aminés (48 289 Da), ce gène est très proche du gène *hdcT2* de *M. morgani* avec 85 % d'identité. Comme il a été démontré dans la publication de Ferrario (2014), ce gène se rapproche aussi d'une perméase à acides aminés de *K. oxytoca* (63 % d'identité) et de *R. ornithinolytica* (62%).

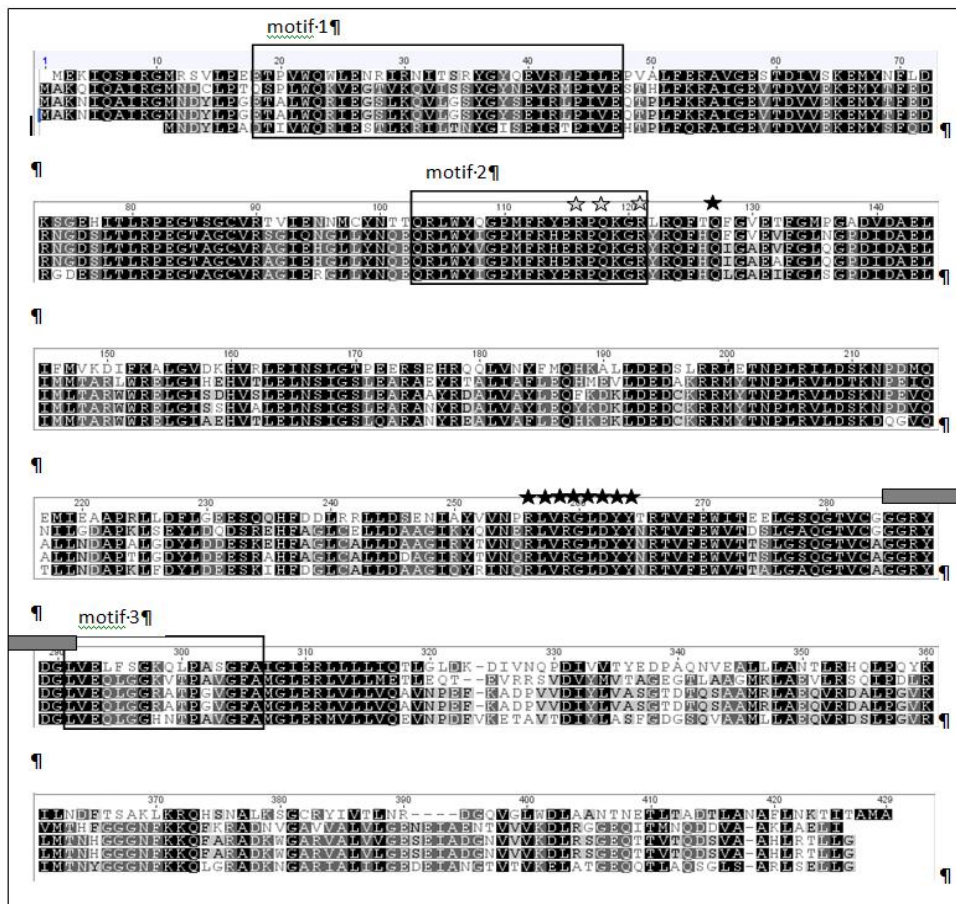


Figure 44 : Alignement des séquences protéiques *hisRS1* de *M. morgani* DSM30164T, *K. oxytoca* 10-5246, *E. aerogenes* KTCT2190, *P. damsela* CIP102567 et *M. psychrotolerans* CIP109403<sup>1</sup>. Les domaines conservés parmi les protéines aminoacyl-ARNt synthétase de classe II sont entourés en noir (motif 1, 2 et 3). Les étoiles noires et la boîte grise indiquent les zones de fixation de l'histidine avec la protéine. Les étoiles grises indiquent les résidus de fixation de la synthétase aux molécules d'histidyl-ARNt définies chez *E. coli*.

Enfin, deux CDS de 1248 et 1902 pb ont été identifiés, codant pour des protéines de 411 et 633 acides aminés, ils ont été dénommés respectivement *hisRS1* et *hisRS2*. Le gène *hisRS1* se trouve à 46 nucléotides en amont du gène *hdcP1*, il est similaire à celui codant pour l'histidyl t-RNA synthétase de *M. morgani*, *K. oxytoca* et *E. coli* à 85, 75 et 74 % respectivement (Fig. 42). Il est donc très proche du gène *hisRS* de *M. morgani* même si sa position dans le cluster reste différente. A l'inverse, le gène *hisRS2* a un sens de lecture opposé aux autres gènes du cluster, l'analyse de cette séquence par Blast a présenté une similarité de 82% avec une autre histidyl-ARNt synthétase de même taille de *M. morgani* KT (Chen *et al.* 2012). A la différence de *M. psychrotolerans*, le gène *hisRS2* de *M. morgani* ne se trouve pas dans le cluster HDC d'après notre analyse des données sur le NCBI. Ceci explique que ce gène n'ait pas été identifié par Ferrario *et al.* (2014), qui a obtenu les gènes du cluster par clonage autour du gène *hdc*.

La comparaison de la protéine *hisRS1* avec d'autres protéines appartenant à des bactéries à Gram négatif a révélé la présence de motifs dédiés aux aminoacyl-ARNt synthetase (Eriani *et al.*, 1995). Les 3 principaux motifs (motif 1 : DTIVWQRIESTLKRLTNYGISEIRTPIVE, motif 2 : QRLWYIGPMFRYERYPQKGR, motif 3 : LVEQLGGHNTPAVGFA) ont été retrouvés sur la protéine *hisRS1*, de même les sites de fixation des molécules d'ARNt et les domaines liés à l'interaction avec l'histidine ont aussi été mis en évidence (Fig. 42). Le peu de données actuellement disponibles sur la protéine *hisRS2* parmi les bactéries productrices d'histamine ne nous ont pas permis d'identifier encore clairement les sites de fixation et les domaines présents chez cette histidyl ARNt synthetase.

## 2. Vérification des amorces et détermination du contrôle interne

### 2.1. Test de spécificité des amorces

Les couples d'amorces synthétisées pour cette étude (Tableau 41) ont été testés séparément sur une concentration de 100 ng d'ARN total de *M. psychrotolerans* et *L. sakei* transformés en ADNc par reverse transcriptase. L'extraction d'ARN réalisée à l'aide du kit UltraClean RNA (MoBio) a permis d'obtenir de bons extraits d'ARN avec des ratios A260/A280 proches de 1.9. De plus deux bandes distinctes représentatives de l'ARN23S et l'ARN16S ont été observées sur gel, confirmant l'intégrité de nos ARN.

Les valeurs de  $C_T$  obtenues après la réaction de qPCR sont indiquées dans le tableau 41. Pour les gènes de biosynthèse, des amplifications spécifiques ont été obtenues sauf pour *ilvC* et *slyD* avec une amplification de *L. sakei* à partir de 35  $C_T$ . Une augmentation de la température d'hybridation



pourrait améliorer la spécificité de ces deux couples d'amorces. Parmi les gènes de ménage ciblés dans cette étude, les gènes *rpoN* et *gyrA* ont aussi été amplifiés chez *L. sakei* et ne seront pas choisis en priorité à moins qu'aucun des autres gènes n'ait un niveau d'expression stable dans différentes conditions environnementales. L'ARNr 16S, *rrs*, est très fortement exprimé par la cellule bactérienne, mais il ne sera pas sélectionné car il n'est pas représentatif des ARN messagers (ARNm).

Enfin concernant les gènes du cluster HDC, ils présentent tous de bons niveaux d'expression qui sont proches des gènes de ménages et de biosynthèse avec des valeurs comprises entre 18.6 et 24.5  $C_T$  (Tableau 41). Comme on pouvait s'y attendre, ces couples d'amorces sont aussi bien spécifiques de *M. psychrotolerans* par rapport aux gènes de la souche *L. sakei* LHS 2885.

**Tableau 41 : Test de spécificité des amorces réalisées sur des gènes de ménage, de biosynthèse et du cluster HDC de *M. psychrotolerans* CIP 109403<sup>T</sup> face à *L. sakei* LHS 2885.**

Gène de référence	$C_T$ <i>M. psychrotolerans</i>	$C_T$ <i>L. sakei</i>
<i>dnaG</i>	23.6 (± 0.2)	ND
<i>priA</i>	17.2 (± 0.1)	ND
<i>polI</i>	23.1 (± 0.6)	ND
<i>polIII</i>	25.9	ND
<i>rpoB</i>	17.2 (± 0.1)	ND
<i>rpoD</i>	18.6	ND
<i>rpoN</i>	22.9 (± 0.3)	32.8 (± 2.6)
<i>gyrB</i>	20.6	ND
<i>gyrA</i>	21.7 (± 0.1)	35.0 (± 0.2)
<i>rrs</i>	7.42 (± 0.2)	30.0 (± 0.3)
<i>IlvY</i>	21.7 (± 0.2)	ND
<i>IlvC</i>	25.8 (± 0.2)	34.4 (± 0.2)
<i>SlyD</i>	25.0 (± 0.1)	35.5 (± 0.4)
<i>CheA</i>	17.2 (± 0.1)	ND
Gène du cluster hdc		
<i>HisRS1</i>	20.5 (± 0.1)	ND
<i>HisRS2</i>	24.5 (± 0.1)	ND
<i>HdcP1</i>	21.0 (± 0.1)	ND
<i>HdcP2</i>	18.6	ND
<i>HDC</i>	18.9	ND
<i>P-RS</i>	20.1 (± 0.1)	ND
<i>H-P</i>	18.6	ND

ND : Non détecté

## 2.2. Détermination du contrôle interne

Afin de déterminer l'expression du cluster de gène *hdc* dans différentes conditions de température et de pH en tampon phosphate, la détermination d'un gène de référence ou contrôle interne a été initiée en fin de thèse. La stabilité des gènes de ménage (*DnaG*, *PriA*, *Poll*, *PollIII*, *RpoB*, *RpoD*, *RpoN*, *GyrB*, *GyrA*, *rrs*) et des gènes de biosynthèse (*IlvY*, *IlvC*, *SlyD*, *CheA*) a été déterminée dans 6 conditions de stress différentes (pH 7 à 4°C, pH 4, 5, 6 ou 7 à 20°C et pH 7 à 30°C).

Malheureusement, aucun gène de référence n'a pu être choisi lors de cette première expérimentation. En effet, l'extraction d'ARN s'est avérée de très mauvaise qualité avec des ratios de pureté A260/A280 inférieurs à 1,0. De même, l'intégrité de l'ARN s'est détériorée avec une dissolution du signal sur les bandes d'ARN 23S et 16S. Des analyses par qPCR de l'expression des gènes *RpoB*, *Poll*, *PollIII* et *RpoD* ont été tentées mais une très forte variabilité de  $C_T$  a été observée entre les triplicats, ne nous permettant pas de déterminer un gène de référence. De nouvelles expérimentations sont en cours pour déterminer le gène de référence. Les moyens employés pour éviter la dégradation de l'ARN sont présentés dans la partie discussion.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

*M. psychrotolerans* est une bactérie psychrotrophe fortement productrice d'histamine, caractérisée par un génome d'une taille de 4 150 937 pb avec un pourcentage en GC de 48 %. Les fonctions des gènes identifiées par le programme d'annotation RAST se rapprochent de celles de *P. mirabilis* qui fait partie de la même famille des *Enterobacteriaceae* (Tableau 40). Dans le cadre de cette thèse, ces données ont été utilisées pour la recherche de gènes cibles pour la mise au point de l'outil de qPCR décrit dans le chapitre II et pour l'étude des gènes du cluster HDC qui fait l'objet du présent chapitre. Une étude plus approfondie du génome est à envisager en collaboration avec l'Université Technique du Danemark. Ces données pourront être comparées à celle du génome de 3 826 919 pb de *M. morganii* KT qui a été récemment séquencé (Chen *et al.*, 2012).

L'analyse du génome de *M. psychrotolerans* nous a permis d'identifier les gènes du cluster HDC qui ont auparavant été obtenus pour *E. aerogenes*, *R. planticola*, *P. damselae* et *M. morganii* par clonage dans des plasmides (Vaaler, *et al.* 1989 ; Kimura *et al.*, 2007 ; Ferrario *et al.*, 2014). Ce cluster est composé de 4 CDS, orientés dans le même sens, l'histidine décarboxylase est encadrée par deux perméases à acides aminés (*hdcP1* et *hdcP2*) avec en amont une histidyl-ARNt synthetase, *hisRS1*. Cette organisation génétique du cluster est très proche de celle observée chez *M. morganii* (Ferrario

*et al.*, 2014). Cependant, un CDS supplémentaire codant, dans le sens opposé, pour une seconde histidyl-ARNt synthétase a été identifié en aval des 4 CDS précédents. Ce gène de 1902 pb a été également retrouvé dans le génome de *M. morganii* KT et dans le génome de *Klebsiella oxytoca* où il se situe à l'écart du cluster de l'histidine décarboxylase.

Le mécanisme de production d'histamine semble reposer sur deux gènes, la perméase qui assure le transport de la L-histidine et l'excrétion de l'histamine, et le gène de l'histidine décarboxylase qui catalyse la réaction enzymatique. Que ce soit dans le génome de *M. psychrotolerans* ou *M. morganii* ou encore celui de *K. oxytoca*, une autre perméase est présente en aval du gène *hdc*. Or, il a été démontré chez *P. damselae* et *P. phosphoreum* qu'une seule perméase peut assurer l'excrétion de l'histamine, l'implication de cette deuxième perméase dans l'excrétion de l'histamine devra être approfondie. Enfin, l'histidyl-ARNt synthétase présente en amont du gène *hdcP1*, n'a pas de rôle clairement défini dans le cluster HDC ; d'après l'étude de Francklyn *et al.* (1998), ce gène peut jouer un rôle de régulateur.

Les données obtenues sur le génome de *M. psychrotolerans* ont également permis de cibler plusieurs gènes pouvant être utilisés comme référence pour l'étude des conditions d'expression du gène *hdc*. Plusieurs études ont déjà démontré qu'il n'existe pas un gène de référence idéal et universel (Vandecasteele *et al.*, 2001; Bustin, 2002; Vandesompele *et al.*, 2002) ; de même, il a aussi été démontré que l'expression des gènes de ménage pouvait aussi varier durant la phase de croissance et après un choc thermique (Vandecasteele *et al.*, 2001; Corbella and Puyet, 2003). L'expression des gènes du cluster HDC a déjà été étudiée chez *P. damselae* et *M. morganii* en utilisant le gène de l'ARNr 16S comme gène de référence (Kimura *et al.*, 2007; Ferrario *et al.*, 2014). Une paire d'amorces pour ce gène a été synthétisée cependant son utilisation comme gène de référence est déconseillée. D'une part, le niveau de transcrite est dépendant de l'état de la bactérie à un instant t (Condon *et al.*, 1995) ; de plus la masse d'ARN extraite est principalement constituée de molécules d'ARNr (95 % de la quantité total d'ARN) et elle n'est alors pas forcément représentative de la fraction d'ARNm. Enfin la normalisation des quantités d'ARNm avec celle d'ARNr pourrait conduire à un biais dans nos analyses car comme on a pu l'observer lors du test de spécificité des amorces, l'expression du gène *rrs* est largement supérieure à celle des autres gènes de biosynthèse ou du cluster HDC (Desroche *et al.*, 2005).

L'utilisation d'un gène de référence appartenant à des gènes de ménage ou des gènes de biosynthèse a donc été choisie en rapport avec les publications sur *Oenococcus oeni* ou *Campylobacter jejuni* (Desroche *et al.*, 2005; Ritz *et al.*, 2009). Nos essais pour déterminer un gène de

référence n'ont pas été fructueux, dus à la faible qualité de nos ARN après extraction et plus particulièrement après traitement par l'enzyme DNase I. Pour palier ce problème, de nouvelles expérimentations ont été entreprises à l'aide d'un nouveau kit d'extraction RNeasy Protect Bacteria MiniKit (Qiagen). Ce kit utilise une solution protectrice qui permet de stabiliser les ARN à un temps souhaité et prévient leur dégradation. De plus, ce kit propose une lyse cellulaire à la fois enzymatique (lysozyme) et mécanique (billes de verre). La combinaison de ces deux méthodes devrait nous permettre d'augmenter l'efficacité de l'extraction d'ARN tout en réduisant le temps de broyage avec des billes de verre qui peut dégrader les ARN et modifier leur niveau d'expression.

Les données disponibles sur le cluster *hdc* permettent également d'envisager d'autres approches pour étudier le fonctionnement de l'histidine décarboxylase chez cette espèce. L'obtention d'une souche de *M. psychrotolerans* avec un gène *hdc* inactivé permettrait de comprendre le rôle de cette enzyme dans l'adaptation de la bactérie à son environnement. Cette méthode a déjà été employée sur une décarboxylase de *L. plantarum* pour révéler d'autres activités enzymatiques (Barthelmebs *et al.*, 2000) mais elle implique que des outils de génétique microbienne soient disponibles et applicables à *M. psychrotolerans* ce qui n'est pour le moment pas documenté.

Le clonage du cluster HDC de *M. psychrotolerans* dans un plasmide et l'étude de son expression dans *E. coli* est une autre piste à envisager. En effet, cette approche permettrait tout d'abord de valider la fonctionnalité des gènes identifiés mais également d'étudier l'impact de l'absence des gènes *hisRS* par exemple ou encore d'un des gènes de perméase.

Cette approche peut permettre également d'envisager la production de l'histidine décarboxylase par voie hétérologue et d'étudier ses caractéristiques comme cela a été proposé pour d'autres bactéries. L'avantage de travailler sur une enzyme produite par expression hétérologue réside d'une part dans une purification plus aisée, qui peut être réalisée par exemple sur des colonnes HisTrap FF (Kanki *et al.*, 2007) et, d'autre part, des quantités d'enzyme plus importantes peuvent être obtenues. La production est plus stable et peut être accélérée par l'ajout d'un promoteur inductible.

L'activité enzymatique de l'histidine décarboxylase a ainsi été analysée de cette façon chez *P. damselae*, *R. planticola*, *P. phosphoreum* et *M. morgani*. Cette étude a révélé une activité importante de l'enzyme entre 20 et 30°C avec un pH compris entre 6,0 et 7,0 et pour un taux de NaCl compris entre 0 et 3 %. Au delà de ces valeurs l'activité de l'enzyme chute rapidement (Kanki *et al.*, 2007). Plus récemment, Ferrario *et al.* (2014) ont également produit une histidine décarboxylase active par voie hétérologue chez *E. coli*.

Ces travaux ont permis de montrer que l'activité de l'*hdc* des bactéries à Gram négatif diminue fortement à un pH inférieur à 5,5 (Kanki *et al.*, 2007). En revanche, le niveau relatif d'expression du gène *hdc* de *M. morgani* est significativement plus élevé en présence d'histidine, en milieu minimum à pH 4,5 (Ferrario *et al.*, 2014). Ce mécanisme peut être assimilé à un mécanisme de défense contre l'acidité de l'environnement car la dégradation de l'histidine permet la libération d'un proton et la mise en place d'une force proton motrice au niveau de la membrane. Ceci permet à la cellule bactérienne de réguler son pH cytoplasmique et d'éviter une lyse cellulaire.

Enfin, l'analyse de l'organisation génomique du cluster HDC devrait conduire à la détermination d'un fonctionnement de ces gènes sous la forme d'un opéron ou de manière indépendante. Pour y parvenir, une recherche des promoteurs en amont du gène *hisRS1* devra être initiée pour retrouver les boîtes de Pribnow (-10) et -35 (TATA). Afin de compléter cette recherche, une analyse par Northern blot serait un plus en utilisant des sondes marquées spécifiques de l'histidine décarboxylase et de la perméase. Suivant la taille des fragments obtenue sur membrane, ils nous permettront d'identifier si des transcrits mono-cistroniques ou poly-cistroniques ou les deux sont observés, ce qui dans le dernier cas validera l'hypothèse d'une organisation génétique sous la forme d'un opéron.

Finalement, en présence de *L. sakei* LHS 2885, *M. psychrotolerans* n'est pas toujours inhibé mais la production d'histamine est toujours moins importante que celle observée par la bactérie histaminogène seule. Les travaux menés pour l'instant n'ont pas permis de montrer si cet effet pouvait être dû à la production d'acide lactique par la bactérie protectrice, et à la diminution du pH qui s'ensuit, ou si d'autres facteurs ont un rôle sur le niveau d'expression ou l'activité de l'histidine décarboxylase. Les études sur la modification de l'expression du gène *hdc* dans une co-culture avec *L. sakei* en présence d'histidine devraient permettre d'éclaircir les mécanismes d'inhibitions de *L. sakei* LHS2885 contre les souches de *M. psychrotolerans*.



## **DISCUSSION FINALE ET PERSPECTIVES**





L'intoxication histaminique est la cause de toxi-infection alimentaire la plus couramment associée à la consommation de poissons. En ce début d'année 2014, le système de référencement RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) a déjà reçu 14 notifications liées à un risque histaminique. Parmi ces notifications, 5 ont été référencées comme un dépassement du seuil de rejet, 6 comme un retrait de lots en magasins et 3 en tant qu'alertes qui ont nécessité une action rapide des autorités sanitaires en France (thon réfrigéré - 2000 mg/kg d'histamine), en Allemagne (thon appertisé à l'huile - 209 mg/kg d'histamine) et en Italie (thon à l'huile de soja - 865 mg/kg d'histamine). En comparaison sur la même période, 6 alertes liées à la présence de plus de 50 UFC/g de *L. monocytogenes* dans du saumon et de la truite fumé ont été notées dans le RASFF. Malgré cela, comme il a été présenté en préambule de l'étude bibliographique, un grand nombre de travaux de recherche sont consacrés à *L. monocytogenes* dans les produits marins, en particulier dans le saumon, la truite fumée ainsi que la crevette alors que, même si elles ont augmenté récemment, moins d'études sur les flores histaminogènes sont disponibles.

Toutefois, les autorités sanitaires Européenne et Américaine s'intéressent de plus en plus à cette problématique. En est pour preuve, la publication d'un avis d'expert encadré par la FAO décrivant en détails les risques pour la santé humaine d'une intoxication histaminique suite à l'ingestion de poissons ou de produits à base de poisson contaminés (Hald, 2011; Helwigh *et al.*, 2012). Ce rapport décrit essentiellement les bactéries histaminogènes connues, la responsabilité et les aspects toxicologiques de chaque amine biogène par rapport aux symptômes observés et la mise en œuvre de nouveaux moyens techniques pour maîtriser le risque. En relation avec ce dernier point, plusieurs procédés ont à ce jour été proposés comme la réfrigération voire la congélation du thon dès sa capture, l'éviscération complétée par un retrait des branchies où des bactéries histaminogènes ont été détectées, ou encore la cuisson des longes pour détruire les bactéries et inactiver l'histidine décarboxylase. Cependant, certains de ces procédés technologiques peuvent avoir un impact sur l'aspect et la qualité organoleptique du produit. Afin de palier ces modifications, l'utilisation d'une méthode de biopréservation, ne modifiant pas les caractéristiques initiales du produit, est également mentionnée.

Cette approche a été évaluée en 2010 par la société Biocéane qui a alors développé le ferment LLO, assurant une maîtrise partielle de la production d'histamine (Cf. Etude bibliographique § 6.8.5). Les industriels de la filière ont montré leur intérêt pour ce procédé ce qui a permis d'élaborer le projet HISTABIO financé par France Agrimer, dans le cadre duquel une partie de ces travaux de thèse ont été réalisés. En nous basant sur les objectifs de la sécurité sanitaire des aliments, nous avons tout

d'abord développé des moyens pour identifier et détecter les bactéries histaminogènes dans plusieurs produits à risque tout en affinant nos connaissances de *M. psychrotolerans*. La suite de nos travaux a été focalisée sur la mise en place d'interactions ciblées entre bactéries histaminogènes et bactéries lactiques pour maîtriser la production d'histamine par biopréservation dans le thon.

### **Caractériser des bactéries histaminogènes et sélectionner des bactéries bioprotectrices des communautés microbiennes des poissons riches en histidine**

Dans notre étude, les bactéries histaminogènes décrites dans le chapitre I ont été isolées selon une approche ciblée dans plusieurs produits marins riches en histidine (thon cru ou fumé, maquereau, sardine et produits responsables d'intoxications histaminiques). A partir des dénombrements de la flore totale et des entérobactéries présentes dans ces produits, les bactéries histaminogènes ont été sélectionnées soit par une méthode colorimétrique (Maijala *et al.*, 1993) couplée à la quantification de l'histamine soit par une méthode de détection du gène de l'histidine décarboxylase par PCR (Takahashi *et al.*, 2003). Au total, 23 souches histaminogènes ont été obtenues. Elles font partie de 3 familles, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, pour lesquelles des espèces productrices d'histamine ont déjà été rapportées, le plus souvent dans du thon mais aussi dans d'autres poissons de la famille des *Scombridae*.

*Morganella morganii* est une des espèces les plus référencées dans ce domaine. Cette espèce a été isolée lors de notre étude dans de la sardine conservée à 20°C (Cf. Chapitre I), ce qui n'est pas étonnant puisqu'elle a été retrouvée dans cette matrice auparavant, mais aussi dans du thon, du maquereau ou encore du mahi-mahi (Dalgaard *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2002a, 2002b; Kimura *et al.*, 2000; Rodtong, 2005; Veciana-Nogués *et al.*, 2004). De même, *M. psychrotolerans*, bactérie psychrotrophe récemment découverte, a été retrouvée dans notre étude sur du thon fumé conservé à 4 et 15°C. Sa présence n'était pas non plus surprenante car elle a justement été identifiée à partir de thon fumé par Emborg *et al.* en 2006. Ainsi, un des points critiques de ces méthodes de criblage est lié à la température de conservation ou d'incubation des produits qui favorisera le développement d'une flore histaminogène psychrotrophe ou mésophile. Or, la majorité des études qui recherchent des bactéries histaminogènes continuent d'utiliser des températures supérieures à 30°C pour leur dénombrement empêchant la croissance de *M. psychrotolerans* et *P. phosphoreum* (Tao *et al.*, 2009).

Actuellement, la recherche de bactéries histaminogènes tend à être effectuée uniquement par détection du gène de l'histidine décarboxylase par PCR (Bjornsdottir *et al.*, 2009; Ferrario *et al.*, 2011). Or, dans notre étude, nous avons montré que certaines souches de *Pseudomonas*, *Aeromonas*

ou *Hafnia* fortement productrices d'histamine ne sont pas détectables par cette méthode. Elles ont pu être sélectionnées grâce à l'utilisation du milieu colorimétrique Maijala modifié et par dosage de l'histamine produite.

Ces résultats montrent qu'il est nécessaire d'affiner les systèmes de détection des bactéries histaminogènes dans les produits riches en histidine, en combinant différentes méthodes. Ils font ressortir également les difficultés pour obtenir un outil de détection par PCR « universel » qui permettrait de détecter l'ensemble des bactéries histaminogènes.

En parallèle de cette approche, les bactéries lactiques colonisant ces écosystèmes ont été recherchées. En effet, de nombreux genres de bactéries lactiques tels que *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* ou encore *Leuconostoc* ont fait l'objet d'études dans le domaine de la biopréservation sur des produits frais ou fermentés à base de viande (bœuf, porc), de vin, mais aussi de poisson (Leroi, 2010; Ghanbari *et al.*, 2013). La plupart de ces travaux montrent qu'il est préférable de sélectionner les bactéries protectrices dans des écosystèmes microbiens identiques ou proches de ceux des bactéries cibles, notamment dans le domaine des produits de la mer, car elles sont mieux adaptées aux matrices dans lesquelles on pourra les utiliser (Leroi, 2010). Lors de nos travaux, la flore lactique de produits frais (maquereau, sardine, thon) et de produits fumés (thon, hareng, maquereau), conditionnés sous atmosphère modifiée ou sous-vide, a été dénombrée après incubation pendant 1 à 2 semaines à 8°C afin de favoriser le développement des bactéries lactiques psychrotrophes. Des colonies bactériennes ont été isolées et leur potentiel bioprotecteur a été testé par la méthode en double couche de Matamoros *et al.* (2009a) sur 4 souches histaminogènes. Par le biais de cette méthode, 27 souches (14%) de bactéries lactiques ont présenté une inhibition de la croissance d'au moins une des bactéries histaminogènes. Douze souches associées aux espèces *C. jeotgali*, *C. alterfunditum*, *L. piscium*, *L. sakei*, *L. fuchuensis*, *L. gelidum* et *V. fluvialis* ont été choisies pour de nos challenge-tests en produits.

*Carnobacterium* et plus particulièrement certaines souches de *C. maltaromaticum* et *C. divergens* inhibent la croissance de *L. monocytogenes* sur du saumon fumé (Brillet *et al.*, 2005; Leroi, 2010; Yamazaki *et al.*, 2003). Dans la plupart des cas, l'inhibition est liée à la production d'une bactériocine (Brillet *et al.*, 2004). En revanche les espèces *jeotgali* et *alterfunditum* sont plutôt décrites dans l'écosystème microbien de la crevette cuite altérée (Jaffrès *et al.*, 2009) ou des produits fermentés à base de crevette (Kim *et al.*, 2009) et n'ont pour l'instant pas été étudiées pour leur potentiel d'inhibition.

L'espèce *Lactococcus piscium* a récemment été mise en valeur dans des procédés de biopréservation sur de la crevette tropicale (Fall *et al.*, 2010a, 2010b; Matamoros *et al.*, 2009b) contre *L.*

*monocytogenes* et des bactéries d'altération dont *Brochotrix thermosphacta*. De plus, son adaptabilité au froid, la rend particulièrement intéressante pour lutter contre les bactéries histaminogènes psychrophiles (Garnier *et al.*, 2010). Elle a aussi été retrouvée dans des produits carnés où elle peut être responsable de l'altération lors du stockage (Rahkila *et al.*, 2012; Sakala *et al.*, 2002a, 2002b).

Le genre *Lactobacillus* est retrouvé dans de nombreux produits alimentaires, fermentés ou non tels le fromage, le vin, le pain au levain, les produits carnés et les produits de la mer. *L. fuchuensis*, initialement isolé de bœuf (Sakala *et al.*, 2002c) a aussi été retrouvé par la suite dans du hareng mariné (Lyhs and Björkroth, 2008).

Un des principes de la sécurité sanitaire des aliments reposent sur l'identification des dangers tout autant que de l'écosystème dans lequel il se développe. Cependant, la plupart des études, traitant des produits responsables des intoxications histaminiques sont uniquement dédiées à la recherche des bactéries histaminogènes (Cf. Etude bibliographique). Peu d'entre elles donnent des informations sur les autres flores microbiennes présentes en même temps que les bactéries histaminogènes en utilisant notamment des approches globales d'études des communautés microbiennes.

Actuellement, seule l'étude d'Alfaro *et al.* (2013) a utilisé des méthodes conventionnelles et moléculaires pour décrire l'évolution de la flore de maquereau frais conditionné sous atmosphère modifiée (48 % CO<sub>2</sub>, 50% N<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>). La flore bactérienne en début de conservation est composée majoritairement de bactéries du genre *Photobacterium*, *Arthrobacter*, *Chrysobacterium* et *Pseudoclavibacter* (> 45%). Au delà de 5 jours de conservation, les bactéries altérantes, *Serratia*, *Shewanella* et *Yersinia* deviennent majoritaires (> 50%). Pour la flore lactique, le genre *Carnobacterium* est majoritaire, et seul le genre *Vagococcus* a aussi été retrouvé en faible proportion dans ce type de produit. Une présence minoritaire du genre *Morganella* a aussi été observée (< 2%). D'après cette étude, on remarque donc que la flore histaminogène est bien présente sur ce type de matrice, il est donc envisageable que dans certaines conditions, cette flore devienne majoritaire et produise d'importantes quantités d'histamine. De même, la colonisation de la matrice par *Carnobacterium* ou la présence de *Vagococcus* conforte notre choix pour ces espèces comme bactéries potentiellement bioprotectrices.

Cependant d'après nos connaissances, la structure des communautés microbiennes du thon et surtout de longes de thon fraîches ou fumées est inconnue. Deux études, employant des méthodes moléculaires de PCR-DGGE et de séquençage de l'ADNr 16S, se sont intéressées soit aux bactéries

pathogènes pour le thon d'élevage en Australie soit à l'évolution des communautés bactériennes durant les 2 premières années de développement de larves de thon (Gatesoupe *et al.*, 2012; Valdenegro *et al.*, 2013). L'étude de Valdenegro *et al.* (2013) a ainsi démontré la présence de bactéries de la famille des *Vibrionaceae* réparties principalement au niveau des branchies. Plus précisément, *Vibrio chagasii* et *P. damsela* subsp. *damsela* ont été identifiés dans les branchies, la rate et les reins de thon moribond, associant leur présence à l'état du poisson. D'autres genres ont aussi été identifiés tel que *Tenacibaculum*, *Pseudoalteromonas* et *Winogradskyella* et prouvent la complexité du microbiote du thon.

A l'identique de nos travaux, des études ciblées se sont intéressées à la présence de bactéries lactiques dans ces produits, identifiant *L. plantarum* et *L. curvatus* dans du hareng fumé (Gancel *et al.*, 1997), *Lactococcus* sp. et *L. fuchuensis* dans des filets de hareng mariné cru (matjesherring) (Lyhs et Bjorkroth, 2008) ou encore *L. alimentarius* dans du hareng mariné (Lyhs *et al.* 2001).

Pour affiner nos connaissances de ces écosystèmes, plusieurs méthodes d'études des communautés microbiennes peuvent être envisagées. Les méthodes d'empreintes moléculaires comme la PCR-TTGE ou la DGGE permettent seulement de détecter les bactéries dont la charge bactérienne représente au moins 1 % de la flore dominante (Macé *et al.*, 2012). La métagénomique est une méthode beaucoup plus sensible qui permet de caractériser à la fois les flores majoritaires et minoritaires. Cette technologie émergente se base sur le séquençage massif d'une région de l'ADNr 16S, les milliers de séquences obtenues sont ensuite classées en OTU (Unité Taxonomique Opérationnelle) où les séquences ayant une similitude de 95 % à 99 % sont regroupées. Ces OTU sont alors identifiés et comparés aux bases de données. Entre 2009 et 2014, cette méthode a permis d'étudier la biodiversité des communautés bactériennes de produits fermentés d'origine végétale (Humblot and Guyot, 2009; Sakamoto *et al.*, 2011; Leite *et al.*, 2012; Nam *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012), d'origine carnée (Ercolini *et al.*, 2011; Nieminen *et al.*, 2012) et d'origine marine (Kessel *et al.*, 2011; Roh *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012). Les études sur l'aliment restent encore assez marginales par rapport aux études sur les communautés microbiennes des sols par exemple, qui se multiplient d'année en année (Acosta-Martinez *et al.*, 2008; Golebiewski *et al.*, 2014; Lauber *et al.*, 2009; Manter *et al.*, 2010; Nacke *et al.*, 2011; Roesch *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2014; Uroz *et al.*, 2010; Will *et al.*, 2010). Néanmoins, grâce à cet outil, nous savons désormais que plus de 13 372 séquences ont été récupérées après pyroséquençage de 7 types de produits marins fermentés révélant la présence de bactéries halophiles et mésophiles en grande majorité (Roh *et al.*, 2009). De même, les études sur le tractus digestif de la carpe ont présenté un nombre d'OTU variant de 259 à 2773 (Kessel *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012) tandis que l'écosystème du tractus digestif du saumon atlantique a été caractérisé

grâce à 297 000 séquences d'ADNr 16S regroupées dans 28 genres bactériens différents (Zarkasi *et al.*, 2014). Les principales études qui se focalisent sur l'aliment ont été effectuées sur les matrices carnées et décrivent un nombre d'OTU similaire variant de 284 à 312 sur du poulet mariné ou non (Nieminen *et al.*, 2012). L'étude d'Ercolini *et al.* (2011) a démontré la colonisation de tranche de porc par *B. thermosphacta* lors de l'altération.

Récemment, le projet ECOBIOPRO a porté sur l'analyse par pyroséquençage de l'écosystème microbien d'altération de 8 produits différents carnés et marins. Cette étude a démontré une forte biodiversité dans les espèces présentes dans les produits marins en comparaison de celles des produits carnés (Chaillou *et al.*, 2013).

Une étude plus poussée sur l'écosystème microbien du thon frais ou fumé par ce type d'approches permettrait entre autre de déterminer la flore dominante à différentes étapes de conservation et donnerait des pistes pour sélectionner préférentiellement certaines espèces de bactéries lactiques pour un procédé de biopréservation. De telles données obtenues à différentes étapes du procédé de fabrication permettraient aussi de mieux comprendre les circonstances de l'implantation des flores histaminogènes et les communautés bactériennes qui leur sont associées.

### **Quantifier les bactéries histaminogènes pour étudier leur occurrence et identifier les phases critiques d'un procédé industriel**

Prévenir la croissance des bactéries histaminogènes dans les produits marins est le meilleur moyen pour éviter la production d'histamine, toutefois la détection et la quantification précoce des bactéries histaminogènes sur le produit ou dans l'environnement de production pourrait contribuer à réduire le risque d'intoxication histaminique, tout en limitant les pertes économiques suite au rappel ou retrait de lots lorsque l'histamine est détectée en trop grande quantité.

Le deuxième objectif de cette thèse était donc de développer une méthode de quantification spécifique de bactéries histaminogènes puisque qu'aucune méthode n'était disponible au début de ce travail de thèse. Cependant, au cours de ces 3 dernières années, des méthodes ciblant ces bactéries et utilisant la PCR quantitative ont été développées par d'autres équipes. En effet, une des premières méthodes mises en place a permis de quantifier les espèces mésophiles *M. morgani*, *R. planticola*, *E. aerogenes* et *P. damsela*e par l'utilisation de sondes spécifiques de fragment du gène de l'histidine décarboxylase jusqu'à une concentration de 3,6 MPN/g (Bjornsdottir-Butler *et al.*, 2011b). Nous avons cependant montré dans nos travaux que toutes les bactéries histaminogènes n'étaient pas détectées par les amorces proposées dans cette étude. Par la suite, une autre méthode

a été développée dans notre laboratoire pour la quantification spécifique de *P. phosphoreum*, bactérie psychrotrophe altérante, mais aussi fortement productrice d'histamine, assurant sa quantification jusqu'à  $10^3$  UFC/g (Macé *et al.*, 2013). Enfin une méthode de PCR quantitative ciblant *M. morganii* a été publiée par Ferrario *et al.* en 2012, sans que sa spécificité pour cette espèce n'ait été clairement démontrée. Nous avons donc réorienté notre objectif, d'une part en ciblant de façon plus spécifique *Morganella psychrotolerans* et *morganii* et d'autre part, en travaillant sur le seuil de détection de la méthode qui reste souvent trop élevé en PCR quantitative dans les denrées alimentaires. Une méthode de PCR quantitative spécifique et sensible a ainsi été mise au point par l'amplification du gène *vasD* de *M. psychrotolerans* et du gène *galK* de *M. morganii*. Cette méthode permet de quantifier de  $10^4$  à  $10^9$  UFC/g de ces bactéries en produits marins. Ce seuil de sensibilité étant insuffisant pour détecter les bactéries histaminogènes lors de la contamination (+/- 10 à 100 UFC/g), une méthode d'enrichissement spécifique du genre *Morganella* a été mise en place améliorant le seuil de sensibilité jusqu'à 50 UFC/g. La quantification des bactéries pathogènes dans les aliments est un élément prépondérant de la sécurité sanitaire des aliments. La recherche de nouvelles méthodes de détection/quantification spécifiques, sensibles et rapides est donc très importante. Nous avons proposé un nouveau moyen de quantifier des bactéries à risque en combinant à la fois une méthode d'enrichissement en milieu liquide (MoE) avec une méthode de quantification qui s'appuie sur les taux de croissance de *M. morganii* et *M. psychrotolerans* et qui pourrait être envisagée pour d'autres pathogènes. En effet, pour les bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *Salmonella* ou encore *E. coli* O157:H7 les méthodes relatives à de la PCR en temps réel emploient en amont une méthode d'enrichissement qui améliore la sensibilité de la méthode jusqu'à 7,5 UFC/ml de lait, 9 UFC/15g de saumon et 1 UFC/15g de pâté ou de fromage (bleu) pour *L. monocytogenes*, 2.5 UFC/25g de saumon et produits carnés et 5 UFC/25g/ml de poulet et lait pour *Salmonella*, ou jusqu'à 12 équivalents génomes pour *C. jejuni* et 1 à 10 cellules/ml pour *E. coli* O157:H7 (Bhagwat, 2003; Hein *et al.*, 2006; Nam *et al.*, 2005; Ogrady *et al.*, 2009; Rossmannith *et al.*, 2006; Rudi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004). De la même façon, la méthode proposée par Bjornsdottir-Butler *et al.* (2011b) permet de détecter les bactéries histaminogènes jusqu'à 3.6 MPN/g de poisson grâce à un enrichissement de 24 h à 35°C. Le point commun entre toutes ces méthodes est qu'elles permettent une détection pour des seuils initiaux relativement bas, mais aucune ne propose de quantification. La méthode développée dans cette thèse permet au contraire de quantifier les deux espèces de *Morganella* à des taux inférieurs à  $10^3$  ou  $10^4$  UFC/g, en utilisant les outils développés pour les modèles de croissance bactérienne. Dans le cas de *M. morganii*, le temps d'incubation dans le milieu d'enrichissement a pu être réduit à 8 h, ce qui est bien inférieure aux méthodes d'enrichissement des bactéries pathogènes classiques comme *L. monocytogenes*, *C. jejuni*,

*Salmonella* pour lesquelles les temps d'enrichissement sont compris entre 16 h et 24 h. Pour *M. psychrotolerans* l'enrichissement est relativement long car il doit être réalisé à 10°C pour favoriser la croissance de *M. psychrotolerans* lorsqu'elle est en présence de *M. morganii*, le milieu développé ne permettant pas de différencier les deux espèces. Des essais complémentaires en co-culture avec *M. morganii*, pour déterminer les interactions et l'effet sur les taux de croissance pourront être poursuivis à 25°C pour réduire le temps d'enrichissement à moins de 24 h. La spécificité de la méthode de PCR quantitative sera alors déterminante pour séparer ces 2 espèces bactériennes. Le principe utilisé pour quantifier les faibles concentrations de *Morganella* pourrait s'appliquer pour d'autres bactéries d'intérêt, comme *Listeria monocytogenes* dans le milieu de Fraser, dans la mesure où il est possible de déterminer une relation entre la concentration initiale et le niveau de population obtenu après un temps donné d'enrichissement en milieu sélectif.

Grâce à ces méthodes, il nous est possible de quantifier les principales bactéries histaminogènes dans les produits marins à des concentrations faibles qui s'avèrent très intéressantes pour prévenir la formation d'histamine sur un procédé industriel. En effet, même si la production d'histamine ne s'opère qu'à partir d'une charge bactérienne de  $10^5$  à  $10^6$  UFC/g, il devient possible avec les méthodes développées dans ce travail, qui quantifient entre quelques UFC/g et  $10^3$  UFC/g, de détecter en amont du procédé de transformation un produit à risque qui peut être réorienté vers d'autres types de production. De même, l'utilisation de cette méthode pourrait permettre de déterminer les phases critiques d'un procédé industriel par rapport à la contamination par les bactéries histaminogènes, en partant de la capture du poisson jusqu'à son arrivée dans le réfrigérateur du consommateur. Certaines phases comme la décongélation des longes et la rupture de la chaîne du froid sont propices au développement des bactéries histaminogènes, mais actuellement aucune traçabilité de ces bactéries n'est possible pour les industriels.

### **Approfondir l'analyse du génome de *M. psychrotolerans* et la compréhension des mécanismes biologiques**

Avant ce travail de thèse, peu de données étaient disponibles sur *M. psychrotolerans*. Par rapport à *M. morganii*, qui est une espèce mésophile capable de pousser à 37°C avec un taux de NaCl de 8,5% (V/V), *M. psychrotolerans* est une bactérie ne se développant pas à 37°C et à une concentration supérieure à 6% en NaCl, mais capable de produire de l'histamine à partir d'une concentration cellulaire de  $10^6$  UFC/g en produits de la mer et ce jusqu'à 0°C. *Morganella psychrotolerans* constitue avec *P. phosphoreum* les deux seules espèces histaminogènes psychrotrophes actuellement décrites.



Une comparaison de la séquence de 7 gènes de ménages entre 9 souches de *M. morgani* et 13 souches de *M. psychrotolerans* a révélé une similarité moyenne de 88,7 % entre ces gènes (Emborg *et al.* 2006), mais aucune autre donnée génomique n'est disponible sur ces deux espèces.

Grâce à une collaboration avec l'Université Technique du Danemark qui avait initié le séquençage et l'annotation des génomes de *M. psychrotolerans* et *M. morgani* à l'aide du logiciel d'annotation RAST, nous avons pu avoir accès à ces données pour développer la méthode de PCR quantitative spécifique de *M. psychrotolerans* décrite dans le chapitre II. L'analyse des données a permis de mettre en évidence un fragment du gène *vasD* appartenant au système de sécrétion de type VI absent du génome de *M. morgani*. Cette région a donc été sélectionnée pour dessiner un couple d'amorces spécifiques. Le système de sécrétion de type VI a été décrit pour la première fois chez la bactérie pathogène *Vibrio cholerae* (Bingle *et al.*, 2008; Pukatzki *et al.*, 2009, 2006). Ce système est présent dans ¼ des génomes de bactéries à Gram négatif qui ont été séquencés. Sa structure se rapproche de la queue d'un bactériophage, ce qui permet à la bactérie exprimant ce système de s'accrocher à une cellule cible eucaryote ou procaryote, de perforer sa membrane et d'excréter différents effecteurs dans son cytoplasme. La fonction de ce système de sécrétion reste encore assez floue, on lui attribue des phénomènes d'antagonisme entre bactéries, de pathogénicité, ou de résistances à des stress environnementaux. Plus récemment, des transferts de molécules antibactériennes ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. syringae*, *V. cholerae* (Coulthurst, 2013; Decoin *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2011). Chez *M. psychrotolerans*, ce système est composé de 18 gènes soit le maximum de gènes formant ce système de sécrétion qui vont donc de 18 gènes chez *V. cholerae* à 10 gènes chez *Shewanella frigidamarina*. D'après l'analyse RAST, le système est fonctionnel, il reste cependant à déterminer son utilité pour *M. psychrotolerans*, ce qui se traduira par une comparaison de ces gènes orthologues avec les bases de données, la localisation des îlots génomiques, l'analyse des motifs, des signaux peptidiques et des associations protéines-protéines qui permettent la formation du complexe au niveau de la membrane bactérienne (Douzi *et al.*, 2014; Shrivastava and Mande, 2008).

Peu d'études ont porté sur la compréhension des mécanismes de formation de l'histamine au niveau moléculaire. L'organisation génétique du cluster HDC de *M. psychrotolerans* a été décrite pour la première fois dans le chapitre III. Ce cluster est composé du gène codant pour l'histidine décarboxylase encadré par deux gènes (*hdcP1* et *hdcP2*) codant pour des perméases à acides aminés et enfin en amont de ces gènes, une histidyl-tRNA synthétase a été identifiée (*hisRS1*). Un autre gène codant pour une histidyl-tRNA synthétase a été repéré en aval du cluster (*hisRS2*). La structure de ce

cluster est similaire à celle de *M. morgani* et *K. oxytoca* (Ferrario *et al.*, 2014). Elle se rapproche aussi du cluster de *P. phosphoreum*, *P. damselae*, *R. planticola* et *E. aerogenes* (Kamath *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 2009; Morii *et al.*, 2006). Il ressort des études sur *P. damselae*, *P. phosphoreum* et *M. morgani* que tous les gènes du cluster sont surexprimés en condition de stress acide et uniquement en présence d'histidine (Ferrario *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2009; Morii and Kasama, 2004). Nous avons au contraire montré dans le chapitre I qu'en présence de *L. sakei*, une bactérie lactique productrice d'acides organiques et plus particulièrement d'acide lactique, une inhibition de la production d'histamine a été observée, ce qui suggère que d'autres mécanismes que ceux décrits dans les travaux précédents interviennent. Afin de compléter nos données sur ce groupe de gènes, et l'enzyme produite, l'étude de l'activité enzymatique dans différentes conditions environnementales, notamment en présence de *L. sakei* ou de ses métabolites est à envisager. Elle passera probablement par l'expression hétérologue du cluster HDC dans un plasmide puisqu'il a été montré que cette approche permettait la production d'histidine décarboxylases actives (Kanki *et al.*, 2007).

*M. psychrotolerans* et *M. morgani* bien que très proches, se distinguent par leurs températures cardinales de croissance qui sont très différentes. L'analyse des données génomiques peut également apporter des réponses sur les propriétés de croissance au froid de cette espèce bactérienne. Les protéines de la famille des CSP (Cold Shock Protein) sont majoritairement produites en cas de choc froid dans la plupart des microorganismes (Piette *et al.*, 2011; Shivaji and Prakash, 2010). Chez certains organismes psychrophiles comme *Pseudomonas fragii* (Hebraud *et al.*, 1994) ou *Arthrobacter globiformis*, des protéines de ce type sont surexprimées de manière continue lors de la croissance à basse température. Elles sont appelées protéines d'adaptation au froid (CAPs, cold adaptation proteins) (Barria *et al.*, 2013). Ces protéines ont été plus particulièrement étudiées chez les bactéries à Gram positif tels que *L. lactis*, *L. piscium* et *L. sakei* (Garnier *et al.*, 2009; Wouters *et al.*, 2001). Les données de séquençage du génome permettront d'approfondir les connaissances relatives aux mécanismes d'adaptation au froid de *M. psychrotolerans* qui peuvent également constituer une cible pour limiter la croissance de cette bactérie et sa formation d'histamine.

## **Utiliser *L. sakei* LHS2885 pour maîtriser la formation d'histamine et l'appliquer dans un procédé industriel**

L'espèce *L. sakei* a fait l'objet de nombreuses études dans le domaine de l'aliment. Cette espèce bactérienne a été retrouvée dans des produits carnés crus (Jambon, tranches de porc, saucisse) ou fermentés (saucissons), identifiée en tant que flore d'altération de produits de la mer comme les harengs ou les crevettes marinés, ou comme flore protectrice dans du saumon (Hu *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2011; Lyhs and Björkroth, 2008; Mejlholm *et al.*, 2008; Teixeira de Carvalho *et al.*, 2006). Elle est également décrite dans des produits d'origine végétale tels que du riz mariné où elle a été définie comme la flore majoritaire et, enfin, dans du levain et du Kimchi (Weiss and Hammes, 2006).

L'omniprésence de *L. sakei* dans de multiples environnements peut s'expliquer par ses capacités à produire de l'énergie grâce à différentes voies métaboliques. Cette bactérie auxotrophe utilise principalement le glucose comme source de carbone. Cependant, afin de se développer dans le thon où la proportion d'hydrates de carbone est nulle, *L. sakei* s'appuie probablement sur le métabolisme de l'arginine, molécule présente abondamment dans cette chair. De plus, *L. sakei* est aussi capable de cataboliser l'inosine et l'adénosine qui peuvent aussi représenter une source d'énergie alternative. Enfin, cette bactérie lactique est psychrotrophe et résistante au sel grâce à la présence dans son génome de 4 protéines de choc froid de la famille des CspA, de 3 systèmes ABC d'absorption associés à un symporteur sodium dépendant (Chaillou *et al.*, 2005; Claesson *et al.*, 2006).

*L. sakei* est reconnu pour avoir des propriétés bioprotectrices face aux bactéries pathogènes présentes sur divers aliments. Dans les produits carnés, l'application de trois souches de *L. sakei* préparées en cocktail a également été brevetée par l'institut Micalis de l'INRA le 13 Août 2012, sous la référence FR1257785 (Chaillou *et al.*, 2009, 2014; Lucquin *et al.*, 2012). Ces souches permettent de lutter contre plusieurs espèces bactériennes d'altération du carpaccio de bœuf, notamment *Brochothrix thermosfacta*, *Hafnia* et *Pseudomonas*. Hormis ce brevet, *L. sakei* a aussi été employé pour lutter contre les bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes* et *E. coli* O157:H7 (Ammor *et al.*, 2005; Bredholt *et al.*, 2001; Katla *et al.*, 2001, 2002; Leroy and Vuyst, 1999; Urso *et al.*, 2006; Vermeiren *et al.*, 2006).

Dans les produits marins, l'effet bioprotecteur de cette espèce a également été testé sur de la truite par Katikou *et al.* (2007), qui a démontré une augmentation de la durée de vie du produit au niveau sensoriel. De plus, la croissance des entérobactéries naturellement présentes dans la chair a été

réduite de 2 log UFC/g, tout en observant une réduction de la synthèse d'amines biogènes (putrescine et cadavérine). Des résultats similaires dans notre étude ont été observés pour *L. sakei* LHS2885 qui a démontré un fort potentiel bioprotecteur assurant la préservation de matrices à base de thon au niveau sensoriel et histaminique contre les bactéries *M. morganii* et *M. psychrotolerans*. Leur nombre total a été réduit de 3 à 5 log UFC/g par rapport aux échantillons sans la souche protectrice. Aucune autre étude n'a encore porté sur les activités antimicrobiennes de *L. sakei* (ou d'autres bactéries lactiques) contre une flore histaminogène. Une étude a cependant travaillé sur la réduction des amines biogènes dans des saucisses par l'utilisation d'une souche de *L. sakei* qui a permis de réduire la concentration en tyramine, putrescine et cadavérine (Bover-Cid *et al.*, 2001). L'ensemble de ces travaux démontre le potentiel de cette espèce dans la lutte contre les bactéries altérantes ou pathogènes.

Le mécanisme d'action le plus souvent associé à cette espèce correspond à la production de bactériocines, essentiellement des sakacines (Gálvez *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Vermeiren *et al.*, 2004). En dehors des travaux sur les bactériocines, peu de travaux font référence aux autres mécanismes d'inhibition. Nilsson *et al.* (2005) est un des rares à avoir mis en évidence une inhibition de *L. monocytogenes* par compétition nutritionnelle pour le glucose avec *C. maltaromaticum*. *L. sakei* LHS2885 étant une bactérie liée à un dépôt de brevet, il pourra être envisagé de séquencer le génome de cette souche pour rechercher des gènes liés à la production de bactériocines, ou d'autres mécanismes pouvant être impliqués dans l'inhibition. L'obtention d'une inhibition en milieu de culture liquide serait aussi utile pour l'étude des mécanismes et pourrait se baser sur la mise au point d'un milieu se rapprochant de la composition chimique du thon tel que le milieu jus de thon utilisé pour cribler les activités antimicrobiennes dans le chapitre I.

D'un point de vue réglementaire, de nombreuses discussions ont été initiées depuis 2006 au niveau de la commission Européenne pour définir les critères de classement des cultures bioprotectrices pour les aliments. Il a été proposé que ces cultures soient classées comme ingrédient ou additif alimentaire. Actuellement, le statut d'ingrédient ne s'applique qu'aux cultures « starters » utilisées pour la fermentation ou pour un effet probiotique, et cela uniquement si elles étaient utilisées avant mai 1997. L'application de la culture bioprotectrice *L. sakei* LHS2885 ne relève pas du règlement sur les additifs alimentaires qui ne prend pas en compte les souches bactériennes (Règlement 1333/2008). Pour l'instant, l'utilisation de cette souche pour lutter contre les bactéries histaminogènes dans les produits de la mer relève de la réglementation générale sur la sécurité des aliments (Règlement 178/2002). Récemment, un groupe d'expert au sein de la commission

Européenne a mis en avant la nécessité d'instaurer une réglementation spécifique aux ferments de bioprotection ce qui facilitera probablement le développement industriel des flores bioprotectrices.

L'application industrielle d'une culture bioprotectrice impose cependant le respect de certaines conditions sanitaires dont la plus primordiale est son innocuité envers l'Homme. L'EFSA a mis en place en 2007, le statut QPS (Qualified Presumption of Safety) semblable au statut GRAS (Generally Recognized as Safe) fourni aux USA. Parmi le genre *Lactobacillus*, seule l'espèce *L. rhamnosus* fait l'objet d'une surveillance suite à la mise en évidence d'infections chez des patients immunodéprimés. L'espèce *L. sakei* a la qualification QPS depuis 2007. Elle est considérée comme un ingrédient alimentaire lors de la préparation d'un produit (EFSA, 2013) et fait aussi partie de la liste des bactéries présentant un intérêt technologique proposée par Bourdichon *et al.* (2012).

D'autres facteurs dont l'antibiorésistance de la souche sont à prendre en compte pour établir son innocuité. Pour toutes les bactéries, l'évaluation systématique de la présence ou de l'absence de déterminants de résistance aux antibiotiques est requise pour l'évaluation du statut QPS. De plus, d'après l'avis énoncé par un groupe d'experts de l'EFSA en 2008 (FEEDAP), il est important d'effectuer une distinction entre résistance intrinsèque et acquise. Le FEEDAP a ainsi défini des valeurs critiques pour les 10 antibiotiques les plus couramment utilisés en thérapeutique humaine et vétérinaire. La souche *L. sakei* LHI2885 ne devra pas présenter de résistance à un antibiotique hormis s'il est démontré que cette résistance est liée à une ou plusieurs mutations chromosomiques. En effet, il est important d'effectuer ces tests car plusieurs études révèlent la présence de déterminants localisés sur des plasmides ou des transposons codant des résistances à la tétracycline par exemple et disséminés dans diverses espèces de bactéries isolées d'aliments telles que *L. curvatus*, *L. plantarum* et *L. sakei* (Aymerich *et al.*, 2006; Zonenschain *et al.*, 2009).

Un autre facteur déterminant pour l'innocuité repose sur l'absence de production d'amines biogènes dans l'aliment. Bien que les bactéries à Gram négatif soient les principales responsables de la production d'histamine dans les produits marins, les bactéries à Gram positif ont aussi la capacité de produire de l'histamine ou d'autres amines biogènes en particulier lors des procédés de fermentation. Il est donc essentiel de vérifier la capacité des ferments à produire des amines biogènes. Dans le cas de *L. sakei*, une production de tyramine a été noté dans des matrices carnées mais aucune production d'histamine n'a été observée (Katikou *et al.*, 2007). A l'inverse, lors de la préparation de saucisses fermentées, la présence de *L. sakei* a conduit à une réduction des quantités de tyramine et putrescine, des résultats similaires mais affectant les concentrations en histamine ont été observés lors de procédés d'ensilage (Dapkevicius *et al.*, 2000). Dans nos travaux, la croissance en

culture pure de *L. sakei* LHIS2885 dans du thon cuit ne conduit pas à la production d'histamine ou d'aucune autre amines biogènes et nous avons montré son efficacité pour réduire l'histamine produite par *Morganella*.

En complément de l'innocuité, l'application industrielle d'une souche peut demander quelques caractéristiques supplémentaires. La souche LHIS2885 a notamment montré de bonnes aptitudes de croissance à température réfrigérée sur du thon cuit à 4°C en présence de *M. psychrotolerans*. Cette propriété déjà connue chez *L. sakei* fera l'objet de recherches plus approfondies en laboratoire qui permettront de déterminer ses températures cardinales de croissance. Cette faculté est en outre, un critère de sélection parmi les bactéries lactiques car peu d'entre elles sont capables de s'adapter à des températures réfrigérées (Hamasaki *et al.* 2003). De plus, en amont d'une utilisation à l'échelle industrielle, les conditions de culture pourront être optimisées pour favoriser sa croissance, afin de faciliter sa préparation pour le procédé de biopréservation. L'optimisation permettra aussi de s'assurer la production de cellules bactériennes en quantité suffisante pour un procédé industriel qui s'appuie sur des tonnes de longes et non plus quelques kilogrammes. De même, sa résistance à la congélation, au séchage et à la lyophilisation qui sont utilisés dans la technologie de production de ferments devra être étudiée. D'après nos challenge-tests incluant une étape de congélation de 48 h à -20°C, on peut supposer que cette souche résiste bien à la congélation pendant un temps limité car aucune baisse de la concentration bactérienne n'a été observée.

Ces étapes qui ne doivent en aucun cas réduire les capacités bioprotectrices de la souche, sont essentielles pour valoriser auprès des industriels, la souche et le brevet qui protège son application.

### **Pour finir**

Les travaux menés ces 3 dernières années sur les bactéries histaminogènes ont permis de mettre en place une nouvelle thématique de recherche au laboratoire EM<sup>3</sup>B d'Ifremer et au laboratoire de l'UMR1014 Secalim qui recherchent activement de nouveaux moyens pour garantir la qualité et la sécurité microbiologique des produits de la mer par des procédés innovants.

L'utilisation de méthodes de criblage en milieu de Maijala et de détection des bactéries histaminogènes par amplification du gène de l'histidine décarboxylase ont permis de mettre en place une collection de bactéries histaminogènes représentatives pour de futurs travaux.

Par ailleurs, de nouvelles souches de bactéries lactiques appartenant aux genres *Carnobacterium*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc* ont été identifiées dans des produits riches en histidine et ont montré

des capacités bioprotectrices face à des bactéries histaminogènes, ce qui n'avait jamais été montré dans la bibliographie.

Par le biais de challenge-tests sur des produits à base de thon, une bactérie lactique *L. sakei* LHS2885 a démontré un fort potentiel bioprotecteur inhibant la croissance du genre *Morganella*. Dans un souci de valorisation, cette souche et ce procédé ont été brevetés et des applications industrielles sont à l'étude.

Afin d'étudier l'occurrence des bactéries histaminogènes lors d'un procédé industriel, et pour déterminer les phases critiques où la contamination et le développement de ces espèces pourraient être observés, deux méthodes de PCR quantitative en temps réel sensible et spécifique de *M. psychrotolerans* ou *M. morganii* ont été développées. Ces méthodes couplées à un enrichissement pendant un temps donné permettent d'abaisser le seuil de quantification jusqu'à 50 UFC/g. Elles sont prêtes à être utilisées par les industriels ou les laboratoires de recherche publique qui souhaitent affiner leurs connaissances sur la présence de ces bactéries.

Enfin, des travaux ont été débutés en fin de thèse sur l'organisation génétique du cluster HDC chez les deux espèces de *Morganella* identifiant 5 gènes impliqués dans le mécanisme de décarboxylation de l'histamine. L'étude de l'expression de ces gènes est actuellement en cours au laboratoire EM<sup>3</sup>B.





## **ANNEXES**



## Valorisation du travail sur la biopréservation

### Dépôt d'un brevet d'invention

Au sens de la propriété industrielle, le brevet protège une invention technique, c'est à dire un procédé qui apporte une nouvelle solution technique à un problème donné. Il est possible de breveter des produits (molécules chimiques ou biologiques, protéines, microorganismes), des procédés (méthode de détection analytique) et des applications (procédé connu mais utilisé pour une nouvelle application). Pour déposer un brevet, l'invention doit être originale, c'est à dire qu'aucune étude antérieure (brevet, publications scientifiques, conférences ou posters) ne doit porter sur le produit, le procédé ou l'application que l'on souhaite protéger.

L'intoxication histaminique est la toxi-infection alimentaire la plus couramment associée aux poissons. Cette intoxication est un problème récurrent pour les industriels. Le projet Histabio qui a porté sur la faisabilité de l'inhibition de la formation d'histamine dans le thon par la biopréservation en relation avec des conserveries est bien la preuve que les industriels recherchent des moyens pour réduire le risque histaminique dans leurs produits.

La valorisation de nos travaux sur la biopréservation du thon face aux bactéries histaminogènes a été décidée en Juin 2012 par la rédaction de la déclaration d'invention qui a été transmise à la cellule de valorisation d'Ifremer. Cette déclaration d'invention permet de protéger ses travaux dès réception par l'INPI. Dans notre cas la déclaration d'invention a été déposée en Novembre 2012. Pendant la période précédant le dépôt, des recherches ont été menées pour s'assurer de l'originalité de nos travaux en parcourant les bases de données recensant les brevets de l'échelle nationale à l'échelle internationale tout en parcourant les publications scientifiques en rapport avec ce sujet.

Suite à la déclaration d'invention, le cabinet de propriété industrielle ICOSA a été contacté pour la rédaction du brevet d'invention et son expertise auprès de l'INPI. En parallèle, la souche d'intérêt a été déposée auprès de la CNCM (collection nationale de culture de microorganismes de l'Institut Pasteur) sous la notation, *L. sakei* CNCM-I4704. Le projet publique HISTABIO s'est terminé fin 2012, il était donc impératif de déposer rapidement le dossier du brevet sans quoi l'antériorité des résultats pouvait être mise en doute. Tous les résultats se doivent de rester strictement confidentiels jusqu'au dépôt du brevet. Après de nombreux échanges entre la cellule de valorisation d'Ifremer, le cabinet ICOSA et les inventeurs, le brevet a été déposé le 23 Avril 2013.

Suite au dépôt, le brevet est expertisé par l'INPI, qui fournit 9 mois plus tard un rapport préliminaire présentant les publications faisant défaut sur l'originalité, ou sur les modalités de dépôt du brevet. Ce rapport vient de nous parvenir, une réponse formulée par le cabinet ICOSA est en cours d'étude.

Suite à cette réponse, si notre invention reste brevetable, une extension de la protection est proposée pour étendre la portée de l'invention en Europe voire à l'international.

Enfin, des acteurs de la filière ayant potentiellement un intérêt pour notre invention sont actuellement recherchés pour débiter l'application de nos travaux.

## DEPOT D'UN BREVET D'INVENTION SUR LA SOUCHE *L. SAKEI* CNCM I 4704

### UTILISATION DE *LACTOBACILLUS SAKEI* POUR LA BIOPRESERVATION DES PRODUITS DE LA MER

#### DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne la biopréservation des produits alimentaires, de préférence des produits de la mer. Plus spécifiquement, la présente invention concerne la souche bactérienne *Lactobacillus sakei* LHS2885 et son utilisation pour limiter la formation d'histamine dans les produits alimentaires, de préférence les produits de la mer.

#### ÉTAT DE LA TECHNIQUE

Les produits de la mer sont responsables de 10 à 20% des intoxications alimentaires humaines. Parmi celles-ci, l'histamine est la première cause de toxi-infections liées à la consommation de poisson. Ainsi, 30 à 40% des épidémies liées à la consommation de poisson sont dues à l'histamine. Cette toxi-infection se traduit par des symptômes cutanés (rougeurs, urticaires), neurologiques (maux de tête), gastro-intestinaux (diarrhées, vomissements), palpitations et œdèmes pouvant parfois conduire à l'hospitalisation et au décès de patients fragilisés.

Les intoxications histaminiques sont liées à la consommation de poissons riches en histidine (tels que, par exemple, le thon, le maquereau, la sardine ou l'anchois) et contaminés par des concentrations en histamine supérieures à 500 mg/kg.

L'histamine est formée dans des poissons riches en histidine par une enzyme bactérienne, l'histidine décarboxylase. L'histamine étant résistante à la cuisson, à l'appertisation, au fumage et à la congélation, la lutte contre les toxi-infections causées par l'histamine implique l'inhibition de la production de cette amine biogène, par exemple via l'inhibition du développement de bactéries productrices d'histamine sur les produits, ou via l'inhibition de l'histidine décarboxylase.

L'histamine peut être formée par des espèces bactériennes mésophiles, à des températures supérieures à 7-10°C. Ces dernières sont cependant incapables de former de l'histamine à des températures comprises entre 0-5°C, c'est-à-dire la température requise pour la conservation des

produits de la mer selon les normes américaines ou européennes. Cependant, des études récentes ont démontré l'existence de bactéries psychrotolérantes fortement productrices d'histamine entre 0 et 5°C (Emborg *et al.*, 2005; Kanki *et al.*, 2004). Des exemples de ces bactéries sont *Morganella morganii* et *Morganella psychrotolerans* qui a été récemment isolée par l'équipe de Paw Dalgaard (Emborg *et al.*, 2006).

La formation d'histamine en cas de rupture de chaîne du froid et même à des températures recommandées pour le stockage des produits de la mer représente donc un problème majeur pour les industriels de la pêche.

L'une des stratégies de lutte contre la contamination des produits alimentaires concerne la biopréservation. La biopréservation correspond à l'ajout au produit de microorganismes sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de microorganismes indésirables, responsables de l'altération du produit ou inducteurs de pathogénicité. L'ajout de ces microorganismes peut ainsi permettre d'augmenter la durée de conservation du produit et de préserver ses propriétés organoleptiques.

Ainsi, par exemple, le brevet américain US 5,576,035 décrit l'utilisation de bactéries pour la préservation de produits alimentaires, notamment de la viande. D'autre part, le brevet européen EP 1 456 350 décrit l'utilisation d'une souche de bactérie lactique, *Lactococcus lactis*, pour la conservation des produits de la mer.

Cependant, à la connaissance de la Demanderesse, aucun procédé de biopréservation n'a été décrit à ce jour, permettant de prévenir ou de maîtriser la production d'histamine dans les produits de la mer.

Lors de ses recherches d'un ferment pouvant être utilisé dans un tel procédé de biopréservation, la Demanderesse a identifié et isolé la bactérie *Lactobacillus sakei* LHIS2885. L'addition de cette bactérie sur un produit alimentaire, de préférence un produit de la mer, tel que, par exemple, un poisson cuit, permet, de façon surprenante, de réduire la production d'histamine dans celui-ci. De plus, cet effet est observé non seulement à la température de préservation habituelle, c'est-à-dire 4°C, mais également à une température de 15°C, ce qui permet de protéger le produit d'une contamination à l'histamine également en cas de rupture de la chaîne du froid.

## RÉSUMÉ

La présente invention concerne donc l'utilisation d'une souche de *Lactobacillus sakei*, de l'un de ses fragments ou d'une composition la comprenant pour la conservation de produits alimentaires, de préférence de produits de la mer. Selon un mode de réalisation de l'invention, la production d'histamine dans lesdits produits alimentaires est inhibée. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la croissance de bactéries histaminogènes dans lesdits produits alimentaires est inhibée.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les produits alimentaires sont des produits de la mer, de préférence des poissons, plus préférentiellement du thon, du maquereau, de la sardine ou du hareng. Selon un mode de réalisation de l'invention, lesdits produits alimentaires sont des produits cuits, des produits frais, des produits congelés, des produits emballés sous vide, des produits conditionnés sous atmosphère modifiée, des produits fumés, des produits conditionnés en boîte de conserve et/ou des produits marinés.

Selon un mode de réalisation de l'invention, on applique sur le produit alimentaire une quantité de bactéries variant d'environ  $10^2$  à environ  $10^{12}$  ufc de *L. sakei* / g de produit alimentaire.

La présente invention concerne également un procédé de préparation de produits alimentaires, de préférence de produits de la mer, comprenant une étape d'application sur lesdits produits d'une souche de *L. sakei* ou de l'un de ses fragments.

L'invention a également pour objet un produit alimentaire, de préférence produit de la mer, comprenant une souche de *L. sakei* ou l'un de ses fragments.

La présente invention concerne en outre une souche de *Lactobacillus sakei* appelée souche *Lactobacillus sakei* LHS2885 et déposée à la CNCM sous le numéro CNCM I-4704. La présente invention concerne également une souche dérivée de *Lactobacillus sakei* obtenue par mutation, variation ou recombinaison de la souche telle que décrite ci-dessus. La présente invention concerne également une composition comprenant la souche bactérienne telle que décrite ci-dessus ou l'un de ses fragments.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une souche de *Lactobacillus sakei*, de l'un de ses fragments ou d'une composition la comprenant pour la conservation de produits alimentaires telle que décrite ci-dessus, dans laquelle la souche de *Lactobacillus sakei* est la souche LHS2885 décrite ci-dessus, ou la souche dérivée de LHS2885 décrite ci-dessus.

## DÉFINITIONS

Dans la présente invention, les termes ci-dessous sont définis de la manière suivante :

- “ **Environ** ” placé devant un nombre, signifie plus ou moins 10% de la valeur nominale de ce nombre.

## DESCRIPTION DÉTAILLÉE

La présente invention concerne une nouvelle souche de bactérie lactique, à savoir la souche bactérienne *Lactobacillus sakei* LHS2885. Selon un mode de réalisation de l'invention, la souche *Lactobacillus sakei* LHS2885 est isolée.

Cette souche bactérienne appartient au genre *Lactobacillus* et à l'espèce *sakei*. Il s'agit d'un bacille Gram+ catalase- oxydase-, homo hétérofermentaire facultatif. Si la taxonomie devait être modifiée, l'homme du métier pourrait adapter les modifications de taxonomie pour en déduire la bactérie utilisable dans la présente invention.

La souche *L. sakei* LHS2885 a été isolée de la chair de sardine fraîche conditionnée sous atmosphère modifiée (50% N<sub>2</sub> + 50% CO<sub>2</sub>).

Un échantillon de la culture du microorganisme conforme à la présente invention, appelée souche *Lactobacillus sakei* LHS2885 a été déposé le 12 décembre 2012 sous le Traité de Budapest dans la collection nationale de culture de microorganismes française (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15. L'échantillon a reçu le numéro N° CNCM I-4704.

Les inventeurs ont démontré que la souche *Lactobacillus sakei* LHS2885 était capable d'inhiber la croissance de bactéries histaminogènes et d'inhiber la production d'histamine sur des produits alimentaires contaminés par des bactéries histaminogènes. Des exemples de bactéries histaminogènes incluent, sans y être limités, *Morganella psychrotolerans*, *Morganella morganii* et *Hafnia alvei*.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la capacité d'inhibition de la croissance des bactéries histaminogènes est évaluée par un test d'inhibition sur boîte de pétri, via la mesure de halos d'inhibition.



Les tests d'inhibition de la croissance bactérienne sur boîte de pétri sont bien connus de l'homme du métier. Un exemple de test d'inhibition de la croissance bactérienne sur boîte de pétri est décrit ci-dessous.

Selon un mode de réalisation, ce test peut être réalisé par la méthode de la double couche. Avantageusement, la souche *L. sakei* LHS2885 est mise en culture en bouillon, de préférence en bouillon MRS, de préférence pendant 24 à 48 heures, puis des spots de la suspension bactérienne sont déposés sur un milieu gélosé, de préférence un milieu gélosé à base de jus de thon comprenant 1.5% d'agar. Avantageusement, le volume des spots de suspension bactériennes varie de 1 à 50  $\mu\text{L}$ , de préférence de 5 à 20  $\mu\text{L}$ , plus préférentiellement est d'environ 10  $\mu\text{L}$ . Après ensemencement, les boîtes de pétri sont incubées en anaérobiose, de préférence à une température variant de 10 à 20°C environ, plus préférentiellement à une température d'environ 15°C, pendant une période de 5 à 20 jours environ, de préférence d'environ 10 jours.

Au terme de la période d'incubation, des tapis de bactéries histaminogènes sont coulés sur les spots. L'homme du métier sait comment évaluer la dilution adéquate des souches histaminogènes pour obtenir un tapis bactérien homogène sur les boîtes.

Les boîtes gélosées sont ensuite incubées, de préférence en aérobiose, à une température variant de 10 à 20°C environ, de préférence à une température d'environ 15°C, pendant une période de 24 à 192 heures, de préférence de 36 à 144 heures, encore plus préférentiellement d'environ 96 heures.

A l'issue de la période d'incubation, les halos d'inhibition sont mesurés.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la souche LHS2885 de l'invention présente un halo d'inhibition de la souche histaminogène testée.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, la capacité d'inhibition de la croissance des bactéries histaminogènes est évaluée par un test d'inhibition sur un échantillon alimentaire, par exemple du thon cuit. Un exemple de test d'inhibition sur un échantillon alimentaire est présenté ci-dessous.

Dans une première étape, des suspensions bactériennes sont préparées. Avantageusement, la souche histaminogène est cultivée en bouillon, de préférence en bouillon BHI salé (2% NaCl), de préférence à une température de 15 à 25°C environ, plus préférentiellement à une température d'environ 20°C, jusqu'à atteindre une concentration variant d'environ  $1.10^8$  à environ  $1.10^{10}$  UFC/ml, de préférence d'environ  $2.10^9$  UFC/ml. En parallèle, la souche *L. sakei* LHS2885 est cultivée, de préférence en bouillon, plus préférentiellement en bouillon MRS, de préférence à une température variant de 10 à 37°C environ, de préférence de 20 à 30°C environ, plus préférentiellement d'environ

26°C, jusqu'à atteindre une concentration variant d'environ  $1.10^8$  à environ  $1.10^{10}$  UFC/ml, de préférence d'environ  $2.10^9$  UFC/ml.

Dans une seconde étape, la souche histaminogène, ainsi que la souche LHS2885 sont de préférence diluées dans de l'eau stérile, puisensemencées sur le produit alimentaire. Avantagement, la quantité de bactéries histaminogènes inoculées varie de 1 à 100 UFC/g environ, de préférence d'environ 5 à environ 50 UFC/g, plus préférentiellement est d'environ 10 UFC/g de produit alimentaire. De préférence, la quantité de bactéries *L. sakei* LHS2885 inoculées varie de  $10^3$  à  $10^8$  UFC/g environ, plus préférentiellement d'environ  $10^4$  à environ  $10^7$  UFC/g, encore plus préférentiellement est d'environ  $10^5$ - $10^6$  UFC/g de produit alimentaire.

Selon un mode de réalisation, les produits alimentairesensemencés sont ensuite incubés, de préférence à une température variant de 10 à 20°C environ, plus préférentiellement d'environ 15°C, pendant une période variant de 24 à 120 heures, de préférence de 48 à 96 heures, plus préférentiellement pendant 72 heures. Avantagement, les produits alimentairesensemencés sont incubés sous-vide.

A l'issue de la période d'incubation, la quantité de bactéries histaminogènes dans le produit est mesurée, par exemple par la méthode de dénombrement sur milieu gélosé, tel que, par exemple sur milieu VRBG incubé à environ 20°C pendant 48 heures.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la souche de LHS2885 de l'invention permet de réduire la croissance de la bactérie histaminogène dans le produit alimentaire par rapport à un témoin, ledit témoin ayant étéensemencé uniquement avec la bactérie histaminogène.

Un autre objet de l'invention est une souche bactérienne obtenue par mutation, variation ou recombinaison de la souche *L. sakei* LHS2885 telle que décrite ci-dessus. Selon l'invention, une telle souche est appelée « souche dérivée de LHS2885 ». Selon un mode de réalisation de l'invention, ces souches dérivées de *L. sakei* LHS2885 présentent une capacité d'inhibition de la croissance des bactéries histaminogènes et/ou une capacité d'inhibition de la production d'histamine équivalente, ou au moins égale à celle de la souche *L. sakei* LHS2885.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la capacité d'inhibition de la croissance des bactéries histaminogènes est évaluée par un test d'inhibition sur boîte de pétri, comme décrit ci-dessus. Avantagement, la souche dérivée de LHS2885 de l'invention présente un halo d'inhibition de la souche histaminogène testée. Selon un mode de réalisation de l'invention, la souche dérivée de LHS2885 présente un halo d'inhibition égal ou supérieur à celui mesuré pour la souche *L. sakei* LHS2885 de l'invention.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, la capacité d'inhibition de la croissance des bactéries histaminogènes est évaluée par un test d'inhibition sur un échantillon alimentaire tel que décrit ci-dessus.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la souche dérivée de L<sub>HIS2885</sub> de l'invention permet de réduire la croissance de la bactérie histaminogène dans le produit alimentaire par rapport à un témoin, ledit témoin ayant étéensemencé uniquement avec la bactérie histaminogène. De préférence, cette inhibition de croissance est environ égale ou supérieure à celle mesurée pour la souche *L. sakei* L<sub>HIS2885</sub>.

Des exemples de méthodes d'obtention de souches dérivées de *L. sakei* L<sub>HIS2885</sub> incluent, sans y être limitées, la mutagenèse aléatoire ou la mutagenèse dirigée.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les souches dérivées de *L. sakei* L<sub>HIS2885</sub> selon l'invention comprennent un génome présentant plus de 70% d'identité avec le génome de *L. sakei* L<sub>HIS2885</sub>, de préférence plus de 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% d'identité.

Au sens de la présente invention, le terme «identité», lorsqu'il est utilisé dans une relation entre les séquences de deux ou plusieurs séquences nucléotidiques, se réfère au degré de parenté entre ces séquences nucléotidiques, tel que déterminé par le nombre de correspondances entre les chaînes de deux bases ou plus.

Selon l'invention, l'«identité» correspond à un pourcentage d'identité entre deux (ou plus de 2) séquences. Ce pourcentage est défini comme le nombre de positions pour lesquelles les bases sont identiques lorsque les séquences sont alignées de manière optimale, divisé par le nombre total de bases de la plus petite des 2 séquences. Les différences entre les séquences peuvent être réparties au hasard et sur toutes leurs longueurs.

Deux séquences sont dites alignées de manière optimale lorsque le pourcentage d'identité est maximal. Par ailleurs, comme cela apparaîtra de manière claire à l'homme du métier, il peut être nécessaire de faire appel à des ajouts de positions lacunaires (des «gaps») de manière à obtenir un alignement optimal entre les deux séquences. Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques peut donc être déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale dans laquelle la séquence d'acides nucléiques à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est alors calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide est identique entre les deux séquences, en divisant ce

nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Préférentiellement, les méthodes de détermination de l'identité sont conçues pour donner la plus grande concordance possible entre les séquences comparées.

Le pourcentage d'identité peut être déterminé par un modèle mathématique particulier ou par un programme d'ordinateur (généralement désigné par le terme d'« algorithme »). Des méthodes de calcul de l'identité entre des séquences nucléotidiques sont bien connues de l'homme du métier. Des exemples non limitatifs de telles méthodes incluent celles décrites dans les documents suivants : Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; et Carillo *et al.*, SIAM J. Applied Math., 48, 1073 (1988).

Des méthodes de détermination de l'identité ont été décrites dans des programmes d'ordinateurs accessibles au public. Des exemples préférés de méthodes utilisant des programmes d'ordinateurs incluent, sans y être limités, le progiciel GCG, incluant GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acid. Res. \2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN et FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). Le programme BLASTX est disponible auprès du National Center for Biotechnology Information (NCBI) et d'autres sources (BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul *et al.*, supra). L'algorithme de Smith-Waterman, qui est bien connu de l'homme du métier, peut également être utilisé pour déterminer le pourcentage d'identité entre deux séquences.

La présente invention concerne une composition comprenant une souche de *L. sakei*, de préférence la bactérie *L. sakei* LHS2885, une souche dérivée de celle-ci ou l'un de leurs fragments.

Par « fragment », on entend, au sens de la présente invention, des composants cellulaires, des métabolites, des molécules sécrétées, des composés résultant du métabolisme de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885 ou d'une souche dérivée, des enzymes de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885 ou d'une souche dérivée etc... Selon un mode de réalisation de l'invention, les fragments de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885 ou d'une souche dérivée peuvent être

obtenus par récupération du surnageant de culture de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885 ou d'une souche dérivée, ou par extraction d'une culture de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885 ou d'une souche dérivée de composants ou de fractions cellulaires, de métabolites ou de composés sécrétés. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, un fragment peut également désigner un produit de dégradation de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885 ou d'une souche dérivée. Selon un mode de réalisation, le terme fragment peut désigner un composé sous une forme isolée, ou un mélange de plusieurs composés dérivés de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885 ou d'une souche dérivée.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition comprend des cellules vivantes de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885, ou d'une souche dérivée de LHS2885, de préférence des cellules en phase de croissance, plus préférentiellement en phase stationnaire ou en phase exponentielle de croissance et encore plus préférentiellement en phase exponentielle de croissance.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition comprend des cellules viables de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885, ou d'une souche dérivée de LHS2885. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition comprend des cellules non-viables de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885, ou d'une souche dérivée de LHS2885.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la composition est sous forme liquide. Des exemples de véhicules liquides utilisables dans la composition de l'invention incluent, sans y être limités, de l'eau, du tampon phosphate, ou tout milieu liquide adapté à la culture de la souche bactérienne *L. sakei*, de préférence adapté à la culture de *L. sakei* LHS2885 ou d'une souche dérivée de LHS2885, tels que, par exemple, le milieu MRS (de Man, Rogosa et Sharpe) ou le milieu BHI à 2% de NaCl (Infusion cerveau cœur). Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition est sous la forme d'un liquide congelé. De préférence, lorsque la composition de l'invention est sous la forme d'un liquide congelé, ce liquide comprend de 1 à 20% de glycérol environ, de préférence de 5 à 15% environ, encore plus préférentiellement environ 10% volume/volume de glycérol.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, la composition est sous forme solide. Des exemples de formes solides adaptées au conditionnement de la composition selon l'invention incluent, sans y être limités, une poudre, telle que, par exemple, une poudre comprenant des cellules de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885, ou d'une souche dérivée de LHS2885 de celles-ci lyophilisées; une pâte; un comprimé; une formulation solide devant être extemporanément dissoute dans un véhicule liquide, par exemple de l'eau; un fragment de milieu de culture solide

ensemencé par la souche *L. sakei*, de préférence par *L. sakei* LHS2885, ou une souche dérivée de LHS2885, tel que, par exemple, du milieu MRS.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition comprenant une souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885, ou une souche dérivée de LHS2885 est conditionnée sous la forme d'un dosage unitaire. Des exemples de dosages unitaires incluent, sans y être limités, un tube de culture bactérienne, un sachet de poudre comprenant des cellules de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885, ou une souche dérivée de LHS2885 lyophilisées...

Habituellement, la concentration d'une composition bactérienne s'exprime en ufc par unité de volume ou de masse. Le terme ufc est bien connu de l'homme du métier et désigne un nombre d'« unités formant colonie », i.e. un nombre de cellules vivantes, pouvant former une colonie sur un milieu de culture solide.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition comprend une concentration de cellules d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, ou d'une souche dérivée de LHS2885 variant d'environ  $10^2$  à environ  $10^{12}$  ufc/ml, de préférence d'environ  $10^5$  à environ  $10^{10}$  ufc/ml, plus préférentiellement d'environ  $10^6$  à environ  $10^9$  ufc/ml et encore plus préférentiellement la concentration est d'environ  $10^8$  ufc/ml.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition comprend une concentration de cellules d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, ou d'une souche dérivée de LHS2885 variant d'environ  $10^2$  à environ  $10^{12}$  ufc/g, de préférence d'environ  $10^5$  à environ  $10^{10}$  ufc/g, plus préférentiellement d'environ  $10^6$  à environ  $10^9$  ufc/g et encore plus préférentiellement la concentration est d'environ  $10^8$  ufc/g.

Les inventeurs ont démontré, de façon surprenante, que l'application de la souche *Lactobacillus sakei* LHS2885 sur des produits alimentaires, tels que, par exemple, des produits de la mer permet de maîtriser la production d'histamine dans ces produits, permettant ainsi de prévenir toute toxiféction.

La présente invention a donc également pour objet l'utilisation d'une souche bactérienne *L. sakei*, de préférence de la souche bactérienne *L. sakei* LHS2885, ou d'une souche dérivée de *L. sakei* LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant, pour la conservation, de préférence la biopréservation de produits alimentaires, de préférence de produits de la mer. Plus

précisément, la présente invention concerne l'utilisation de *L. sakei*, de préférence de *L. sakei* LHS2885, ou d'une souche dérivée de *L.sakei* LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant pour maîtriser la production d'histamine dans un produit alimentaire, de préférence un produit de la mer.

Au sens de la présente invention, la conservation correspond à un procédé de traitement d'un produit alimentaire ayant pour but de préserver ses caractéristiques organoleptiques, ses propriétés gustatives et nutritives, ses caractéristiques de texture et de couleur et d'éviter d'éventuelles intoxications alimentaires. Selon un mode de réalisation de l'invention, la conservation comprend la prévention ou l'inhibition du développement de microorganismes, en particulier de microorganismes indésirables, responsables de l'altération du produit ou inducteurs de pathogénicité, tels que des bactéries ou des champignons. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la conservation comprend la prévention ou l'inhibition de la production de molécules responsables de l'altération dudit produit ou inductrices de pathogénicité.

Au sens de la présente invention, la biopréservation d'un produit correspond à l'ajout audit produit d'un ou plusieurs microorganismes afin de conserver ledit produit.

Des exemples de microorganismes indésirables incluent, sans y être limités, les bactéries histaminogènes telles que, par exemple, *Morganella psychrotolerans*, *Hafnia alvei* et *Morganella morganii*.

Des exemples de molécules responsables de l'altération dudit produit ou inductrices de pathogénicité incluent, sans y être limités, l'histamine.

La présente invention concerne donc également un procédé de conservation, de préférence de biopréservation d'un produit alimentaire, de préférence d'un produit de la mer, comprenant l'ajout au dit produit d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche bactérienne *L. sakei* LHS2885, ou d'un dérivé de *L. sakei* LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant. Plus précisément, le procédé comprend la maîtrise de la production d'histamine au sein dudit produit.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'application d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant inhibe le développement de souches bactériennes productrices

d'histamine. Des exemples de souches bactériennes productrices d'histamine pouvant être inhibées incluent, sans y être limités, *Morganella psychrotolerans*, *Hafnia alvei* et *Morganella morgani*.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'application d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant permet de maintenir la concentration de bactéries productrices d'histamine dans le produit alimentaire, de préférence le produit de la mer à un niveau inférieur à environ  $10^5$  ufc/g de produit alimentaire, de préférence inférieur à environ  $10^4$  ufc/g, plus préférentiellement inférieur à environ  $10^3$  ufc/g. Selon un mode de réalisation, ces niveaux d'inhibition sont observés après incubation du produit alimentaire jusqu'à 4 jours à environ 15°C, de préférence pendant au moins 5, 6, 7 ou 8 jours d'incubation à 15°C environ.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'application d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant inhibe la production d'histamine et/ou permet l'élimination de l'histamine produite dans le produit alimentaire, de préférence dans le produit de la mer.

La présence d'histamine dans les poissons riches en histidine est réglementée en Europe (Règlement CE n° 1441/2007, 2007) avec une limite à 100 mg/kg.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'application d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant permet de maintenir la concentration d'histamine dans le produit alimentaire à un niveau inférieur à 100 mg/kg, de préférence inférieur à 75 mg/kg, plus préférentiellement inférieur à 50 mg/kg. Selon un mode de réalisation, ces niveaux d'histamine sont mesurés après incubation du produit alimentaire jusqu'à 4 jours à 15°C, de préférence pendant au moins 5, 6, 7 ou 8 jours d'incubation à 15°C environ.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885, une souche dérivée de LHS2885 ou l'un de leurs fragments inhibe le développement de souches productrices d'histamine et/ou inhibe la production d'histamine et/ou permet l'élimination de l'histamine produite dans un produit alimentaire à une température variant d'environ 0°C à environ 37°C, de préférence d'environ 4°C à environ 30°C, plus préférentiellement d'environ 4°C à environ 15°C.



Selon un mode de réalisation, l'effet de biopréservation de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition selon l'invention sont observés à 15°C pendant au moins 1 jour, de préférence au moins 2 jours, plus préférentiellement pendant au moins 4 jours et encore plus préférentiellement pendant au moins 5, 6, 7 ou 8 jours.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885, une souche dérivée de LHS2885, l'un de leurs fragments ou une composition les comprenant est appliquée en une quantité efficace sur le produit alimentaire. Au sens de la présente invention, le terme « quantité efficace » désigne la quantité de la souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant à appliquer sur le produit pour observer l'effet souhaité d'inhibition des souches productrices d'histamine et/ou l'inhibition de la production d'histamine et/ou l'élimination de l'histamine déjà formée.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la quantité efficace varie d'environ  $10^2$  à environ  $10^{12}$  ufc de la souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885, une souche dérivée de LHS2885 / g de produit alimentaire, de préférence d'environ  $10^4$  à environ  $10^9$  ufc/g, plus préférentiellement d'environ  $10^5$  à environ  $10^7$  ufc/g et encore plus préférentiellement d'environ  $10^6$  à environ  $5 \cdot 10^6$  ufc/g.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le produit alimentaire est un produit de la mer, de préférence un poisson, plus préférentiellement un poisson riche en histidine. Des exemples de produits riches en histidine incluent, sans y être limités, le thon et autres thonidés (tels que, par exemple, les bonites, les marlins et les espadons), le maquereau, la sardine et l'anchois.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le produit alimentaire est un produit frais, un produit cuit, un produit congelé, un produit emballé sous vide, un produit conditionné sous atmosphère modifiée (telle que, par exemple, une atmosphère comprenant 50% de  $N_2$  et 50% de  $CO_2$ ), un produit fumé, un produit conditionné en boîte de conserve, un produit mariné...

Selon un mode de réalisation, le produit alimentaire est du thon cuit conditionné sous-vide.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un produit alimentaire, de préférence d'un produit de la mer pour la consommation, de préférence la consommation humaine, ledit procédé de préparation comprenant une étape d'application sur le produit

alimentaire d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant.

Selon un mode de réalisation, la souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885, la souche dérivée de LHS2885, l'un de leurs fragments ou une composition les comprenant est appliquée sur le produit alimentaire avant emballage, de préférence juste avant l'emballage.

Selon un mode de réalisation, la souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885, la souche dérivée de LHS2885, l'un de leurs fragments ou une composition les comprenant est ajoutée sur le produit alimentaire fris, avec ou sans emballage.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885, une souche dérivée de LHS2885, l'un de leurs fragments ou une composition les comprenant est appliquée sur le produit alimentaire après la cuisson dudit produit.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

- (a) cuisson du produit alimentaire ;
- (b) application sur ledit produit alimentaire cuit d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant ; et
- (c) emballage dudit produit alimentaire.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885, une souche dérivée de LHS2885, l'un de leurs fragments ou une composition les comprenant est appliquée sur le produit alimentaire avant le salage et/ou le fumage dudit produit.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

- (a) application sur le produit alimentaire d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant ;
- (b) salage et/ou fumage dudit produit alimentaire ; et

(c) emballage dudit produit alimentaire.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885, une souche dérivée de LHS2885, l'un de leurs fragments ou une composition les comprenant est appliquée sur le produit alimentaire après le salage et/ou le fumage dudit produit.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

(a) salage et/ou fumage du produit alimentaire ;

(b) application sur ledit produit alimentaire salé ou fumé d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant et

(c) emballage dudit produit alimentaire.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

(a) application sur ledit produit alimentaire salé ou fumé d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche *L. sakei* LHS2885, d'une souche dérivée de LHS2885, de l'un de leurs fragments ou d'une composition les comprenant,

(b) mise sous atmosphère protectrice dudit produit alimentaire et

(c) emballage hermétique dudit produit alimentaire, de préférence par operculution.

Dans un mode de réalisation, ledit produit alimentaire est du thon et l'atmosphère modifiée comprend de 30 à 70% de CO<sub>2</sub>, de préférence de 40 à 60% de CO<sub>2</sub> ; de 10 à 70% d'O<sub>2</sub>, de préférence de 15 à 60% d'O<sub>2</sub> et de 0 à 30% de N<sub>2</sub>, de préférence de 0 à 25% de N<sub>2</sub>. Selon un premier mode de réalisation, ledit produit alimentaire est du thon et l'atmosphère modifiée comprend environ 40% de CO<sub>2</sub> et environ 60% d'O<sub>2</sub>. Selon un second mode de réalisation, ledit produit alimentaire est du thon et l'atmosphère modifiée comprend environ 60% de CO<sub>2</sub>, environ 15% d'O<sub>2</sub> et environ 25% de N<sub>2</sub>.

Dans un mode de réalisation, ledit produit alimentaire est du hareng ou de la sardine et l'atmosphère modifiée comprend de 30 à 70% de CO<sub>2</sub>, de préférence environ 60% de CO<sub>2</sub> ; et de 30 à 70% de N<sub>2</sub>, de préférence environ 40% de N<sub>2</sub>.

La présente invention concerne également un produit alimentaire, de préférence un produit de la mer, comprenant une souche de *L. sakei*, de préférence la souche *L. sakei* LHS2885 de l'invention, une souche dérivée de LHS2885, ou l'un de leurs fragments.

La souche *L. sakei* LHS2885 selon l'invention présente les avantages suivants :

- la souche *L. sakei* LHS2885 se développe dans les produits alimentaires, tels que, par exemple, les produits de la mer, notamment cuits, fumés ou conditionnés sous atmosphère contrôlée ou sous-vide, à une température variant d'environ 0 à environ 37°C;
- l'application de la souche *L. sakei* LHS2885 sur un produit alimentaire, tel que, par exemple, un produit de la mer, contaminé par une bactérie histaminogène inhibe le développement de ladite souche histaminogène ;
- l'application de la souche *L. sakei* LHS2885 sur un produit alimentaire, tel que, par exemple, un produit de la mer, contaminé par une bactérie histaminogène inhibe la production d'histamine ;
- l'application de la souche *L. sakei* LHS2885 sur un produit alimentaire, tel que, par exemple, un produit de la mer, ne modifie pas de façon majeure les propriétés organoleptiques de ce produit.

#### **BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES**

La **Figure 1** est un histogramme montrant la croissance de *M. psychrotolerans* seule (MP) ou en co-culture avec *Lactococcus piscium* EU2258 (MP + EU2258) ou *Lactobacillus sakei* LHS2885 (MP+LHS2885) (MP) sur des longes de thon cuites conservées à 15°C sous-vide.

La **Figure 2** est un histogramme montrant la production d'histamine par *Morganella psychrotolerans* seule (MP) ou en co-culture avec *Lactococcus piscium* EU2258 (MP + EU2258) ou *Lactobacillus sakei* LHS2885 (MP+LHS2885) dans du thon cuit conservé à 15°C sous-vide.

La **Figure 3** est un graphique montrant l'effet de la souche LHis2885 de l'invention sur la croissance de *M. morganii* (Mm) sur du thon cuit conservé à 15°C sous vide, ainsi que sur la production d'histamine.

La **Figure 4** est un histogramme montrant la croissance de *Morganella psychrotolerans* en absence (Témoin Mp) ou présence (Essai Mp) de *Lactobacillus sakei* LHis2885 à 4°C pendant 18 jours.

La **Figure 5** est un histogramme montrant la croissance de *Lactobacillus sakei* en absence (témoin LHis2885) ou présence (essai LHis2885) de *Morganella psychrotolerans* à 4°C pendant 18 jours.

La **Figure 6** est un histogramme montrant la production d'histamine dans le thon cuit à 4°C par *M. psychrotolerans* en absence (témoin – Mp) ou présence de *L. sakei* (Essai – Mp/LHis2885).

## **EXEMPLES**

La présente invention se comprendra mieux à la lecture des exemples suivants qui illustrent non-limitativement l'invention.

Cet exemple décrit le protocole ayant permis l'isolement et l'identification de la bactérie *L. sakei* LHS2885 comme pouvant être utile pour la biopréservation des produits alimentaires tels que, par exemple, des produits de la mer et plus particulièrement pour prévenir ou maîtriser la production d'histamine dans ces produits.

### **Isolement de bactéries lactiques sur des poissons riches en histidine**

#### **Matériels et méthodes**

Dans un premier temps, l'isolement de bactéries lactiques issues de chair de poissons riches en histidine a été réalisé. Des produits de la mer frais ou fumés (thon fumé, longe de thon frais, filet de sardine, filet de maquereau, maquereau entier ou hareng fumé) ont été conditionnés, puis incubés à 8°C pendant une (produits frais) ou deux (produits fumés) semaines, puis les bactéries lactiques ont été isolées de ces produits incubés.

#### **Résultats**

132 souches de bactéries Gram+ ont été isolées.

### **Test d'inhibition sur boîtes de pétri**

La capacité des 132 souches identifiées à inhiber *in vitro* la souche histaminogène *Morganella psychrotolerans* a ensuite été testée sur boîte de Pétri par la méthode de la double couche.

#### **Matériels et Méthodes**

Le test d'inhibition est réalisé selon la méthode de Matamoros *et al.* (2009). Les 132 bactéries lactiques sont mises en culture en bouillon dans du milieu BHI (2% NaCl) à 20°C pendant 24h ou 48h. Après ce temps de pré-culture, des spots de 10 µl de suspension bactérienne sont déposés sur le milieu Jus de thon (JT) (1,5% d'Agar). Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées à 15°C en anaérobiose pendant 10 jours. Au terme du temps d'incubation des bactéries lactiques, les tapis bactériens sont coulés sur les spots. La dilution adéquate pour le tapis bactérien est de 1/100<sup>ème</sup> pour la souche psychrotolérante *M. psychrotolerans*. Les tapis bactériens sont réalisés dans le milieu JT.

Les boîtes sont placées en aérobiose pendant 96 heures à 15°C. Elles sont observées à 36, 72 et 96h et les halos d'inhibitions sont mesurés.

## Résultats

Sur les 132 souches bactériennes testées, 39 ont présenté une inhibition de la souche psychrotolérante *M. psychrotolerans*.

### **Inhibition des bactéries histaminogènes *Morganella psychrotolerans* et *Morganella morganii* par la bactérie LHS2885 sur du thon cuit conservé sous-vide à 15°C**

Six souches identifiées lors du test d'inhibition sur boîte de pétri, ainsi que six autres souches préabactéries lactiques isolées de produits de la mer, ont ensuite été testées pour leur capacité à inhiber la bactérie *M. psychrotolerans* sur des longes de thon cuit.

## Matériels et Méthodes

Bactéries : La souche de *M. psychrotolerans* provient de la collection de l'Institut Pasteur, son n° d'accession est CIP109403<sup>T</sup>. Elle est cultivée en bouillon BHI salé (2% NaCl) à 20°C pendant 24 h pour les expérimentations (environ  $2.10^9$  UFC/ml).

Les douze souches de bactéries lactiques sont cultivées sur milieu MRS ou Elliker à 26°C pendant 24 h pour les expérimentations (concentration finale variant de  $2.10^8$  à  $6.10^9$  UFC/ml selon les souches).

Matrice alimentaire : Des longes de thon frais conditionnées sous-vide congelées ont été décongelées une nuit à 4°C dans une étuve. Les longes sont découpées en cubes de 2 cm<sup>3</sup> et réparties dans un plateau préabactéries lactiques nettoyé à l'alcool. Les cubes sont déposés dans des sacs à hauteur de 200 g puis scellés et conditionnés sous-vide. Le thon est cuit pendant 5 min dans de l'eau bouillante. La température à cœur finale du produit est de 81,2°C. Les cubes de thon sont refroidis dans une cellule de refroidissement rapide. Les produits sont conservés à 4°C s'ils sont utilisés le lendemain ou à -20°C si leur utilisation est reportée.

### Méthode :

a) *Préparation de M. psychrotolerans* : La préculture de *M. psychrotolerans* est diluée 6 fois successivement au  $1/10^{\text{ème}}$ . La concentration obtenue est de  $2.10^3$  UFC/ml.

b) *Préparation des bactéries lactiques* : Les précultures des bactéries lactiques sont diluées (ou non) jusqu'à obtenir une concentration finale de  $2 \cdot 10^8$  UFC/ml.

c) *Préparation des mélanges M. psychrotolerans - bactérie lactique* : 10 ml de la préculture de *M. psychrotolerans* sont mélangés avec 10 ml de la préculture de bactérie lactique. Chaque bactérie lactique est testée séparément ce qui fait que 12 mélanges différents sont préparés.

d) *Ensemencement sur le thon* : Le thon préabactéries lactiques est malaxé dans le sac de 200 g manuellement afin d'en faire une pâte homogène. A l'aide d'une cuillère stérile, la chair est répartie en sachets de 40 g de thon. L'inoculum de départ est fixé à 5% en volume par rapport à la masse totale de chair de thon (v/m). Le mélange *M. psychrotolerans* - bactérie lactique est préparé extemporanément et vortexé pendant 15 sec à vitesse maximale. 2 ml du mélange sont ajoutés à 40 g de thon à l'aide d'une pipette stérile de 2ml. Le témoin positif est ensemencé uniquement avec *M. psychrotolerans*, les 10 ml de bactérie lactique ayant été remplacés par 10 ml d'eau physiologique stérile. Le témoin de stérilité est constitué de thon non inoculé. Les concentrations bactériennes sur la matrice sont d'environ 50 UFC/g de *M. psychrotolerans* et au minimum  $10^6$  UFC/g de bactéries lactiques.

e) *Incubation* : Les produits ensemencés sont mis sous vide puis congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 48 h. Ils sont ensuite décongelés et conservés à  $15^{\circ}\text{C}$  pendant 8 jours.

f) *Analyse* : Les produits sont analysés le jour-même (J0) puis à 24 (J1), 48 (J2) heures, 4 jours (J4) et 8 jours (J8). *M. psychrotolerans* est spécifiquement dénombré sur le milieu VRBG à  $20^{\circ}\text{C}$  (48 h d'incubation). Les bactéries lactiques sont dénombrées soit sur MRS ou Elliker en anaérobiose à  $20^{\circ}\text{C}$  pendant 48 h. La production d'histamine est analysée après le dénombrement sur boîtes grâce au kit Veratox, selon les instructions du fabricant ou par HPLC. La dilution primaire du dénombrement (1/5) est utilisée pour effectuer ce test, un volume de 30 ml sont récupérés sur chaque échantillon et congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Toutes les expérimentations sont faites en duplicat.

## Résultats

Deux souches de bactéries lactiques ont présenté des inhibitions de la production d'histamine ou de la croissance de *M. psychrotolerans* : EU2258 (*Lactococcus piscium*, préabactéries lactiques)



isolée de grenadier sous atmosphère modifiée) et LHS2885 (*Lactobacillus sakei*, isolée lors de cette étude d'échantillons de sardine).

Ces deux souches se développent efficacement sur le thon cuit, pour atteindre environ 9 log UFC/g en 8 jours.

A 24 h et 48 h de culture, une inhibition d'environ 1 à 2 log UFC/g de *M. psychrotolerans* est visible pour les deux cocktails bactérie lactique / *M. psychrotolerans*. Par contre, à 4 jours d'incubation à 15°C, la bactérie *Lactobacillus sakei* LHS2885 limite la croissance de MP à 3 log UFC/g alors que le témoin se situe à 8 log UFC/g. A 8 jours d'incubation à 15°C, la bactérie *Lactobacillus sakei* LHS2885 limite la croissance de MP à 6 log UFC/g alors que le témoin se situe à 9 log UFC/g. La bactérie EU2258 ne semble pas avoir d'effet sur la croissance de MP à partir de 4 jours (**Figure 1**).

L'effet des bactéries lactiques sur la production d'histamine a ensuite été mesuré avant décongélation, le jour de la décongélation (J0), puis 1, 2, 4 et 8 jours après décongélation (J1, J2, J4 et J8, respectivement). Les résultats sont exprimés en mg/kg d'histamine et sont présentés sur la **Figure 2**.

Comme le montre la **Figure 2**, avant congélation, les produits contiennent tous moins de 50 mg/kg d'histamine. Le taux d'histamine reste constant après décongélation et à 24h et 48h où il est toujours inférieur à 50 mg/kg. A 4 jours d'incubation, la quantité d'histamine augmente jusqu'à 3600 mg/kg d'histamine dans le témoin. *Lactobacillus sakei* LHS2885 réduit la production d'histamine à 38 mg/kg. La bactérie lactique EU2258 réduit aussi la production d'histamine mais plus faiblement avec 1279 mg/kg.

A 8 jours d'incubation, cette inhibition de la production est encore bien marquée pour *L. sakei* LHS2885 avec une quantité d'histamine de 245 mg/kg alors que le témoin est arrivé à une concentration de 8900 mg/kg. Pour la souche EU2258, la quantité d'amine biogène est équivalente au témoin et se situe à 7425 mg/kg.

La bactérie lactique *L. sakei* LHS2885 est donc capable d'inhiber la croissance de *M. psychrotolerans* et la production d'histamine par cette dernière et ce jusqu'à 8 jours après décongélation du produit à 15°C.

Dans un second temps, le même type d'expérience a été réalisé avec la souche histaminogène *M. morganii* pour vérifier l'efficacité de la souche bio-protectrice *Lactobacillus sakei*, LHS2885. Les résultats présentés **Figure 3** montrent les effets de la souche LHS2885 sur la croissance de *M. morganii* sur des échantillons de thon cuit, ainsi que la production d'histamine dans ces mêmes échantillons.

Comme le montre la **Figure 3**, la souche LHS2885 de l'invention permet également l'inhibition de la croissance de *M. morganii* sur du thon cuit, ainsi que l'inhibition de la production d'histamine des échantillons de thon cuit contaminés par la bactérie histaminogène *M. morganii*.

### **Inhibition de la bactérie histaminogène *Morganella psychrotolerans* par la bactérie LHS2885 sur du thon cuit en conserve conservé à 4°C**

#### **Matériel & méthodes**

Bactéries – milieux de culture et d'isolement : Les pré-cultures de la bactérie histaminogène *Morganella psychrotolerans* CIP109403<sup>T</sup> ont été effectuées en milieu Brain Heart Broth salé à 2% (BHI salé 2%) à 20°C pendant 24h (concentration de  $2.10^9$  UFC/ml). Les pré-cultures de la bactérie *L. sakei* LHS2885 ont été effectuées en bouillon Man, Rogosa and Sharpe (MRS) à 26°C pendant 24h (concentration de  $1,29.10^9$  UFC/ml).

Matrice alimentaire : Pour effectuer ces expérimentations, de la chair de thon albacore cuit en conserve a été choisie pour vérifier les capacités bioprotectrices de *L. sakei* LHS2885 contre *M. psychrotolerans* CIP109403<sup>T</sup>. 25g de thon sont utilisés pour préparer chaque point d'analyse. 6 temps d'analyses et 3 lots de thon ont été analysés:

- Lot T : Témoin positif (thonensemencé avec *M. psychrotolerans* CIP109403<sup>T</sup>)
- Lot L : Témoin lactique (thonensemencé avec LHS2588)
- Lot E : Essai (LHS2885 + CIP109403<sup>T</sup>)

Les expérimentations ont été réalisées en triplicat.

#### Méthode :

a) Préparation des sachets : Les conserves de thon ont été ouvertes sous hotte à flux laminaire et le thon a été déposé dans un bac stérilisé à l'alcool puis mélangé. Le thon a ensuite été réparti en sachets de 25g, avec une spatule stérilisée à l'alcool. Ces sachets de thon ont ensuite étéensemencés et conservés sous vide.

b) *Préparation du témoin M. psychrotolerans pure*: La préculture de *M. psychrotolerans* CIP109403<sup>T</sup> est diluée dans une solution de tryptone-sel à 0.85% pour obtenir une solution à  $10^3$  UFC/ml. Les sachets de thon sont ensuiteensemencés à 5% (v/m), soit 1,25 ml dans 25g de thon. Les sachets sont ensuite malaxés à la main pour homogénéiser la répartition dans la chair (concentration finale dans la chair 48 UFC/g).

c) *Préparation du lot Lactique (LHIS2885) et Essai (Mp+LHIS2885)*: La préculture de *L. sakei* LHIS2885 est diluée dans une solution de tryptone-sel (TS) à 0.85% pour préparer l'ensemencement de la chair de thon. Pour le lot Lactique, une solution de *L. sakei* est préparée à  $6,5 \cdot 10^7$  UFC/ml. Les sachets de thon sontensemencés à 5% (v/m), soit 1,25 ml dans 25g de thon. Les sachets sont ensuite malaxés à la main pour homogénéiser la répartition dans la chair (concentration finale dans la chair  $3,25 \cdot 10^6$  UFC/ml). Pour le lot Essai, une solution avec  $10^3$  UFC/ml de CIP109403<sup>T</sup> et  $6,5 \cdot 10^7$  UFC/ml de LHIS2885 est préparée. Les sachets de thon sont ensuiteensemencés à 5% (v/m). Ils sont malaxés à la main pour homogénéiser la répartition dans la chair et obtenir une concentration finale de bactérie de  $3,25 \cdot 10^6$  UFC/g (LHIS2885) et 48 UFC/g (CIP109403<sup>T</sup>).

d) *Conditionnement et incubation des sachets*: Une foisensemencés, les sachets sont conditionnés sous vide. Ils sont mis au congélateur à  $-20^\circ\text{C}$  pendant 48h (sauf les sachets à analyser avant congélation). Après ce laps de temps, les échantillons sont décongelés à  $4^\circ\text{C}$  et incubés à  $4^\circ\text{C}$  pendant 18 jours.

e) *Analyses Microbiologiques*: Des prélèvements sont effectués à  $J_0$  après décongélation, à  $J_4$ ,  $J_7$ ,  $J_{11}$  et  $J_{14}$  et  $J_{18}$ . A chaque temps d'analyse, 3 sachets de chaque lot ont été analysés. 20g de thon ont été prélevés stérilement et sont ensuite dilués au  $1/5^e$  par ajout de 80 ml de milieu TS. Le contenu du sac est broyé au Stomacher à vitesse normale pendant 120 secondes. Des prélèvements de la solution mère obtenue sont ensuite effectués : 15 ml de solution de thon broyé déposés dans un tube Falcon vide pour les analyses d'amines biogènes par la méthode HPLC et 10 ml pour les dénombrements microbiologiques. A partir des 10ml de solution de thon broyé, des dilutions en cascade sont effectuées selon les concentrations supposées de bactéries. *M. psychrotolerans* CIP109403<sup>T</sup> est dénombré en profondeur sur milieu VRBG tandis que *L. sakei* LHIS2885 est dénombré sur milieu MRS en surface. Les milieux ont ensuite été incubés pendant 48h à  $20^\circ\text{C}$  pour le milieu VRBG et à  $20^\circ\text{C}$  en jarre anaérobie pour le milieu MRS.

Amines biogènes (HPLC) et pH - Le pH a été mesuré à partir du sac Stomacher de solution de thon broyé. Un pré-dosage avec le kit Neogen Veratox a été effectué sur 3 échantillons pour vérifier la concentration en histamine dans les produits à J<sub>4</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>11</sub>. Les échantillons à J<sub>7</sub>, J<sub>11</sub> et J<sub>14</sub> ont été analysés par HPLC par dansylation des amines biogènes.

## Résultats

Les croissances de *M. psychrotolerans* et de *L. sakei* sont observables sur les **Figures 4 et 5**. La concentration initiale de *M. psychrotolerans* est inférieure à 1 log UFC/g (**Figure 4**), après 11 jours d'incubation, elle approche de 7 log UFC/g pour arriver à 18 jours à une concentration de 8,3 log UFC/g. En présence de *L. sakei* (**Figure 4**), la croissance de *M. psychrotolerans* n'est que faiblement inhibée, la concentration initiale est inférieure à 1 log UFC/g, puis la croissance suit celle du témoin avec une inhibition maximale de 0,5 log UFC/g à J<sub>7</sub>, J<sub>11</sub>, J<sub>14</sub>.

*L. sakei* se développe correctement dans le thon à 4°C (**Figure 5**), la concentration de départ est de 6,5 log UFC/g et augmente jusqu'à 9 log UFC/g après 11 jours d'incubation. A 14 et 18 jours on observe une baisse de sa concentration à 8,6 et 7,5 log UFC/g respectivement. Il n'y a pas de différence significative du taux initial et de la croissance de *L. sakei* entre le témoin et l'essai.

L'évolution de la concentration en histamine dans les produits est décrite sur la **Figure 6**. La production d'histamine en présence de *M. psychrotolerans* s'initie à partir de 7 jours avec des concentrations inférieures à 50 mg/kg. Après 11 jours d'incubation la moyenne entre 3 échantillons indépendants est de 93 mg/kg et après 18 jours la concentration est au-delà du seuil réglementaire et atteint une moyenne de 582 mg/kg. En présence de *L. sakei*, cette production d'histamine est limitée après 7 jours d'incubation (6 mg/kg de différence par rapport au témoin). Après 11 et 14 jours d'incubation, la concentration moyenne en histamine est de 23 et 249 mg/kg respectivement soit 75% et 57 % d'inhibition par rapport au témoin. La bactérie *L. sakei* permet de rester à un taux d'histamine inférieur à la norme américaine et Européenne après 11 jours d'incubation et limite la production en très forte concentration à 14 jours.

Ces résultats démontrent que *L. sakei* LHS2885 présente des capacités bio-protectrices intéressantes à 4°C, avec une réduction de la production d'histamine de 75% et 57 % après 11 et 14 jours d'incubation respectivement.

**Analyse sensorielle de thon cuit sous-vide en présence de *M. psychrotolerans* et de *Lactobacillus sakei* LHS2885 conservé à 15°C**

Nous avons ensuite analysé l'impact de l'ensemencement d'un produit de la mer par la bactérie *L. sakei* LHS2885 sur les qualités sensorielles dudit produit.

**Matériels et Méthodes**

Matière première : Les longes de thon Albacore proviennent de l'entreprise Cobreco à Douarnenez. Elles ont été récupérées sur la chaîne de découpe de l'usine après leur processus de décongélation/parage sur du thon entier congelé. Cette matière première a été préparée pour les tests selon les étapes ci-dessous :

- Décongélation du thon 1 nuit à 4°C
- Découpe du thon et répartition en sachets de 200g
- Conditionnement sous vide des sachets
- Cuisson des sachets (70°C à cœur pendant 5 minutes) dans l'eau
- Refroidissement des sachets et entreposage à 4°C

Préparation des échantillons : 10 lots d'échantillons ont été préparés afin de tester les modifications sensorielles apportées au produit par les souches pures et par les souches en cocktail.

- Lot 1 : Témoin (thon cuit)
- Lot 2 : Témoin + *Morganella psychrotolerans* (Mp)
- Lot 3 : Témoin + *Lactococcus piscium* : Lp (EU2258)
- Lot 4 : Témoin + *Lactobacillus sakei* : Ls (LHS2885)
- Lot 5 : Essai Mp + Lp (EU2258)
- Lot 6 : Essai Mp + Ls (LHS2885)

Les sachets ont été inoculés puis stockés selon le protocole décrit précédemment, dans les conditions suivantes :

- Pesée des sachets de 40g de thon cuit + ensemencement des sachets
- Conditionnement sous vide des sachets
- Congélation des sachets à -20°C pendant 48h
- Décongélation des sachets à 8°C (sauf 4 sachets de Témoin dont 2 seront décongelés à J4 et 2 autres à J8, pour servir de référence au cours des tests sensoriels).

- Incubation des sachets à 15°C

Protocole d'analyse : Les produits sont analysés après 4 jours et 8 jours d'incubation. A chaque point, 2 sachets de chaque échantillon sont prélevés pour les tests sensoriels.

Les tests ont été réalisés par le jury interne d'analyse sensorielle de l'Ifremer de Nantes. Ce panel a une longue expérience des produits de la mer; il est sollicité une à deux fois par semaine pour tester des produits ou pour des séances d'entraînement. Un groupe de 9 personnes bien entraînées sur les odeurs d'altération des produits de la mer a participé à cette étude.

Les séances d'évaluation sensorielle se déroulent dans une pièce climatisée, composée de 10 cabines individuelles de dégustation, éclairées par une lumière blanche standard (T = 6500°K) répondant aux spécifications de la norme AFNOR V-09-105 concernant les recommandations relatives à l'implantation des locaux destinés à l'analyse sensorielle. Un système informatique permet l'acquisition automatique des données (logiciel Fizz, Biosystèmes, Dijon) et leur traitement statistique

Le contenu des 2 sachets de chaque échantillon est réparti dans 5 pots inodores en polystyrène munis d'un couvercle, soit environ 15 g de miettes par pot provenant pour moitié de chaque sachet. Les pots sont entreposés dans une étuve à 18°C pendant le déroulement de la séance. Chacune des 5 séries de 10 échantillons est sentie par 2 juges différents. Le témoin de référence, décongelé le matin du test, est proposé en même temps. Les échantillons sont présentés aux juges selon un plan équilibré pour éviter un biais dû à l'effet du 1er produit testé.

La séance se compose de 2 épreuves :

- ✓ un test de notation du niveau d'altération de l'odeur sur une échelle non structurée de 0 à 10. Il est précisé au panel qu'une note voisine de 6 est représentative d'une altération relativement forte. Cette valeur a été déterminée lors de précédents essais.
- ✓ un test de caractérisation par attributs.

Une liste de 22 odeurs est proposée aux juges qui doivent sélectionner au moins une odeur : sardine, maquereau, thon, pâté, poisson gras, marine/iodée, laiteuse, pomme de terre, végétale, serpillière, saumure, fruitée, métallique, beurre/caramel, pyrrolidine/sperme, rance/huile de lin, aminée/urine, acide/piquante, aigre/fermentée, pied/fromage, chou/gaz, H<sub>2</sub>S/œuf.

## Résultats

Pour le test de caractérisation par attribut, le critère « aminée/urine » a été supprimé car très rarement cité. Des regroupements de fréquences de citation ont été effectués pour les 5 premiers descripteurs (poisson gras/thon), pour rance et végétal, pour aigre/fermenté et pied/fromage (aigre/fromage) et pour chou/gaz et H<sub>2</sub>S (soufrée). Les juges ayant cité de 1 à 5 descripteurs d'odeur par produit, le nombre de citations n'est pas toujours le même pour chaque échantillon. Aussi, la fréquence de citation, pour un produit et un critère d'odeur donné, a été calculée en prenant en compte le nombre de citations total pour le produit.

Les notes obtenues par les produits nonensemencés (témoin) ou les produitsensemencés par les souches pures sont présentées dans le Tableau 1 ci-dessous :

	<b>Témoin</b>	<b>Mp</b>	<b>EU2258</b>	<b>LHIS2885</b>
<b>J4</b>	<b>1</b> thon, (rance, grillée)	<b>6</b> soufrée, aigre	<b>2.3</b> thon, pyrrolidine	<b>2.9</b> thon
<b>J8</b>	<b>1.7</b> thon, acide (grillée)	<b>6</b> soufrée, aigre, acide	<b>3.9</b> thon, aigre, soufrée, acide, (pyrrolidine)	<b>2.1</b> thon

Tableau 1

Comme démontré dans le Tableau 1, le témoin évolue peu entre J4 et J8. En effet, le produit ayant été cuit et congelé, il est très peu contaminé quand débute l'entreposage à 15°C. Le produitensemencé avec la souche *M. psychrotolerans* (Mp) est fortement altéré à J4 et n'évolue plus par la suite ; l'odeur est de type soufré (mélange de Diméthylsulfure et d'H<sub>2</sub>S). Dans le thonensemencé par la souche EU2258 seule, l'odeur « thon » persiste mais la note « pyrrolidine » a été clairement détectée à J4 ; un peu moins à J8 car probablement masquée par les autres odeurs plus présentes. La pyrrolidine est une amine cyclique dont l'odeur à l'état pur ressemble à celle de l'ammoniac, diluée elle évoque plutôt l'odeur du sperme ou de l'eau de javel. Enfin, le thonensemencé par la souche LHIS2885 seule ne présente pas d'altération au cours du temps.

Les notes obtenues par les produitsensemencés avec la souche *M. psychrotolerans* en mélange avec une bactérie lactique (EU2258 ou LHIS2885) sont présentées dans le Tableau 2 ci-dessous :

	<b>EU2258 +Mp</b>	<b>LHIS2885 + Mp</b>
<b>J4</b>	<b>5.4</b> Soufrée (aigre, rance)	<b>3.2</b> thon
<b>J8</b>	<b>7.2</b> soufrée, aigre (acide, rance)	<b>2.3</b> thon

Tableau 2

Comme montré dans le Tableau 2, le produitensemencé par les souches *M. psychrotolerans* (MP) et EU2258 présente une note soufrée; elle peut provenir de Mp ou de EU2258. Le thon est fortement altéré à J8. Par contre, le thonensemencé avec MP et LHIS2885 ne présente pas d'altération au cours du temps.

Ces résultats montrent que la souche *Lactobacillus sakei* LHIS2885 des bactéries histaminogène *M. psychrotolerans* et *M. morgani*, de 4 à 5 log UFC/g. L'inhibition la plus importante est observée après 4 jours d'incubation de thon cuit conditionné sous-vide à 15°C. La production d'histamine est inférieure à 50 mg/kg (le seuil retenu par la législation Européenne est de 100 mg/kg, celui retenu par la législation américaine est de 50 mg/kg) alors que dans des produits qui pourraient être naturellement contaminés la quantité d'histamine serait de 4000 mg/kg. Au niveau sensoriel, la souche *Lactobacillus sakei* LHIS2885 n'est pas altérante par elle même. La souche permet même de réduire l'altération du produit à 4 et 8 jours d'incubation. La souche *Lactobacillus sakei* LHIS2885 apporte donc des éléments intéressants pour avoir une meilleure maîtrise de la production d'histamine dans le thon et pour limiter l'altération du produit dans le temps.



## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une souche de *Lactobacillus sakei*, de l'un de ses fragments ou d'une composition la comprenant pour la conservation de produits alimentaires, de préférence de produits de la mer.
2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle la production d'histamine dans lesdits produits alimentaires est inhibée.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle la croissance de bactéries histaminogènes dans lesdits produits alimentaires est inhibée.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle les produits alimentaires sont des produits de la mer, de préférence des poissons, plus préférentiellement du thon, du maquereau, de la sardine ou du hareng.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle lesdits produits alimentaires sont des produits cuits, des produits frais, des produits congelés, des produits emballés sous vide, des produits conditionnés sous atmosphère modifiée, des produits fumés, des produits conditionnés en boîte de conserve et/ou des produits marinés.
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle on applique sur le produit alimentaire une quantité de bactéries variant d'environ  $10^2$  à environ  $10^{12}$  ufc de *L.sakei* / g de produit alimentaire.
7. Procédé de préparation de produits alimentaires, de préférence de produits de la mer, comprenant une étape d'application sur lesdits produits d'une souche de *L.sakei* ou de l'un de ses fragments.
8. Produit alimentaire, de préférence produit de la mer, comprenant une souche de *L.sakei* ou l'un de ses fragments.
9. Souche de *Lactobacillus sakei* appelée souche *Lactobacillus sakei* LHIS2885 et déposée à la CNCM sous le numéro CNCM I-4704.
10. Souche dérivée de *Lactobacillus sakei* obtenue par mutation, variation ou recombinaison de la souche selon la revendication 9.

- 11.** Composition comprenant la souche bactérienne selon la revendication **9** ou la revendication **10** ou l'un de ses fragments.
  
- 12.** Utilisation selon l'une quelconque des revendications **1** à **6**, dans laquelle la souche de *Lactobacillus sakei* est la souche LHS2885 de la revendication **9**, ou la souche dérivée de LHS2885 de la revendication **10**.

## ABRÉGÉ

### UTILISATION DE LACTOBACILLUS SAKEI POUR LA BIOPRESERVATION DES PRODUITS DE LA MER

La présente invention concerne une souche de *Lactobacillus sakei* appelée souche *Lactobacillus sakei* LHS2885, ainsi qu'une souche dérivée de *L. sakei* LHS2885. La présente invention concerne également l'utilisation d'une souche de *L. sakei*, de préférence de la souche LHS2885 ou d'une souche dérivée de LHS2885 pour la conservation de produits alimentaires, de préférence de produits de la mer.

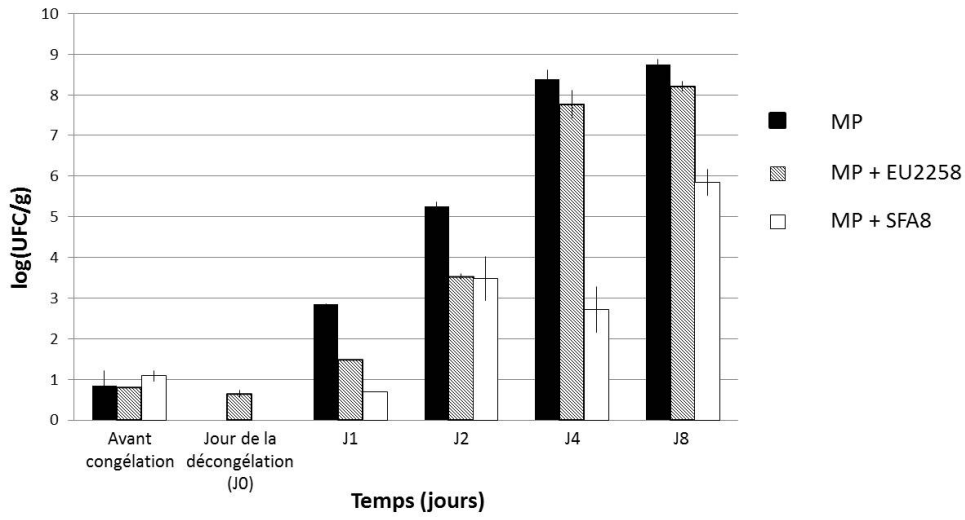


FIG. 1

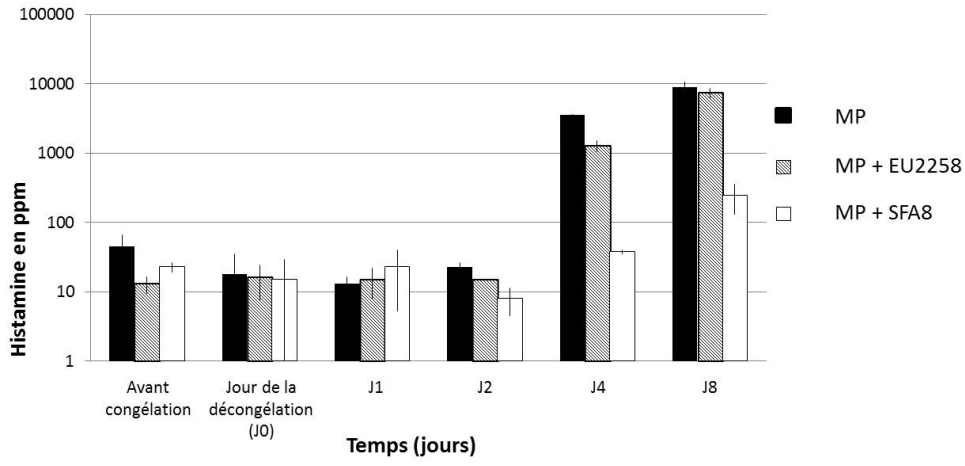


FIG. 2

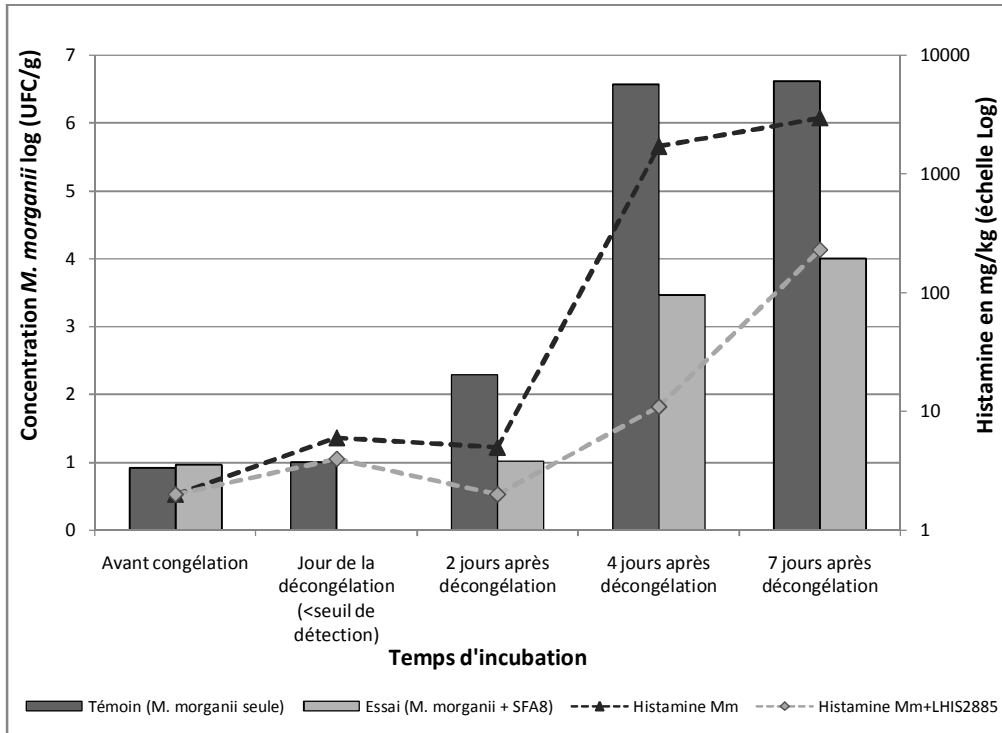


FIG. 3

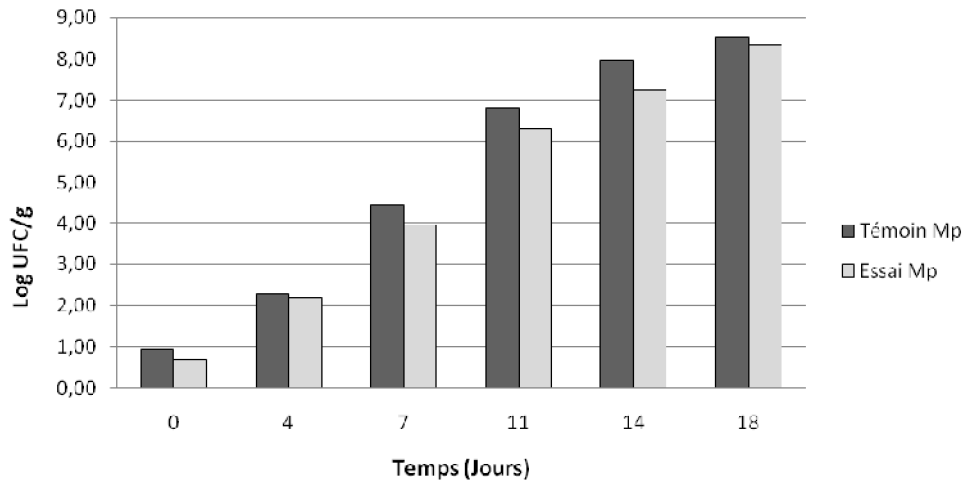


FIG. 4

5/6

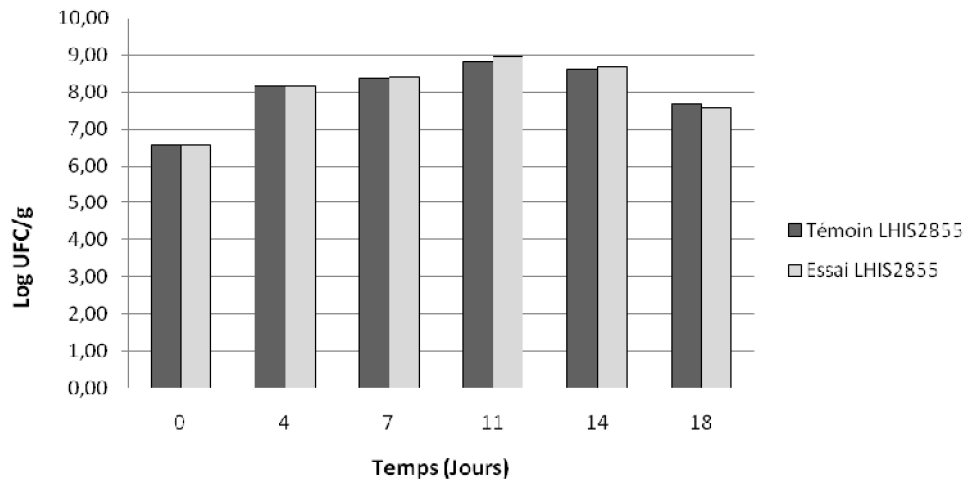


FIG. 5



6/6

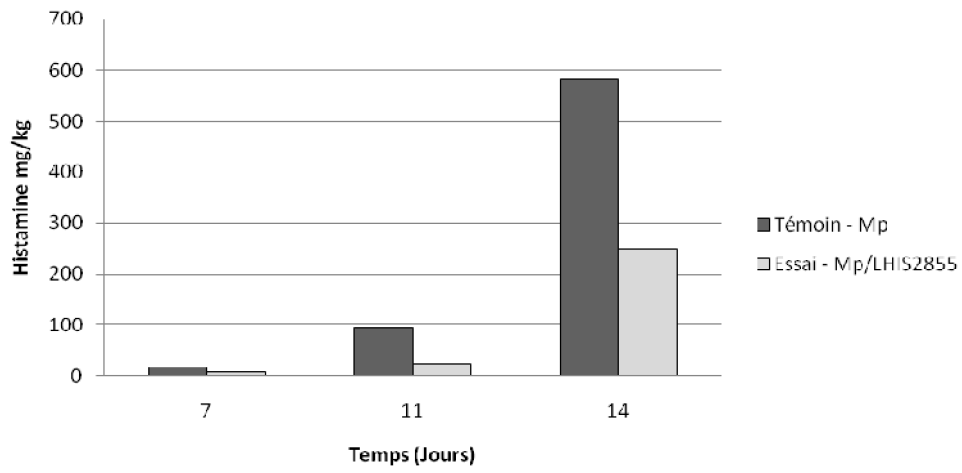


FIG. 6



## VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

### Publications

- ✓ **Brevet d'invention (Dépôt le 19 Avril 2013):** Dépôt d'un brevet d'invention sur la souche *L. sakei* CNCM I 4704 – Utilisation de *Lactobacillus sakei* pour la biopréservation des produits de la mer
- ✓ **Article en préparation (IJFM) :** Development of a real-time PCR method coupled with a selective pre-enrichment step for quantification of *Morganella morganii* and *Morganella psychrotolerans* in fish products
- ✓ **Article en préparation :** Screening of lactic acid bacteria of fish rich in histidine to prevent the development of histamine-producing bacteria in tuna by biopreservation

### Communications orales

- ✓ **Journées de l'Ecole Doctorale VENAM (Octobre 2011) :** Maîtrise de la formation de l'histamine dans les produits marins par le procédé de biopréservation
- ✓ **SFM –Lille (FR) (Février 2013) :** *Morganella psychrotolerans* – detection and enumeration in fish products by qPCR
- ✓ **FEMS – Leipzig (GER) (Juillet 2013) :** *Morganella psychrotolerans* – detection and enumeration in fish products by qPCR

### Communications affichées

- ✓ **Ecosystèmes microbiens - Oniris Nantes (FR) (Novembre 2011) -** Maîtrise de la formation d'histamine dans les produits marins par le procédé de biopréservation
- ✓ **FEMS Leipzig (GER) (Juillet 2013) :** Quantification of histamine-producing *Morganella* species in fish products by real-time PCR

### Encadrement de stagiaire

- ✓ Antoine Boussadi, BTS, Lycée de Talensac
- ✓ Iva Cholakova, Master 2,
- ✓ Agathe Le Guedes, Master 1, 21 Mai au 09 Aout 2013, ESIAB
- ✓ Mihanta Ramarossou, Master 2, 5 Mars au 31 Aout 2013, Université de Rennes

# Communications affichées



## Maîtrise de la formation de l'histamine dans les produits marins par le procédé de biopréservation

Gaëtan Poudou<sup>1,2,3</sup>, Françoise Leroi<sup>1</sup>, Hervé Prevost<sup>2,3</sup> et Marie-France Pilet<sup>1,2,3</sup>

- (1) IFREMER – Laboratoire de Sciences et Technologies de la Biomasse Marine (STBM) – BP21105 – 44311 Nantes Cedex 03 – France  
 (2) LUNAM université, ONIRIS – UMR1014 Sécurité des Aliments et Microbiologie (SECALIM) – Site de la Géraudière – BP82225 – 44321 Nantes Cedex 3 – France  
 (3) INRA, 44307 Nantes – France

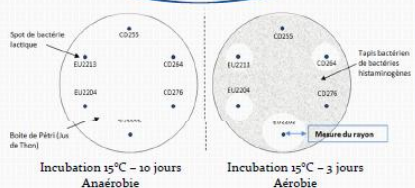
L'histamine est la première cause de toxico-infections liées à la consommation de poissons riches en histidine comme le thon, le maquereau, ou la sardine [1]. Elle est formée à la mort du poisson par la décarboxylation de l'histidine sous l'action d'une enzyme bactérienne, l'histidine décarboxylase. Les bactéries responsables de cette production sont en général des bactéries Gram négatif mésophiles (*Morganella morganii*, *Hafnia alvei*) ou psychrotrophes (*Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium phosphoreum*). La biopréservation, qui consiste à ajouter des microorganismes dans un aliment pour empêcher le développement de germe indésirable est un procédé déjà développé pour *Listeria monocytogenes* [2]. L'objectif de ce travail consiste à sélectionner des bactéries lactiques pour empêcher la croissance des bactéries histaminogènes pour une future application en produits.

### Matériels et méthodes

#### Screening rapide sur gélose au jus de thon

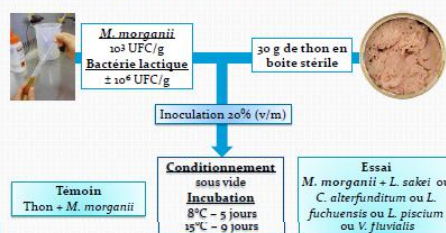
**39 bactéries lactiques isolées de produits de la mer**  
*Carnobacterium* spp., *Lactococcus* spp.,  
*Vagococcus* spp., *Leuconostoc* spp.,  
*Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp

Test vis-à-vis de...



#### Challenge-test en produit

Evaluation des capacités inhibitrices de 5 de ces souches face à *M. morganii* en produits artificiellement contaminés



**Analyses :** Dénombrement de *M. morganii*, des bactéries lactiques, du pH et de la concentration en histamine.

### Résultats



7 souches ont présenté des halos d'inhibitions (Fig. Tab.1) face à *M. morganii*, *H. alvei*, et *M. psychrotolerans*. La souche de *P. phosphoreum* n'a pas poussé lors de cette expérimentation.

Figure 1 : Halos d'inhibition sur gélose au jus de thon

Tableau 1 : Mesure des halos d'inhibition sur les boîtes de jus de thon

Bactérie lactique	<i>Morganella morganii</i> (CIPA232)	<i>Morganella psychrotolerans</i> (CIP200492)	<i>Hafnia alvei</i> (MIP2447)
Bactérie lactique (Crevette caramote) (HOU276)	0.15	0.15	0.15
<i>Carnobacterium alterfunditum</i> (EU2257)	1.55	1.65	1.1
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> (EU2255)	1.15	1.05	0.65
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> (EU2256)	1.05	0.85	0.65
<i>Lactobacillus sakei</i> (EU2262)	0.95	1.1	0.55
<i>Lactococcus piscium</i> (EU2258)	1.95	1.65	0.9
<i>Vagococcus fluvialis</i> (CD264)	0.65	NM	0.55

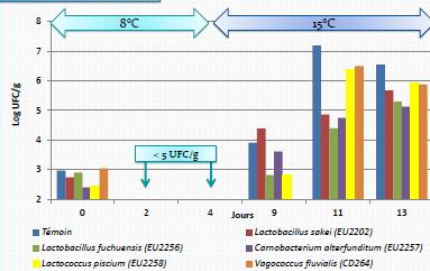


Figure 2 : Dénombrement de *M. morganii* sur milieu VRBG pendant 13 jours d'incubation

La croissance de *M. morganii* est ralentie de 2 log UFC/g par *L. sakei*, *C. alterfunditum* et *L. fuchuensis* à 11 jours d'incubation (Fig. 2). L'inhibition finale (13 jours) est de 1,7 log UFC/g avec *C. alterfunditum* et *L. fuchuensis*, et de ± 1 log UFC/g avec *L. sakei*, *L. piscium* et *V. fluvialis*.

Les bactéries lactiques se sont bien implantées dans le produit, elles atteignent une concentration de 8 log UFC/g à 13 jours d'incubation. Le pH a augmenté au cours de l'incubation, allant de 5,80 à l'inoculation jusqu'à 6,20 après 13 jours. La concentration en histamine des échantillons est en cours d'analyse.

### Conclusion

Le screening rapide sur boîtes a permis de mettre en évidence 7 souches inhibitrices, 5 d'entre elles ont été testées sur produits. Une inhibition est visible après 11 jours d'incubation. De nouvelles bactéries lactiques isolées de produits riches en histidine (thon, maquereau, sardine, hareng) sont actuellement en cours de screening. Des tests plus approfondis et des analyses sensorielles sur différents produits seront réalisés par la suite.

### Reference

- 1 - Hungerford J., 2010, Scombroid Poisoning: A review. *Toxicol*, Volume 56, Issue 2, 15 August 2010, Pages 231-243  
 2 - Brillat A., 2005, Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 104, Issue 3, October 2005, Pages 309-324

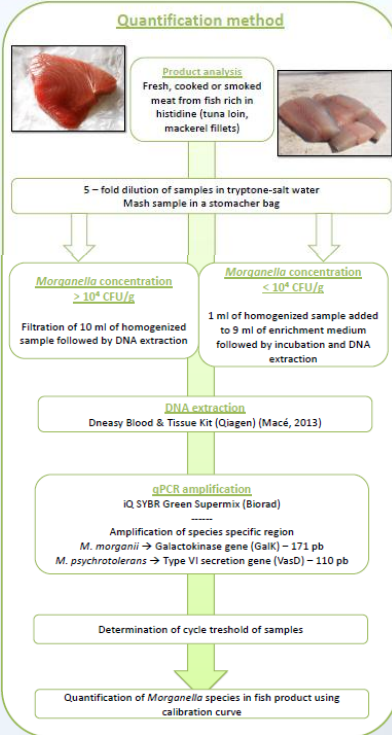
# QUANTIFICATION OF HISTAMINE-PRODUCING MORGANELLA SPECIES IN FISH PRODUCTS BY REAL-TIME PCR

PODEUR G.(1,2,3), LEROI F.(1), PREVOST H.(2, 3), PILET M.F.(2, 3), EMBORG J.(4, 7\*), MARTINUSSEN J.(5), HANSEN L.(6), DALGAARD P.(4)

Authors : (1) Ifremer Nantes - STBM, NANTES, FRANCE; (2) LUNAM Université, Oniris, UMR1014, Secalim, Nantes, F-44307, France; (3) INRA, Nantes, F-44307, France; (4) DTU Food, KGS LYNGBY, DENMARK; (5) DTU System Biology, KGS LYNGBY, DENMARK; (6) University of Copenhagen - Biology, COPENHAGEN, DENMARK; (7) Present address Chr. Hansen A/S, ROSKILDE, DENMARK

## Introduction

*Morganella morganii* and *Morganella psychrotolerans* are responsible of Histamine Fish Poisoning (HFP), a foodborne chemical intoxication. It is a relatively mild illness with allergy-like symptoms mainly related to consumption of fish rich in histidine such as Scombridae (tuna, mackerel...) and some other tropical species. These fish are altered by high concentration of histamine link to degradation of free histidine in tissue muscle (Prester, 2011). HFP is common and accounts for 30-40 % of the reported cases of human disease due to seafood consumption. Toxic concentrations of histamine are produced by decarboxylation of free histidine by bacterial decarboxylase. Histidine decarboxylase are produced by Gram-negative bacteria in fish products (Hungerford, 2010). Those *Morganella* species are part of the most effective producer of histamine. Production of high concentration of histamine is observed between 0-25°C for *M. psychrotolerans* (Mp) and 8-37°C for *M. morganii* (Mm) in fish. However, little is known about the occurrence and critical stages for fish contamination with these bacteria. Also, no selective media is available for their enumeration. To elucidate fish contamination a new species-specific and sensitive real-time PCR method has been developed.



## Results & discussion

### Enrichment setup

Enrichment step is done in *Morganella* enrichment broth (MoE) (tryptone 10g/l, yeast extract 5g/l, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7g/l, HK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7g/l, colistin 32mg/l), a new selective medium which improved growth of *Morganella* species and inhibit growth of other histamine producing bacteria (*Enterobacter aerogenes*, *Photobacterium phosphoreum*, *Hafnia alvei*, ...). Growth kinetics of *Morganella* species in MoE have been established in triplicate from 3 different matrices (broth, canned tuna, shrimp):  
 → *M. morganii*:  $\mu_{max} = 2.024 \text{ h}^{-1}$  in MoE medium at 37°C - Enrichment of 7h  
 → *M. psychrotolerans*:  $\mu_{max} = 0.18 \text{ h}^{-1}$  in MoE medium at 10°C - Enrichment of 72h

These growth rates will be used to determine the initial concentration of *Morganella* in the fish product after enrichment step and quantification on standard curve.

### qPCR quantification

Quantification of Mp and Mm in fish products based on a standard curve (Figure 1) in canned tuna has an efficiency of 96-100% and a coefficient of determination of 0.99. Detection range is between 50 to 10<sup>7</sup> CFU/g when the enrichment step is applied and 10<sup>1</sup> to 10<sup>8</sup> CFU/g for direct DNA extraction.

Figure 1: Standard curve in canned tuna matrix developed for *M. morganii* (A) and *M. psychrotolerans* (B)

For direct DNA extraction, concentration of *Morganella* is calculated on the standard curve. After enrichment step, concentration is calculated and reported on the following equation to determine the initial concentration based on growth rate in MoE medium:  $\text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_0) + (\mu_{max} \cdot \text{time}) / \text{Ln}(10)$

### Application on fish products

qPCR method has been tested on 6 types of fish product in triplicate.

Fresh products	Lightly-preserved fish products
Tuna loin	Cold-smoked salmon
Herring fillets	Hot-smoked mackerel
Frozen tuna steak	Matjesfillets

All products were free of both *Morganella* species. However, hot smoked mackerel and herring fillets were contaminated with *P. phosphoreum* (plate count), another bacteria also responsible of histamine fish poisoning.

## Conclusion

A method has been developed for quantification of *M. psychrotolerans* or *M. morganii* in fish products rich in histidine. It allows the quantification of *Morganella* species in a range of 50 to 10<sup>8</sup> CFU/g when coupled to an enrichment step for low levels (< 10<sup>4</sup> CFU/g). Specificity and sensibility of this method are better than classical plate count and obtain faster results. This tool will be interesting to study occurrence of this bacteria in fish products during the process, in order to reduce safety risk for consumers and economical losses for industry due to histamine formation.

## References

- Hungerford, J.M., 2010. Scombroid poisoning: A review. *Toxicol* 56, 231-243.
- Macé, S., Mamiouk, K., Chipchakova, S., Prevost, H., Joffraud, J.-J., Dalgaard, P., Pilet, M.-F., Dousset, X., 2013. Development of a Rapid Real-Time PCR Method as a Tool to Quantify Viable *Photobacterium phosphoreum* in Salmon (*Salmo salar*) Steaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2612-2619.
- Prester, L., 2011. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* 28, 1547-1550.

## Communications orales

### Journées scientifiques de l'ED VENAM (Angers - 2011)

#### *Maîtrise de la formation de l'histamine dans les produits marins par le procédé de biopréservation*

**Auteurs :** Gaëtan Podeur, Françoise Leroi, Marie-France Pilet, Hervé Prevost

**Adresse :** Bactéries lactiquesoratoire EM3B, Ifremer Nantes, B.P. 21105, 44311 Nantes Cedex 03

L'histamine est la première cause de toxi-infections liées à la consommation de poissons riches en histidine comme le thon, le maquereau ou la sardine. Elle est formée à la mort du poisson par la décarboxylation de l'histidine, sous l'action d'une enzyme bactérienne, l'histidine décarboxylase. Les bactéries responsables de cette production sont en général des bactéries Gram négatif mésophiles (*Morganella morganii*, *Hafnia alvei*) ou psychrotrophes (*Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium phosphoreum*). L'objectif de la thèse consiste à mieux comprendre les mécanismes de formation de l'histamine et de proposer des outils d'appréciation et de maîtrise du risque, en particulier par le procédé de biopréservation. Le procédé de biopréservation consiste à ensemercer un produit avec des bactéries sélectionnées pour leurs capacités à empêcher le développement des germes indésirables.

Lors de cette première année de thèse, un screening rapide de 39 souches de bactéries lactiques issues de produits marins a été réalisé par un test sur boîtes de pétri en conditions modèles vis à vis de 4 souches de bactéries histaminogènes. Ce test a mis en évidence 7 souches de bactéries lactiques inhibitrices sur un milieu gélosé à base de thon frais. Ces bactéries ont ensuite été testées par challenge-test sur du thon stérilisé, conditionné sous vide à 4°C et à 15°C pendant 13 jours, afin de vérifier leur capacité inhibitrice face à *Morganella morganii* dans une matrice proche du produit initial (longe de thon frais). Des souches de *Carnobacterium alterfunditum*, *Lactobacillus fuchuensis* et *Lactobacillus sakei* ont présenté une inhibition de 2 log UFC/g après 11 jours d'incubation. La production d'histamine a été mesurée dans ces produits par HPLC afin de vérifier l'intérêt de ces souches dans le procédé de biopréservation.

La mise en évidence de bactéries lactiques inhibitrices sur une matrice thon est un premier pas encourageant dans la poursuite de nos recherches.

**Mots clés :** Histamine, histidine décarboxylase, biopréservation, PCR quantitative, poisson

## Abstract SFM congress at Lille (France - 2012)

**Authors (Order not yet implemented):** PODEUR G.(1), LEROI F.(2), PREVOST H.(3), PILET M.F.(3), DALGAARD P.(4), EMBORG J.(5), MARTINUSSEN J.(6), HANSEN L.(7)

(1) Ifremer - Oniris Nantes, NANTES, FRANCE ; (2) Ifremer Nantes -EM3B, NANTES, FRANCE ; (3) Oniris - UMR1014 Secalim, NANTES, FRANCE ; (4) DTU Food, KGS LYNGBY, DANEMARK ; (5) Chr. Hansen A/S, ROSKILDE, DANEMARK ; (6) DTU System Biology, KGS LYNGBY, DANEMARK ; (7) University Copenhagen - Biology, COPENHAGEN, DANEMARK

### ***Morganella psychrotolerans* – detection and enumeration in fish products by qPCR**

Histamine fish poisoning is common and accounts for 30–40 % of the reported cases of human disease due to aquatic food consumption. Toxic concentrations of histamine can be produced by bacteria in fish products with a high content of the free amino acid histidine. Several mesophilic enterobacteriaceae, including *Morganella morganii*, can produce very high levels of histamine in fish flesh. In addition, psychrotolerant bacteria (*Photobacterium phosphoreum* and *Morganella psychrotolerans*) were recently responsible for histamine formation in fish that caused histamine fish poisoning in Japan and Denmark. *M. psychrotolerans* was identified as a new species in 2006 and it is able to produce high concentrations of histamine at temperatures as low as 0°C to 5°C. This seems a major challenge for chilled distribution of tuna and other marine finfish known to accumulate histamine. However, little is known about the occurrence and critical stages for fish contamination and histamine production by *M. psychrotolerans*. qPCR methods were previously developed to detect mesophilic histamine producing bacteria including both Gram-negative and Gram-positive species. The aim of the present study was to develop a specific and sensitive real-time SYBR Green PCR method for quantification of *M. psychrotolerans* in different fish products.

Two new genomic sequences for *M. psychrotolerans* (U2/3) and *M. morganii* (U6/1) were used to design qPCR primers. The primer pair MpVasD-FR4 was selected and it amplified a 110 bp fragment of the VasD gene from the type VI secretion system of *M. psychrotolerans*. Its specificity has been confirmed on 43 strains, including 15 *M. psychrotolerans*, 9 *M. morganii* and 19 other histamine producing or non-producing strains. The qPCR standard curve for *M. psychrotolerans* in canned tuna was linear from  $10^4$  to  $10^8$  cfu/g with an efficiency of 94 % - 96 %. In order to increase sensitivity of the new qPCR method to about 10 cfu/g an enrichment procedure was developed using the antibiotic colistin and incubation at 10°C to improved selectivity.

This selective and sensitive qPCR method is currently used to study the occurrence of *M. psychrotolerans* in fish products of importance for histamine fish poisoning. The new method will contribute to a better understanding of the occurrence and histamine production by psychrotolerant bacteria in fish products, information that is essential to reduce the unacceptably high frequency of histamine fish poisoning.

## Abstract FEMS congress at Leipzig (Germany -2013)

**Authors:** PODEUR G.(1,2,3), LEROI F.(1), PREVOST H.(2, 3), PILET M.F.(2, 3), EMBORG J.(4, 7\*), MARTINUSSEN J.(5), HANSEN L.(6), DALGAARD P.(4)

(1) Ifremer Nantes - EM3B, NANTES, FRANCE; (2) LUNAM Université, Oniris, UMR1014, Secalim, Nantes, F-44307, France. (3) INRA, Nantes, F-44307, France (4) DTU Food, KGS LYNGBY, DENMARK; (5) DTU System Biology, KGS LYNGBY, DENMARK; (6) University of Copenhagen - Biology, COPENHAGEN, DENMARK; (7) Present address Chr. Hansen A/S, ROSKILDE, DENMARK

### **Quantification of histamine-producing *Morganella* species in fish products by real-time PCR**

Histamine fish poisoning is common and accounts for 30–40 % of the reported cases of human disease due to aquatic food consumption. Toxic concentrations of histamine are mainly produced by Gram-negative bacteria in fish products with a high content of the free amino acid histidine. The genus *Morganella* includes two of the most effective producer of histamine already reported in histamine fish poisoning case. *M. morganii* (*Mm*) and *M. psychrotolerans* (*Mp*) are strong producer of histamine between 10–37°C and 0–25°C respectively. However, little is known about the occurrence and critical stages for fish contamination with these bacteria. To elucidate fish contamination a new specific and sensitive real-time PCR method for *Mm* and *Mp* has been developed. This species-specific real-time PCR, with each primers-sets designed on the basis of new genome sequences, are inclusive for *Mm* and *Mp* and do not cross react with others histamine or non histamine producing bacteria. To improve sensitivity of the qPCR method, a quantitative enrichment step in a liquid broth was developed. Quantification in fish products based on a standard curve in canned tuna has an efficiency of 96–100%, and is able to detect between 50 and 10<sup>9</sup> CFU/g of *Mp* and *Mm* when the enrichment step is applied. This selective and sensitive qPCR method is currently used to study the occurrence of *Mm* and *Mp* in fish products of importance for histamine fish poisoning. The new method will contribute to a better understanding of the occurrence and histamine production by *Morganella* species in fish products, information that is essential to reduce the unacceptably high frequency of histamine fish poisoning.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## A

Aasen, I.M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., Naterstad, K., 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 35–43.

Ababouch, L., Afilal, M.E., Rhafiri, S., Busta, F.F., 1991. Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25° C). *Food Microbiol.* 8, 127–136.

Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., 2003. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J. Microbiol. Methods* 55, 599–605.

Acosta-Martínez, V., Dowd, S., Sun, Y., Allen, V., 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2762–2770.

Alfaro, B., Hernandez, I., 2013. Evolution of the indigenous microbiota in modified atmosphere packaged Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) identified by conventional and molecular methods. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 117–123.

Allison, G.E., Fremaux, C., Klaenhammer, T.R., 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176, 2235–2241.

Alper, M.D., Ames, B.N., 1975. Positive selection of mutants with deletions of the gal-chl region of the *Salmonella* chromosome as a screening procedure for mutagens that cause deletions. *J. bacteriol.* 121, 259–266.

Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M.A., Sinigaglia, M., 2005. Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1294–1302.

Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., Chevallier, I., 2005. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiol.* 22, 529–538.

Andrighetto, C., Lombardi, A., Ferrati, M., Guidi, A., Corrain, C., Arcangeli, G., 2009. Lactic acid bacteria biodiversity in Italian marinated seafood salad and their interactions on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 20, 462–468.

ANSES, 2013. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux recommandations sur les bénéfices et les risques liés à la consommation de produits de la pêche dans le cadre de l'actualisation des repères nutritionnels du PNNS. Avis ANSES 7.

Aras, Kaban, G., Hisar, O., Yanik, T., Kaya, M., 2005. Effect of *Lactobacillus sakei* Lb706 on behavior of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed rainbow trout fillets. Turk J Vet Anim Sci 29, 1039–1044.

Arnold, S.H., Price, R.J., Brown, W.D., 1980. Histamine formation by bacteria isolated from skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46.

Ast, J.C., Dunlap, P.V., 2005. Phylogenetic resolution and habitat specificity of members of the *Photobacterium phosphoreum* species group. Environ. Microbiol. 7, 1641–1654.

Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., Lindgren, S.E., 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microb. Ecol. Health Dis. 2, 131–136.

Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M.C., Bover-Cid, S., Hugas, M., 2006. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. J. Appl. Microbiol. 100, 40–49.

Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsmma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. BMC Genomics 9, 75.

## B

Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C., 2005. Biogenic amine index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). J. Food Prot. 68, 2433–2438.

Bárria, C., Malecki, M., Arraiano, C.M., 2013. Bacterial adaptation to cold. Microbiology 159, 2437–2443.

Barthelmebs, L., Divies, C., Cavin, J.-F., 2000. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities Involved in phenolic acid metabolism. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3368–3375.

Bartholomew, B., Berry, P., Rodhouse, J., Gilbert, R., Murray, C., 1987. Scombrototoxic fish poisoning in Britain - Features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986. Epidemiol. Infect. 99, 775–782.

Bartowsky, E.J., Stockley, C.S., 2011. Histamine in Australian wines-a survey between 1982 and 2009. Ann. Microbiol. 61, 167–172.

Basby, M., Jeppesen, V.F., Huss, H.H., 1998. Characterization of the microflora of lightly salted lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) roe stored at 5 °C. J. Aquat. Food Prod. Technol. 35–51.

Batra, Y.K., Rajeev, S., 2007. Effect of common herbal medicines on patients undergoing anaesthesia. Indian J. Anaesth. 51, 184.

Bhagwat, A.A., 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 217–224.

Bingle, L.E., Bailey, C.M., Pallen, M.J., 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol., Host–Microbe Interactions: Bacteria* 11, 3–8.

Bjornsdottir, K., Bolton, G.E., McClellan-Green, P.D., Jaykus, L.-A., Green, D.P., 2009. Detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish: a comparative study. *J. Food Prot.* 72, 1987–1991.

Björnsdóttir-Butler, K., Bolton, G.E., Jaykus, L.-A., McClellan-Green, P.D., Green, D.P., 2010. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 161–167.

Bjornsdottir-Butler, K., Jones, J.L., Benner, R., Burkhardt, W., 2011a. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish. *Food Microbiol.* 28, 356–363.

Bjornsdottir-Butler, K., Jones, J.L., Benner, R.A., Burkhardt, W., 2011b. Quantification of total and specific gram-negative histamine-producing bacteria species in fish using an MPN real-time PCR method. *Food Microbiol.* 28, 1284–1292.

Block, B., Stevens, D., 2001. *Tuna - Physiology, ecology and evolution*, Elsevier. ed. Amsterdam, Netherlands. 468p.

Bolton, G., Bjornsdottir, K., Nielsen, D., Luna, P., Green, D., 2009. Effect of high hydrostatic pressure on histamine forming bacteria in yellowfin tuna and mahi-mahi skinless portions.

Børresen, T., 2008. *Improving seafood products for the consumer*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, 585p.

Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87–97.

Bover-Cid, S., Holzappel, W.H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 33–41.

Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Carmen Vidal-Carou, M., 2001. Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Sci.* 57, 215–221.

Boyer, J., Depierre, F., Tissier, M., Jacob, L., 1956. Histaminic poisoning of a group by Tunny-fish. *Presse Med.* 64.

Bozkurt, H., 2006. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and Thymbra spicata oil in Turkish dry-fermented sausage. Meat Sci. 73, 442–450.

Bredholt, S., Nesbakken, T., Holck, A., 2001. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. Int. J. Food Microbiol. 66, 191–196.

Brillantes, S., Paknoi, S., Totakien, A., 2002. Histamine formation in fish sauce production. J. Food Sci. 67, 2090–2094.

Brillet, A., Pilet, M.-F., Prevost, H., Bouttefroy, A., Leroi, F., 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. J. Appl. Microbiol. 97, 1029–1037.

Brillet, A., Pilet, M.-F., Prevost, H., Cardinal, M., Leroi, F., 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. Int. J. Food Microbiol. 104, 309–324.

Budsberg, K.J., Wimpee, C.F., Braddock, J.F., 2003. Isolation and identification of *Photobacterium phosphoreum* from an unexpected niche: migrating salmon. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6938–6942.

Bunkova, L., Bunka, F., Pollakova, E., Podesvova, T., Drab, V., 2011. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Int. J. Food Microbiol. 147, 112–119.

Burdychova, R., Komprda, T., 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. FEMS Microbiol. Lett. 276, 149–155.

Bustin, S.A., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J. Mol. Endocrinol. 29, 23–39.

## C

Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., Barros-Velazquez, J., 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. Food Bioprocess Technol. 1, 43–63.

Campos, C.A., Gliemmo, M.F., Aubourg, S.P., Velázquez, J.B., 2012. Novel technologies for the preservation of chilled aquatic food products, in: Novel technologies in food science. Springer, pp. 299–323.

Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.-M., Dudez, A.-M., Martin, V., Beaufils, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec, M., 2005. The complete genome

sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. Nat. Biotechnol. 23, 1527–1533.

Chaillou, S., Daty, M., Baraige, F., Dudez, A.-M., Anglade, P., Jones, R., Alpert, C.-A., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., 2009. Intraspecies genomic diversity and natural population structure of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 970–980.

Chaillou, S., Christieans, S., Rivollier, M., Lucquin, I., Champomier-Vergès, M.C., Zagorec, M., 2014. Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. Meat Sci. 97, 332–338.

Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Desmonts, M., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J.-J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Macé, S., Pilet, M.-F., Prévost, H., Rivollier, M., Roux, D., Talon, R., Zagorec, M., & Champomier-Vergès, M., 2013. Core and variable components of microbial communities identified in spoiled meat and seafood products using pyrosequencing of 16S rRNA genes. Paper presented at the Microbial Diversity 2013: Microbial Interactions in Complex Ecosystems, Turin (Italie), 23-25 octobre.

Champomier-Vergès, M.-C., Chaillou, S., Cornet, M., Zagorec, M., 2001. *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. Res. Microbiol. 152, 839–848.

Charette, S.J., Brochu, F., Boyle, B., Filion, G., Tanaka, K.H., Derome, N., 2012. Draft genome sequence of the virulent strain 01-B526 of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. J. Bacteriol. 194, 722–723.

Chen, Y.-T., Peng, H.-L., Shia, W.-C., Hsu, F.-R., Ken, C.-F., Tsao, Y.-M., Chen, C.-H., Liu, C.-E., Hsieh, M.-F., Chen, H.-C., Tang, C.-Y., Ku, T.-H., 2012. Whole-genome sequencing and identification of *Morganella morganii* KT pathogenicity-related genes. BMC Genomics 13.

Chern, E.C., Siefring, S., Paar, J., Doolittle, M., Haugland, R.A., 2011. Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. Lett. Appl. Microbiol. 52, 298–306.

CITPPM, 2012. Rapport du projet Histabio - Etude de faisabilité sur l'inhibition de la formation de l'histamine dans le thon par la biopréservation.

Claesson, M.J., Van Sinderen, D., O'Toole, P.W., 2007. The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity. FEMS Microbiol. Lett. 269, 22–28.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71, 1–20.

Condon, C., Squires, C., Squires, C.L., 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 59, 623–645.

Copeland, W.C., Domena, J.D., Robertas, J.D., 1989. The molecular cloning, sequence and expression of the *hdcB* gene from *Lactobacillus* 30A. *Gene* 85, 259–265.

Corbella, M.E., Puyet, A., 2003. Real-time reverse transcription-PCR analysis of expression of halobenzoate and salicylate catabolism-associated operons in two strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2269–2275.

Cosansu, S., Mol, S., Alakavuk, D.U., Tosun, 2011. Effects of *Pediococcus* spp. on the quality of vacuum-packed Horse Mackerel during cold storage. *J Agri Sci* 17, 59–66.

Costantini, A., Cersosimo, M., Del Prete, V., Garcia-Moruno, E., 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *J. Food Prot.* 69, 391–396.

Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 199–204.

Coulthurst, S.J., 2013. The Type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. *Res. Microbiol., Bacterial secretion systems: function and structural biology* 164, 640–654.

Crapo, C., Himelbloom, B., 1999. Spoilage and histamine in Whole Pacific herring (*Clupea Harengus Pallasii*) and Pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) Fillets. *J. Food Saf.* 19, 45–55.

Croux, D., Vangerven, T., Broeders, J., Boutsen, J., Peeters, M., Duchateau, S., Cleij, T., Deferme, W., Wagner, P., Thoelen, R., De Ceuninck, W., 2013. Molecular imprinted polymer films on RFID tags: a first step towards disposable packaging sensors. *Phys. Status Solidi A* 210, 938–944.

CSPI, 2005. Outbreak Alert. Closing the gaps in our Federal Food-Safety Net. Disponible sur : <https://www.cspinet.org/> (Consulté le 10/2013)

## D

Da Silva, M.V., Pinho, O., Ferreira, I., Plestilová, L., Gibbs, P.A., 2002. Production of histamine and tyramine by bacteria isolated from Portuguese vacuum-packed cold-smoked fish. *Food Control* 13, 457–461.

Daboor, S.M., Ibrahim, S.M., 2008. Biochemical and microbial aspects of tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) biopreserved by *Streptomyces* sp. metabolites, in: Proc. 4 International Conference of Th Veterinary Research Division, National Research Center (NRC), Cairo, Egypt. pp. 39–49.

Dalgaard, P., 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 319–333.

Dalgaard, P., Madsen, H.L., Samieian, N., Emborg, J., 2006. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) - effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *J. Appl. Microbiol.* 101, 80–95.



Dalgaard, P., Emborg, J., Kjølby, A., Sørensen, N.D., Ballin, N.Z., 2008. Histamine and biogenic amines - formation and importance in seafood. In: Børresen, T. (Ed.). Improving seafood products for the consumer. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, pp. 292-324.

Dalgaard, P., Gram, L., Huss, H.H., 1993. Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 283–294.

Dalgaard, P., Mejlholm, O., Huss, H.H., 1996. Conductance method for quantitative determination of *Photobacterium phosphoreum* in fish products. *J. Appl. Microbiol.* 81, 57–64.

Dalgaard, P., Mejlholm, O., Christiansen, T.J., Huss, H.H., 1997. Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere-packed fish products. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 373–378.

Dapkevicius, M.L., Nout, M.J., Rombouts, F.M., Houben, J.H., Wymenga, W., 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 107–114.

Davies, H., 2010. A role for “omics” technologies in food safety assessment. *Food Control* 21, 1601–1610.

De las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A.V., Munoz, R., 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *J. Food Prot.* 69.

De Las Rivas, B., Marcobal, A., Munoz, R., 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *Fems Microbiol. Lett.* 244, 367–372.

De Las Rivas, B., Rodríguez, H., Carrascosa, A. v., Muñoz, R., 2008. Molecular cloning and functional characterization of a histidine decarboxylase from *Staphylococcus capitis*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 194–203.

De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 194–199.

Decoin, V., Barbey, C., Bergeau, D., Latour, X., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Merieau, A., 2014. A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. *PLoS ONE* 9, e89411.

Diaz-Cinco, M., Fraijo, O., Grajeda, P., Lozano-Taylor, J., Mejia, E.G., 1992. Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationship to histamine and tyramine. *J. Food Sci.* 57, 355–356.

Dr, S., 1991. Scombroid poisoning. A report of seven cases involving the Western Australian salmon, *Arripis truttaceus*. *Med. J. Aust.* 157, 748–751.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., Prévost, H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 564–582.

Desroche, N., Beltramo, C., Guzzo, J., 2005. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J. Microbiol. Methods* 60, 325–333.

Douzi, B., Spinelli, S., Blangy, S., Roussel, A., Durand, E., Brunet, Y.R., Cascales, E., Cambillau, C., 2014. Crystal structure and self-interaction of the type VI secretion tail-tube protein from enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 9, e86918.

Duffes, F., 1999. Improving the control of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 211–216.

Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X., Boyaval, P., 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *in situ* produced and semi-purified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* 62, 1394–1403.

Duflos, G., Dervin, C., Malle, P., Bouquelet, S., 1999. Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *J.-AOAC Int.* 82, 1357–1363.

## E

EFSA, 2011-2013. Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the framework of Directive 2003/99/EC and on some other pathogenic microbiological agents for information. Disponible sur : <http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/pub/408e.htm> (Consulté le 08/2013)

Einarsson, H., Lauzon, H.L., 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 669–676.

Elotmani, F., Assobhei, O., 2004. *In vitro* inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 60–65.

Emborg, J., Laursen, B. g., Rathjen, T., Dalgaard, P., 2002. Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2°C. *J. Appl. Microbiol.* 92, 790–799.

Emborg, J., Laursen, B.G., Dalgaard, P., 2005. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 °C—effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 263–279.

Emborg, J., 2006. *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2473–2479.

Emborg, J., Dalgaard, P., 2006. Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: An investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *J. Food Prot.* 69, 897–906.

Emborg, J., Dalgaard, P., 2008a. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 226–233.

Emborg, J., Dalgaard, P., 2008b. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii* - development and evaluation of predictive models. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 234–243.

Ercolini, D., Ferrocino, I., Nasi, A., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., Storia, A.L., Laghi, L., Mauriello, G., Guerzoni, M.E., Villani, F., 2011. Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7372–7381.

Eriani, G., Cavarelli, J., Martin, F., Ador, L., Rees, B., Thierry, J.-C., Gangloff, J., Moras, D., 1995. The class II aminoacyl-tRNA synthetases and their active site: evolutionary conservation of an ATP binding site. *J. Mol. Evol.* 40, 499–508.

ESR, 2006. Annual summary of Outbreaks in New Zealand 2001-2005. Disponible sur : [https://surv.esr.cri.nz/surveillance/annual\\_outbreak.php](https://surv.esr.cri.nz/surveillance/annual_outbreak.php) (Consulté le 08/2013)

## F

Falagas, M.E., Kavvadia, P.K., Mantadakis, E., Kofteridis, D.P., Bliziotis, I.A., Saloustros, E., Maraki, S., Samonis, G., 2006. *Morganella morganii* infections in a general tertiary hospital. *Infection* 34, 315–321.

Fall, P.-A., 2011. Études des interactions entre la bactérie bioprotectrice *Lactococcus piscium* et *Brochothrix thermosphacta* et *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale. Université de Nantes.

Fall, P.A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F., Pilet, M.F., 2010a. Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 357–361.

Fall, P.A., Leroi, F., Chevalier, F., Guérin, C., Pilet, M.-F., 2010b. Protective Effect of a Non-Bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 Strain Against *Listeria monocytogenes* in Sterilized Tropical Cooked Peeled Shrimp. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 19, 84–92.

FAO, 2013. Fisheries and Aquaculture topics. Fisheries statistics and information. Disponible sur : <http://www.fao.org/fishery/sofia/en> (Consulté le 03/2014).

Farmer Iii, J.J., Hickman-Brenner, F.W., 2006. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*, in: *The Prokaryotes*. Springer, pp. 508–563.

Feldman, K.A., Werner, S.B., Cronan, S., Hernandez, M., Horvath, A.R., Lea, C.S., Au, A.M., Vugia, D.J., 2005. A large outbreak of scombroid fish poisoning associated with eating escolar fish (*Lepidocybium flavobrunneum*). *Epidemiol. Infect.* 133, 29–33.

Ferencik, M., 1970. Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the flesh of some marine fishes. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 14.

Ferencik, M., Krcmery, V., Kriska, J., 1961. Fish poisoning caused by histamine. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 5.

Fernandez-García, E., Tomillo, J., Nuñez, M., 2000. Formation of biogenic amines in raw milk Hispánico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *J. Food Prot.* 63, 1551–1555.

Ferrario, C., Pegollo, C., Ricci, G., Borgo, F., Fortina, M.G., 2012a. PCR detection and identification of histamine-forming bacteria in filleted tuna fish samples. *J. Food Sci.* 77, M115–M120.

Ferrario, C., Ricci, G., Borgo, F., Fortina, M.G., 2012b. Species-specific DNA probe and development of a quantitative PCR assay for the detection of *Morganella morganii*. *Lett. Appl. Microbiol.*

Ferrario, C., Borgo, F., de las Rivas, B., Muñoz, R., Ricci, G., Fortina, M.G., 2014. Sequencing, characterization, and gene expression analysis of the histidine decarboxylase gene cluster of *Morganella morganii*. *Curr. Microbiol.* 68, 404–411.

Fields, M.L., Richmond, B.S., 1968. Food quality as determined by metabolic by-products of microorganisms. *Adv. Food Res.* 16.

Filloux, A., Hachani, A., Blevès, S., 2008. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 154, 1570–1583.

Fletcher, G.C., Corrigan, V.K., Summers, G., Leonard, M.J., Jerrett, A.R., Black, S.E., 2003. Spoilage of rested harvested king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Food Sci.* 68, 2810–2816.

FranceAgriMer, 2011. Le marché mondial du thon, production et échanges - Zoom sur le marché français. Disponible sur : <http://www.franceagrimer.fr/content/download/3100/16798/file/thon-07-2011.pdf> (Consulté le 09/2013).

Frank, H.A., Baranowski, J.D., Chongsiriwatana, M., Brust, P.A., Premaratne, R.J., 1985. Identification and decarboxylase activities of bacteria isolated from decomposed mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) after incubation at 0 and 32° C. *Int. J. Food Microbiol.* 2, 331–340.

Francklyn, C., Adams, J., Augustine, J., 1998. Catalytic defects in mutants of class II histidyl-tRNA synthetase from *Salmonella typhimurium* previously linked to decreased control of histidine biosynthesis regulation. *J. Mol. Biol.* 280, 847–858.

Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J., Sonomoto, K., 2007. Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2871–2877.

## G

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51–70.

Gancel, F., Dzierszinski, F., Tailliez, R., 1997. Identification and characterization of *Lactobacillus* species isolated from fillets of vacuum-packed smoked and salted herring (*Clupea harengus*) *J. Appl. Microbiol.* 82, 6, 722–728.

Gao, F., Zhang, C.-T., 2008. Ori-Finder: A web-based system for finding oriCs in unannotated bacterial genomes. *BMC Bioinformatics* 9, 79.

Garnier, M., Matamoros, S., Chevret, D., Pilet, M.-F., Leroi, F., Tresse, O., 2010. Adaptation to cold and proteomic responses of the psychrotrophic biopreservative *Lactococcus piscium* strain CNCM I-4031. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8011–8018.

Garrett, A., Brown, A., 2009. Yellowfin tuna - A global and UK supply chain analysis. Disponible sur : [http://www.seafish.org/media/Publications/Yellowfin\\_tuna\\_Global\\_and\\_UK\\_supply\\_chain\\_analysis.pdf](http://www.seafish.org/media/Publications/Yellowfin_tuna_Global_and_UK_supply_chain_analysis.pdf).

Gautam, V., Gupta, V., Joshi, R.M., Sawhney, G., Duhan, S., 2003. *Morganella morganii*-associated arthritis in a diabetic patient. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3451–3451.

Gatesoupe, F.-J., Covès, D., Ortega, A., Papandroulakis, N., Vadstein, O., de la Gándara, F., 2013. A spatiotemporal study of bacterial community profiles associated with Atlantic bluefin tuna larvae, *Thunnus thynnus* L., in three Mediterranean hatcheries. *Aquac. Res.* 44, 1511–1523.

Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M., Christen, R., 1995. Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the Genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 139–144.

Geiger, E., 1944. Histamine content of unprocessed and canned fish. A tentative method for quantitative determination of spoilage. *J. Food Sci.* 9, 293–297.

Geiger, E., 1955. Role of histamine in poisoning with spoiled fish. *Science* 121.

Gessner, B.D., Hokama, Y., Isto, S., 1996. Scombrotoxicosis-like illness following the ingestion of smoked salmon that demonstrated low histamine levels and high toxicity on mouse bioassay. *Clin. Infect. Dis.* 23, 1316–1318.

Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K.J., Kneifel, W., 2013. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review. *LWT - Food Sci. Technol.* 54, 315–324.

Gilbert, R., Hobbs, G., Murray, C., Cruickshank, J., Young, S., 1980. Scombrotoxic fish poisoning - features of the 1st 50 incidents to be reported in Britain (1976-9). *Br. Med. J.* 281, 71–72.

Gingerich, T.M., Lorca, T., Flick, G.J., Pierson, M.D., McNair, H.M., 1999. Biogenic amine survey and organoleptic changes in fresh, stored, and temperature-abused bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *J. Food Prot.* 62, 1033–1037.

Gingerich, T.M., Lorca, T., Flick Jr, G.J., McNair, H.M., Pierson, M.D., 2001. Isolation of histamine-producing bacteria from fish-processing facilities and fishing vessels. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 10, 61–66.

Golebiewski, M., Deja-Sikora, E., Cichosz, M., Tretyn, A., Wróbel, B., 2014. 16S rDNA Pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microb. Ecol.* 1–13.

González-Rodríguez, M.-N., Sanz, J.-J., Santos, J.-Á., Otero, A., García-López, M.-L., 2002. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 161–168.

Gregersen, T., 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5, 123–127.

Gross, E., Morell, J.L., 1971. Structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 4634–4635.

Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L., Vincenzini, M., 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.* 44, 374–378.

Guillier, L., Thébault, A., Gauchard, F., Pommepuy, M., Guignard, A., Malle, P., 2011. A risk-based sampling plan for monitoring of histamine in fish products. *J. Food Prot.* 74, 302–310.

Guirard, B.M., Snell, E.E., 1987. Purification and properties of pyridoxal-5'-phosphate-dependent histidine decarboxylases from *Klebsiella planticola* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 169, 3963–3968.

## H

Hald, T., 2011. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. European Food Safety Authority.

Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Morita, H., 2003. Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3668–3671.

Hansen, A., Adland, A., Mørkøre, T., Rudi, K., Rødbotten, M., Bjerke, F., Eie, T., 2009. Quality changes of prerigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) packaged in modified atmosphere using CO<sub>2</sub> emitter, traditional MAP, and vacuum. *J. Food Sci.* 74, M242–M249.

Hayashi, H., Tanase, S., Snell, E.E., 1986. Pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase. Inactivation by alpha-fluoromethylhistidine and comparative sequences at the inhibitor- and coenzyme-binding sites. *J. Biol. Chem.* 261, 11003–11009.

Hebraud, M., Dubois, E., Potier, P., Labadie, J., 1994. Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi*. *J. Bacteriol.* 176, 4017–4024.

Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M., Wagner, M., 2006. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *J. Microbiol. Methods* 66, 538–547.

Helwich, B., Korsgaard, H., Grønlund, A.C.J., Sørensen, A.M.H., Jensen, A.N., Boel, J., Borck Høg, B., 2012. Technical University of Denmark: Microbiological contaminants in food in the European Union in 2004-2009. European Food Safety Authority.

Henderson, J.T., Chopko, A.L., Van Wassenaar, P.D., 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 5–12.

Hernandez-Herrero, M.M., Roig-Sagues, A.X., Rodriguez-Jerez, J.J., Mora-Ventura, M.T., 1999. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J. Food Prot.* 62, 509–514.

Holo, H., Nilssen, Ø., Nes, I.F., 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173, 3879–3887.

Hovda, M.B., Fontanillas, R., McGurk, C., Obach, A., Rosnes, J.T., 2012. Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Res.* 43, 154–159.

Hovda, M.B., Lunestad, B.T., Sivertsvik, M., Rosnes, J.T., 2007. Characterisation of the bacterial flora of modified atmosphere packaged farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by PCR-DGGE of conserved 16S rRNA gene regions. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 68–75.

Hu, Y., Xia, W., Ge, C., 2007. Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1021–1031.

Hu, P., Xu, X.L., Zhou, G.H., Han, Y.Q., Xu, B.C., Liu, J.C., 2008. Study of the *Lactobacillus sakei* protective effect towards spoilage bacteria in vacuum packed cooked ham analyzed by PCR-DGGE. *Meat Sci.* 80, 462–469.

Humblot, C., Guyot, J.-P., 2009. Pyrosequencing of tagged 16S rRNA gene amplicons for rapid deciphering of the microbiomes of fermented foods such as pearl millet slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4354–4361.

Hungerford, J., Wu, W.-H., 2012. Comparison study of three rapid test kits for histamine in fish: BioScientific MaxSignal enzymatic assay, Neogen Veratox ELISA, and the Neogen Reveal Histamine Screening test. *Food Control* 25, 448–457.

Hungerford, J.M., 2010. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon* 56, 231–243.

Hwang, C.-C., Kung, H.-F., Lin, C.-S., Hwang, D.-F., Tsai, Y.-H., 2011. Bacteriological quality and histamine-forming bacteria associated with fish meats and environments in HACCP and non-HACCP fish processing factories. *Food Control* 22, 1657–1662.

## I

Ibrahim, S.M., Desouky, S.G., 2009. Effect of antimicrobial metabolites produced by lactic acid bacteria (Lab) on quality aspects of frozen tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *J Sci* 1, 40–45.

Ifremer, 2008. Le thon rouge, une espèce surexploitée . Disponible sur : <http://www.ifremer.fr/institut/Les-ressources-documentaires/Medias/Communique-de-presse/Archives/2008/Thon-rouge> (Consulté le 10/2013)

InVS, 2012. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2011. Disponible sur : <http://www.invs.sante.fr/> (Consulté le 01/2014)

IUCN, 2013. Red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org/>

Izquierdo, P., Allara, M., Torres, G., Fernandez, A., Paulinkevicius, M., Fuenmayor, J., 2001. Histamine producing bacteria on three fish species. *Rev. Cient.-Fac. Cienc. Vet.* 11, 431–435.

## J

Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M. F., Prévost, H., Joffraud, J. J., & Dousset, X., 2009. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 131(1), 20-29.

Jay, J.M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 525–532.

Jiang, Y., Gao, F., Xu, X.L., Su, Y., Ye, K.P., Zhou, G.H., 2010. Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR–DGGE. *Meat Science* 86, 889–895.

Joffraud, J.-J., Cardinal, M., Cornet, J., Chasles, J.-S., Léon, S., Gigout, F., Leroi, F., 2006. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 51–61.

Jones, R.J., Zagorec, M., Brightwell, G., Tagg, J.R., 2009. Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. *Food Microbiol.* 26, 876–881.



Joosten, H., Northolt, M.D., 1989. Detection, growth, and amine-producing capacity of *Lactobacilli* in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2356–2359.

Jørgensen, L.V., Dalgaard, P., Huss, H.H., 2000a. Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2448–2453.

Jørgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P., 2000b. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 89, 920–934.

Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2011. Metagenomic analysis of Kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2264–2274.

## K

Kamath, A.V., Vaaler, G.L., Snell, E.E., 1991. Pyridoxal phosphate-dependent histidine decarboxylases. Cloning, sequencing, and expression of genes from *Klebsiella planticola* and *Enterobacter aerogenes* and properties of the overexpressed enzymes. *J. Biol. Chem.* 266, 9432–9437.

Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., Tsukamoto, T., 2004. *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 79–87.

Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., Baba, E., 2007. Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1467–1473.

Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., Shibata, T., 2002. *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3462–3466.

Kapeller-Adler, R., 1944. Investigations on the activity of the histaminase in normal and toxæmic pregnancy. *Biochem. J.* 38, 270–274.

Katikou, P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P., Georgakis, S.A., 2007. Effect of *Lactobacillus* cultures on microbiological, chemical and odour changes during storage of rainbow trout fillets. *J. Sci. Food Agric.* 87, 477–484.

Katla, T., Møretrø, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L., Naterstad, K., 2001. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol.* 18, 431–439.

Katla, T., Møretrø, T., Sveen, I., Aasen, I. m., Axelsson, L., Rørvik, L. m., Naterstad, K., 2002. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *J. Appl. Microbiol.* 93, 191–196.

Kawabata, T., Ishizaka, K., Miura, T., 1955. Studies on the allergy-like food poisoning associated with putrefaction of marine products. I. Episodes of allergy-like food poisoning caused by *Samma sakuraboshi* (dried seasoned saury) and other kinds of marine products. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 8, 487–501.

Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H., Itoh, T., 1998. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasserii* LA39 linked at N-and C-terminal ends. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 2438–2440.

Kessel, M.A. van, Dutilh, B.E., Neveling, K., Kwint, M.P., Veltman, J.A., Flik, G., Jetten, M.S., Klaren, P.H., Camp, H.J.O. den, 2011. Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). AMB Expr 1, 1–9.

Khatri, I., Dureja, C., Raychaudhuri, S., Subramanian, S., 2013. Draft Genome sequence of the opportunistic human pathogen *Morganella morganii* SC01. Genome Announc. 1.

Kim, C.R., Hearnberger, J.O., 1994. Gram negative bacteria inhibition by lactic acid culture and food preservatives on catfish fillets during refrigerated storage. J. Food Sci. 59, 513–516.

Kim, C.R., Hearnberger, J.O., Vickery, A.P., White, C.H., Marshall, D.L., 1995. Sodium acetate and *Bifidobacteria* increase shelf-life of refrigerated catfish fillets. J. Food Sci. 60, 25–27.

Kim, R., 1979. Flushing syndrome due to mahi-mahi (Scombroid Fish) Poisoning. Arch. Dermatol. 115, 963–965.

Kim, S.-H., Field, K.G., Chang, D.-S., Wei, C.-I., An, H., 2001a. Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in Pacific mackerel during storage. J. Food Prot. 64, 1556–1564.

Kim, S.-H., Field, K.G., Morrissey, M.T., Price, R.J., Wei, C.-I., An, H., 2001b. Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. J. Food Prot. 64, 1035–1044.

Kim, S.H., Price, R.J., Morrissey, M.T., Field, K.G., Wei, C.I., An, H., 2002a. Occurrence of histamine-forming bacteria in albacore and histamine accumulation in muscle at ambient temperature. J. Food Sci. 67, 1515–1521.

Kim, S.H., Price, R.J., Morrissey, M.T., Field, K.G., Wei, C.I., An, H., 2002b. Histamine production by *Morganella morganii* in mackerel, albacore, mahi-mahi, and salmon at various storage temperatures. J. Food Sci. 67, 1522–1528.

Kim, M.-S., Roh, S.W., Nam, Y.-D., Yoon, J.-H., Bae, J.-W., 2009. *Carnobacterium jeotgali* sp. nov., isolated from a Korean traditional fermented food. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 3168–3171.

Kimura, B., Hokimoto, S., Takahashi, H., Fujii, T., 2000. *Photobacterium histaminum* is a later subjective synonym of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 1339–1342.

Kimura, B., Takahashi, H., Hokimoto, S., Tanaka, Y., Fujii, T., 2009. Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* (formally *P. histaminum*) at low pH. *J. Appl. Microbiol.* 107, 485–497.

Kisla, D., Ünlütürk, A., 2004. Microbial shelf-life of rainbow trout fillets treated with lactic culture and lactic acid. *Adv. Food Sci.* 26, 17–20.

Klausen, N.K., Huss, H.H., 1987a. Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 147–156.

Klausen, N.K., Huss, H.H., 1987b. A rapid method for detection of histamine-producing bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 137–146.

Köse, S., Kaklıkkaya, N., Koral, S., Tufan, B., Buruk, K.C., Aydın, F., 2011. Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products-evaluation against an EU accepted HPLC method. *Food Chem.* 125, 1490–1497.

Kuda, T., Mihara, T., Yano, T., 2007. Detection of histamine and histamine-related bacteria in fish-nukazuke, a salted and fermented fish with rice-bran, by simple colorimetric microplate assay. *Food Control* 18, 677–681.

Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K., Hugenholtz, P., 2008. A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 557–578.

Kurt, Sükrü, Zorba, Ö., 2009. The effects of ripening period, nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation of "sucuk"—A Turkish dry fermented sausage. *Meat Sci.* 82, 179–184.

## L

Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E.A., Stærfeldt, H.-H., Rognes, T., Ussery, D.W., 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 35, 3100–3108.

Lakshmanan, R., Shakila, R.J., Jeyasekaran, G., 2002. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiol.* 19, 617–625.

Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M.E., Gardini, F., 2003. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.* 20, 537–543.

Landete, J. m., Ferrer, S., Pardo, I., 2005. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *J. Appl. Microbiol.* 99, 580–586.

Landete, J.M., De Las Rivas, B., Marcobal, A., Muñoz, R., 2008. Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 697–714.

Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and environmental microbiology* 75, 5111–5120.

Laursen, B.G., Leisner, J.J., Dalgaard, P., 2006. Carnobacterium species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3604–3611.

Le Fur, B., Wacogne, W., Lorre, S., Pilet, M.F., Leroi, F., 2013. Application dans la filière des produits de la mer. In : *Flores protectrices pour la conservation des aliments - Application dans la filière des produits de la mer*. Coordinateur : Zagorec M., Christeans, S. Quae. ed. Versailles, France, p91-109.

Lee, I.K., Liu, J.W., 2006. Clinical characteristics and risk factors for mortality in *Morganella morganii* bacteremia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 39, 328.

Lehane, L., Olley, J., 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 1–37.

Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 181–186.

Leite, A.M.O., Mayo, B., Rachid, C.T.C.C., Peixoto, R.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F., Delgado, S., 2012. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol.* 31, 215–221.

Lerasle, M., Duranton, F., Simonin, H., Membre, J.M., Chéret, R., de Lamballerie, M., Guillou, S., Federighi, M., 2012. Traitements par hautes pressions hydrostatiques des denrées alimentaires: état de l'art. *Rev. Méd Vét* 163, 595–614.

Lerke, P.A., Porcuna, M.N., Chin, H.B., 1983. Screening test for histamine in fish. *J. Food Sci.* 48, 155–157.

Leroi, F., 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiol.* 27, 698–709.

Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J.-J., Chevalier, F., 1996. Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon. *Int. J. Food Sci. Technol.* 31, 497–504.

Leroy, F., Vuyst, L. de, 1999. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5350–5356.

Leuschner, R.G., Heidel, M., Hammes, W.P., 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 1–10.

Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 87, 149–163.

Lonvaud-Funel, A., 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 9–13.

Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Microbiol.* 77, 401–407.

Lopez-Caballero, M., Alvarez Torres, M., Sanchez-Fernandez, J., Moral, A., 2002. *Photobacterium phosphoreum* isolated as a luminescent colony from spoiled fish, cultured in model system under controlled atmospheres. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 390–395.

Lopez-Galvez, D., de la Hoz, L., Ordonez, J.A., 1995. Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on microbiological and chemical changes in refrigerated tuna (*Thunnus alalunga*) Steaks. *J. Agric. Food Chem.* 43, 483–490.

López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J., Hernández-Herrero, M., Mora-Ventura, M.T., 1996. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 411–418.

López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J.J., Roig-Sagués, A.X., Mora-Ventura, M.A.T., 1994. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: Effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *J. Food Prot.* 57, 318–323.

Lorca, T.A., Gingerich, T.M., Pierson, M.D., Flick, G.J., Hackney, C.R., Sumner, S.S., 2001. Growth and histamine formation of *Morganella morganii* in determining the safety and quality of inoculated and uninoculated bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *J. Food Prot.* 64, 2015–2019.

Love, M., Teebken-Fisher, D., Hose, J.E., Farmer, J.J., 3rd, Hickman, F.W., Fanning, G.R., 1981. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* 214, 1139–1140.

Lucas, P.M., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2008. High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 811–817.

Lucas, P.M., Wolken, W.A.M., Claisse, O., Lolkema, J.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1417–1424.

Lucquin, I., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M., Chaillou, S., 2012. Fingerprint of lactic acid bacteria population in beef carpaccio is influenced by storage process and seasonal changes. *Food Microbiol.* 29, 187–196.

Lyhs, U., Björkroth, J.K., 2008. *Lactobacillus sakei/curvatus* is the prevailing lactic acid bacterium group in spoiled maatjes herring. *Food Microbiol.* 25, 529–533.

## M

Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M.-F., Dousset, X., Joffraud, J.-J., 2012. Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR–TTGE. *Food Microbiol.* 30, 164–172.

Macé, S., Mamlouk, K., Chipchakova, S., Prévost, H., Joffraud, J.-J., Dalgaard, P., Pilet, M.-F., Dousset, X., 2013. Development of a rapid real-time PCR method as a tool to quantify viable *Photobacterium phosphoreum* in salmon (*Salmo salar*) steaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 8, 2612–2619.

Magarinos, B., Romalde, J.L., Bandin, I., Fouz, B., Toranzo, A.E., 1992. Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3316–3322.

Mah, J.-H., Hwang, H.-J., 2009a. Effects of food additives on biogenic amine formation in Myeolchi-jeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*). *Food Chem.* 114, 168–173.

Mah, J.-H., Hwang, H.-J., 2009b. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control* 20, 796–801.

Majjala, R., Eerola, S., Hirn, J., 1996. Foodborne intoxications caused by biogenic amines in Finland during 1975–1994. *Suom. Eläinlääkärilehti* 75–80.

Majjala, R.L., 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 40–43.

Maintz, L., Novak, N., 2007. Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1185–1196.

Maltar-Strmecki, N., Ljubic-Beer, B., Laskaj, R., Aadrovic, J., Dzaja, P., 2013. Effect of the gamma radiation on histamine production, lipid peroxidation and antioxidant parameters during storage at two different temperatures in sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Control* 34, 132–137.

Mamlouk, K., Macé, S., Guilbaud, M., Jaffrès, E., Ferchichi, M., Prévost, H., Pilet, M.-F., Dousset, X., 2012. Quantification of viable *Brochothrix thermosphacta* in cooked shrimp and salmon by real-time PCR. *Food Microbiol.* 30, 173–179.

Manter, D.K., Delgado, J.A., Holm, D.G., Stong, R.A., 2010. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microbial ecology* 60, 157–166.

Marie, R., Dreiding, K., Wyss, P.A., 1992. Inzidenz und Klinik der Scombroid-fischvergiftung. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1933–1935.

Martuscelli, M., Gardini, F., Torriani, S., Mastrocola, D., Serio, A., Chaves-López, C., Schirone, M., Suzzi, G., 2005. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *Int. Dairy J.* 15, 571–578.

Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Chadli, F.K., Cornet, J., Prevost, H., Pilet, M.F., 2009a. Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* 72, 365–374.

Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost, H., Leroi, F., 2009b. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiol.* 26, 638–644.

Matejkova, K., Krizek, M., Vacha, F., Dadakova, E., 2013. Effect of high-pressure treatment on biogenic amines formation in vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chem.* 137, 31–36.

Mavromatis, P., Quantick, P.C., 2002. Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. *J. Food Prot.* 65, 546–551.

Mbarki, R., Sadok, S., Barkallah, I., 2008. Influence of gamma irradiation on microbiological, biochemical, and textural properties of bonito (*Sarda sarda*) during chilled storage. *Food Sci. Technol. Int.* 14, 367–373.

Mbarki, R., Ben Miloud, N., Selmi, S., Dhib, S., Sadok, S., 2009a. Effect of vacuum packaging and low-dose irradiation on the microbial, chemical and sensory characteristics of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Food Microbiol.* 26, 821–826.

Mbarki, R., Sadok, S., Barkallah, I., 2009b. Quality changes of the Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) during chilled storage: The effect of low-dose gamma irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* 78, 288–292.

McGuinness, S., McCabe, E., O'Regan, E., Dolan, A., Duffy, G., Burgess, C., Fanning, S., Barry, T., O'Grady, J., 2009. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat. *Meat sci.* 83, 555–562.

McLauchlin, J., Little, C.L., Grant, K.A., Mithani, V., 2006. Scombrototoxic fish poisoning. *J. Public Health* 28, 61–62.

Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M.B., Bøknæs, N., Koort, J., Björkroth, J., Dalgaard, P., 2008. Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* 124, 250–259.

Mercado-Blanco, J., Van der Drift, K.M., Olsson, P.E., Thomas-Oates, J.E., van Loon, L.C., Bakker, P.A., 2001. Analysis of the pmsCEAB gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the

siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. J. Bacteriol. 183, 1909–1920.

Morii, H., Kasama, K., 2004. Activity of two histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum* at different temperatures, pHs, and NaCl concentrations. J. Food Prot. 67, 1736–1742.

Morii, H., Kasama, K., Herrera-Espinoza, R., 2006. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase gene from *Photobacterium phosphoreum* and its functional expression in *Escherichia coli*. J. Food Prot. 69, 1768–1776.

Morris, J.G., Jr, Miller, H.G., Wilson, R., Tacket, C.O., Hollis, D.G., Hickman, F.W., Weaver, R.E., Blake, P.A., 1982. Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. Lancet 1, 1294–1297.

Morzell, M., Fransen, N.G., Arendt, E.K., 1997. Defined starter cultures used for fermentation of salmon fillets. J. Food Sci. 62, 1214–1218.

Motlagh, A.M., Holla, S., Johnson, M.C., Ray, B., Field, R.A., 1992. Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin ACh, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. J. Food Prot. 55.

Müller, G.J., Lamprecht, J., Barnes, J., De Villiers, R., Honeth, B., Hoffman, B., 1992. Scombroid poisoning. Case series of 10 incidents involving 22 patients. S. Afr. Med. J. 427–430.

Murakami, T., 2012. Filter-based pathogen enrichment technology for detection of multiple viable foodborne pathogens in 1 day. J. Food Prot. 75, 1603–1610.

## N

Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., Schöning, I., Schrupf, M., Daniel, R., 2011. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. PLoS one 6, e17000.

Nagelkerke, F., Postma, P.W., 1978. 2-Deoxygalactose, a specific substrate of the *Salmonella typhimurium* galactose permease: Its use for the isolation of GalP mutants. J. Bacteriol. 133, 607–613.

Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., Meerdink, G., 2010. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. J. Food Sci. 75, R139–R150.

Naila, A., Flint, S., Fletcher, G.C., Bremer, P.J., Meerdink, G., 2011. Biogenic amines and potential histamine – Forming bacteria in Rihaakuru (a cooked fish paste). Food Chem. 128, 479–484.

Naila, A., Flint, S., Fletcher, G.C., Bremer, P.J., Meerdink, G., Morton, R.H., 2012. Prediction of the amount and rate of histamine degradation by diamine oxidase (DAO). Food Chem. 135, 2650–2660.



- Najjari, A., Ouzari, H., Boudabous, A., Zagorec, M., 2008. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 342–351.
- Nam, H.-M., Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Murinda, S.E., Oliver, S.P., 2005. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 161–171.
- Nam, Y.-D., Lee, S.-Y., Lim, S.-I., 2012. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 36–42.
- Nei, D., Kawasaki, S., Inatsu, Y., Yamamoto, K., Satomi, M., 2012. Effectiveness of gamma irradiation in the inactivation of histamine-producing bacteria. *Food Control* 28, 143–146.
- Nieminen, T.T., Koskinen, K., Laine, P., Hultman, J., Säde, E., Paulin, L., Paloranta, A., Johansson, P., Björkroth, J., Auvinen, P., 2012. Comparison of microbial communities in marinated and unmarinated broiler meat by metagenomics. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 142–149.
- Ng, P.C., Kirkness, E.F., Barnes, M.R., Breen, G., 2010. Whole genome sequencing, in: Genetic variation, methods in molecular biology. Humana Press, pp. 215–226.
- Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H., 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975–2984.
- Nilsson, L., Gram, L., Huss, H.H., 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot.* 62, 336–342.
- Nilsson, L., Henrik Huss, H., Gram, L., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 217–227.
- Nilsson, L., Ng, Y.Y., Christiansen, J.N., Jørgensen, B.L., Grotinum, D., Gram, L., 2004. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J. Appl. Microbiol.* 96, 133–143.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Haavarstein, L.S., Sletten, K., Nes, I.F., 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174, 5686–5692.
- Niven, C.F., Jeffrey, M.B., Corlett, D.A., 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 321–322.
- Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., Pavlik, I., 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Vet. Med. (Praha)* 49, 343–358.

Nykänen, A., Weckman, K., Lapveteläinen, A., 2000. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 63–72.

## O

O'Grady, J., Sedano-Balbás, S., Maher, M., Smith, T., Barry, T., 2008. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiol.* 25, 75–84.

O'Grady, J., Ruttledge, M., Sedanobalbas, S., Smith, T., Barry, T., Maher, M., 2009. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. *Food Microbiol.* 26, 4–7.

O'Hara, C.M., Brenner, F.W., Miller, J.M., 2000. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 534–546.

Okuzumi, M., Hiraishi, A., Kobayashi, T., Fujii, T., 1994. *Photobacterium histaminum* sp. nov., a histamine-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 631–636.

Ouwehand, A.C., Vesterlund, S., 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Lact. Acid Bact. Microbiol. Funct. Asp.* 3.

Özogul, F., 2004. Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* using a rapid HPLC method. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 465–469.

Özogul, F., Polat, A., Özogul, Y., 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chem.* 85, 49–57.

Özogul, F., Taylor, K. d. a., Quantick, P., Özogul, Y., 2002a. Changes in biogenic amines in herring stored under modified atmosphere and vacuum pack. *J. Food Sci.* 67, 2497–2501.

Özogul, F., Taylor, K.D.A., Quantick, P., Özogul, Y., 2002b. Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 515–522.

## P

Paarup, T., Sanchez, J.A., Moral, A., Christensen, H., Bisgaard, M., Gram, L., 2002. Sensory, chemical and bacteriological changes during storage of iced squid (*Todaropsis eblanae*). *J. Appl. Microbiol.* 92, 941–950.

Paleari, M.A., Soncini, G., Beretta, G., 1990. Smoked tuna, sliced and vacuum packed, a relatively new product. *Z. Für Lebensm.-Unters. Forsch.* 190, 118–120.

- Paludan-Müller, C., Dalgaard, P., Huss, H.H., Gram, L., 1998. Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum-and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5° C. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 155–166.
- Pantazi, D., Papavergou, A., Pournis, N., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N., 2008. Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: Microbiological, biochemical and sensory attributes. *Food Microbiol.* 25, 136–143.
- Park, E.-J., Chun, J., Cha, C.-J., Park, W.-S., Jeon, C.O., Bae, J.-W., 2012. Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. *Food Microbiol.* 30, 197–204.
- Parrot, J.L., Nicot, G., 1965. The role of histamine in food poisoning by fish. *Aliment. Vie* 53.
- Patterson, M.F., 2005. Microbiology of pressure-treated foods. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1400–1409.
- Paul Ross, R., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3–16.
- Petäjä, E., Eerola, S., Petäjä, P., 2000. Biogenic amines in cold-smoked fish fermented with lactic acid bacteria. *Eur. Food Res. Technol.* 210, 280–285.
- Piette, F., Struvay, C., Feller, G., 2011. The protein folding challenge in psychrophiles: facts and current issues. *Environ. Microbiol.* 13, 1924–1933.
- Pivarnik, L.F., Faustman, C., Rossi, S., Suman, S.P., Palmer, C., Richard, N.L., Ellis, P.C., DiLiberti, M., 2011. Quality assessment of filtered smoked yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) steaks. *J. Food Sci.* 76, S369–S379.
- Platt, T., 1984. Toxicity of 2-deoxygalactose to *Saccharomyces cerevisiae* cells constitutively synthesizing galactose-metabolizing enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 4, 994–996.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohier, D., 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol.* 28, 848–861.
- Prester, L., 2011. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Addit. Contam. Part A* 28, 1547–1560.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., Mekalanos, J.J., 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1528–1533.
- Pukatzki, S., McAuley, S.B., Miyata, S.T., 2009. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol., Host–Microbe Interactions: Bacteria* 12, 11–17.

## R

Rahkila, R., Nieminen, T., Johansson, P., Säde, E., Björkroth, J., 2012. Characterization and evaluation of the spoilage potential of *Lactococcus piscium* isolates from modified atmosphere packaged meat. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 50–59.

Ramanathan, R., O'Mullane, A.P., Parikh, R.Y., Smooker, P.M., Bhargava, S.K., Bansal, V., 2011. Bacterial kinetics-controlled shape directed biosynthesis of Silver nanoplates using *Morganella psychrotolerans*. *Langmuir* 27, 714–719.

Ramesh, A., Ananthalakshmy, V.K., Venugopalan, V.K., 1989. Histamine production in Indian oil sardine and Indian mackerel by luminous bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 5, 105–107.

Règlement (CE) n°853/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale. JOCE 25/06/04.

Règlement (CE) n°1333/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires (2008). JOCE 31/12/08.

Règlement (CE) n° 1441/2007 de la commission du 5 décembre 2007 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. JOCE 05/12/07.

Règlement (CE) n° 1019/2013 de la commission du 23 octobre 2013 modifiant l'annexe I du règlement (CE) n° 2073/2005 en ce qui concerne l'histamine dans les produits de la pêche. JOCE 23/10/13.

Règlement (CE) n° 178/2002 de la commission du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. JOCE 01/02/2002.

Règlement (CE) n° 852/2004 parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires. JOCE 25/06/04

Rehbein, H., Oehlschlager, J., 2009. *Fishery products: quality, safety and authenticity*. John Wiley & Sons, New York, USA. 450p.

Reith, M.E., Singh, R.K., Curtis, B., Boyd, J.M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., Murphy, C., Sarty, D., Williams, J., Nash, J.H., Johnson, S.C., Brown, L.L., 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* 9, 427.

Reynisson, E., Lauzon, H.L., Magnússon, H., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., Marteinson, V., Hreggviðsson, G.Ó., 2009. Bacterial composition and succession during storage of North-Atlantic cod (*Gadus morhua*) at superchilled temperatures. *BMC Microbiol.* 9, 250.

Richards, R.M.E., Xing, D.K.L., King, T.P., 1995. Activity of p-aminobenzoic acid compared with other organic acids against selected bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 78, 209–215.

Ritz, M., Garenaux, A., Berge, M., Federighi, M., 2009. Determination of *rpoA* as the most suitable internal control to study stress response in *C. jejuni* by RT-qPCR and application to oxidative stress. *J. Microbiol. Methods* 76, 196–200.

Rodriguez-Jerez, J., Lopez-Sabater, E., Roig-Sagues, A., Mora-Ventura, M., 1994. Histamine, cadaverine and putrescine forming bacteria from ripened Spanish semi-preserved anchovies. *J. Food Sci.* 59, 998–1001.

Rodtong, S., Nawong, S., Yongsawatdigul, J., 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Food Microbiol.* 22, 475–482.

Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A., Farmerie, W.G., Triplett, E.W., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1, 283–290.

Roh, S.W., Kim, K.-H., Nam, Y.-D., Chang, H.-W., Park, E.-J., Bae, J.-W., 2009. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISME J* 4, 1–16.

Rosi, I., Nannelli, F., Giovani, G., 2009. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 525–530.

Rossmannith, P., Krassnig, M., Wagner, M., Hein, I., 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Res. Microbiol.* 157, 763–771.

Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S.E., Nissen, H., 2004. Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in modified-atmosphere-packed salmon and coalfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5010–5018.

Rudi, K., Moen, B., Drømtorp, S.M., Holck, A.L., 2005. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1018–1024.

Ruiz-Capillas, C., Jiménez Colmenero, F., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., 2007. Biogenic amine production in Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Sci.* 77, 365–371.

Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., Mougous, J.D., 2011. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* 475, 343–347.

Russell, F., Maretic, Z., 1986. Scombroid poisoning - Minireview with case-histories. *Toxicon* 24, 967–973.

Ryser, E.T., Marth, E.H., Taylor, S.L., 1984. Histamine production by psychrotrophic pseudomonads isolated from tuna fish. *J. Food Prot.* 47.

## S

Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C., Ogawa, M., 2002a. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. *J. Appl. Microbiol.* 92, 173–179.

Sakala, R.M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C., Ogawa, M., 2002b. Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 87–99.

Sakala, R.M., Kato, Y., Hayashidani, H., Murakami, M., Kaneuchi, C., Ogawa, M., 2002c. *Lactobacillus fuchuensis* sp. nov., isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1151–1154.

Sakamoto, N., Tanaka, S., Sonomoto, K., Nakayama, J., 2011. 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in nukadoko, a pickling bed of fermented rice bran. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 352–359.

Sangcharoen, N., Ruksakulthai, N., Malaphan, W., Wilaipun, P., 2009. Effect of some essential oils and indigenous plant extracts on the growth inhibition of histamine-forming bacteria., in: Proceedings of the 47th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart, 17-20 March, 2009. Subject: Fisheries. pp. 608–617.

Sapin-Jaloustre, H., Sapin-Jaloustre, J., 1957. A little known dietetic toxic-infection; histamine poisoning caused by tunny fish. *Concours Med.* 79.

Sato, T., Kimura, B., Fijii, T., 1995. Histamine contents and histamine-metabolizing bacterial flora of fish sauce during fermentation. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 36.

Satomi, M., Furushita, M., Oikawa, H., Yano, Y., 2011. Diversity of plasmids encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus* spp. isolated from Japanese fish sauce. *Int. J. Food Microbiol.* 148, 60–65.

Satomi, M., Furushita, M., Oikawa, H., Yoshikawa-Takahashi, M., Yano, Y., 2008. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 202–209.

Satomi, M., Mori-Koyanagi, M., Shozen, K., Furushita, M., Oikawa, H., Yano, Y., 2012. Analysis of plasmids encoding the histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus muriaticus* isolated from Japanese fermented seafoods. *Fish. Sci.* 78, 935–945.

Sawa, N., Zendo, T., Kiyofuji, J., Fujita, K., Himeno, K., Nakayama, J., Sonomoto, K., 2009. Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1552–1558.

Schirone, M., Tofalo, R., Mazzone, G., Corsetti, A., Suzzi, G., 2011. Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. *Food Microbiol.* 28, 128–136.

Sekiguchi, Y., Makita, H., Yamamura, A., Matsumoto, K., 2004. A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007. *J. Biosci. Bioeng.* 97, 104–110.

Shakila, R.J., Vijayalakshmi, K., Jeyasekaran, G., 2003. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chem.* 82, 347–352.

Shalaby, A.R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29, 675–690.

Shin, S.H., Kim, S., Kim, J.Y., Lee, S., Um, Y., Oh, M.-K., Kim, Y.-R., Lee, J., Yang, K.-S., 2012. Complete genome sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. *J. Bacteriol.* 194, 2373–2374.

Shirazinejad, A.R., Noryati, I., Rosma, A., Darah, I., 2010. Inhibitory effect of lactic acid and nisin on bacterial spoilage of chilled shrimp. *World Acad Sci Eng Technol* 65, 163–167.

Shivaji, S., Prakash, J.S.S., 2010. How do bacteria sense and respond to low temperature? *Arch. Microbiol.* 192, 85–95.

Shozen, K.-I., Satomi, M., Yano, Y., Yoshida, M., Fukui, Y., Takano, T., Funatsu, Y., 2012. Effect of sucrose and halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* on chemical characteristics and microbial proliferation during fish sauce fermentation: Effect of sucrose and LAB on quality of fish sauce. *J. Food Saf.* 32, 389–398.

Shrivastava, S., Mande, S.S., 2008. Identification and functional characterization of gene components of type VI secretion system in bacterial genomes. *Plos One* 3, e2955.

Sonomoto, K., Yokota, A., 2011. *Lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research.* Horizon Scientific Press.

Specht, D., 1998. Scombroid fish poisoning. *J. Emerg. Nurs. JEN Off. Publ. Emerg. Dep. Nurses Assoc.* 24.

Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345.

Stratton, J.E., Hutkins, R.W., Sumner, S.S., Taylor, S.L., 1992. Histamine and histamine-producing bacteria in retail swiss and low-salt cheeses. *J. Food Prot.* 55.

Stratton, J.E., Hutkins, R.W., Taylor, S.L., 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Prot.* 54.

Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345.

Sudalayandi, K., Manja, 2011. Efficacy of lactic acid bacteria in the reduction of trimethylamine-nitrogen and related spoilage derivatives of fresh Indian mackerel fish chunks. *Afr J Biotech* 10, 42–47.

Sun, J., Zhang, Q., Zhou, J., Wei, Q., 2014. Pyrosequencing technology reveals the impact of different manure doses on the bacterial community in apple rhizosphere soil. *Applied Soil Ecology* 78, 28–36.

## T

Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I., 2009. Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Food Microbiol.* 26, 783–793.

Takahashi, H., Kimura, B., Yoshikawa, M., Fujii, T., 2003. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2568–2579.

Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.

Tanase, S., Guirard, B.M., Snell, E.E., 1985. Purification and properties of a pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase from *Morganella morganii* AM-15. *J. Biol. Chem.* 260, 6738–6746.

Tao, Z., Sato, M., Abe, N., Yamaguchi, T., Nakano, T., 2009. Simple and rapid detection of histamine-forming bacteria by differential agar medium. *Food Control* 20, 903–906.

Tapingkae, W., Tanasupawat, S., Parkin, K.L., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2010. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 92–99.

Taskin, B., Gozen, A.G., Duran, M., 2011. Selective quantification of viable *Escherichia coli* bacteria in biosolids by quantitative PCR with propidium monoazide modification. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4329–4335.

Taylor, S., Stratton, J., Nordlee, J., 1989. Histamine poisoning (Scombroid Fish Poisoning) - an allergy-like intoxication. *J. Toxicol.-Clin. Toxicol.* 27, 225–240.

Taylor, S.L., 1986. Histamine food poisoning: toxicological and clinical aspects. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 17, 2, 91-128.

Taylor, S.L., Speckhard, M.W., 1983. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Mar. Fish. Rev.* 45, 6.



Taylor, S.L., Speckhard, M.W., 1984. Inhibition of bacterial histamine production by sorbate and other antimicrobial agents [Prolonged storage, *Proteus morganii* and *Klebsiella pneumoniae*, tuna, mackerel, mahi-mahi, and certain other fish]. J. Food Prot. 47.

Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H., 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. Int. J. Food Microbiol. 11, 73–84.

Teixeira de Carvalho, A.A., Aparecida de Paula, R., Mantovani, H.C., Alencar de Moraes, C., 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. Food Microbiol. 23, 213–219.

Thapa, N., Pal, J., Tamang, J., 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. Int. J. Food Microbiol. 107, 33–38.

Tolmasky, M.E., Actis, L.A., Crosa, J.H., 1995. A histidine decarboxylase gene encoded by the *Vibrio anguillarum* plasmid pJM1 is essential for virulence: histamine is a precursor in the biosynthesis of anguibactin. Mol. Microbiol. 15, 87–95.

Tomé, E., Gibbs, P.A., Teixeira, P.C., 2008. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 121, 285–294.

Torres, G., Izquierdo, P., Allara, M., Garcia, A., 2003. The effect of temperature and storage time on the growth of histamine producing bacteria in two species of fish: Lisa (*Mugil curema*) and robalo (*Centropomus undecimalis*). Rev. Cient.-Fac. Cienc. Vet. 13, 263–268.

Truelstrup Hansen, L., Huss, H.H., 1998. Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. Food Res. Int. 31, 703–711.

Tsai, Y.-H., Kung, H.-F., Lee, T.-M., Lin, G.-T., Hwang, D.-F., 2004. Histamine-related hygienic qualities and bacteria found in popular commercial Scombrotoxic fish fillets in Taiwan. J. Food Prot. 67, 407–412.

Tsai, Y.-H., Kung, H.-F., Lin, Q.-L., Hwang, J.-H., Cheng, S.-H., Wei, C.-I., Hwang, D.-F., 2005. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in kimchi products in Taiwan. Food Chem. 90, 635–641.

Tsai, Y.-H., Lin, C.-Y., Chien, L.-T., Lee, T.-M., Wei, C.-I., Hwang, D.-F., 2006. Histamine contents of fermented fish products in Taiwan and isolation of histamine-forming bacteria. Food Chem. 98, 64–70.

## U

Udomsil, N., Rodtong, S., Choi, Y.J., Hua, Y., Yongsawatdigul, J., 2011. Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. J. Agric. Food Chem. 59, 8401–8408.

Urbanczyk, H., Ast, J.C., Dunlap, P.V., 2011. Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. FEMS Microbiol. Rev. 35, 324–342.

Uroz, S., Buée, M., Murat, C., Frey-Klett, P., Martin, F., 2010. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. Environ. Microbiol. Rep. 2, 281–288.

Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G., Cocolin, L., 2006. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. Int. J. Food Microbiol. 110, 232–239.

## V

Vaaler, G.L., Brasch, M.A., Snell, E.E., 1986. Pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase. Nucleotide sequence of the *hdc* gene and the corresponding amino acid sequence. J. Biol. Chem. 261, 11010–11014.

Vaaler, G.L., Snell, E.E., 1989. Pyridoxal 5'-phosphate dependent histidine decarboxylase: overproduction, purification, biosynthesis of soluble site-directed mutant proteins and replacement of conserved residues. Biochemistry (Mosc.) 28, 7306–7313.

Van Spreekens, K.J., 1977. Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 43, 283–303.

Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., Merckx, R., Van Eldere, J., 2001. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during *in vitro* growth and under different conditions. J. Bacteriol. 183, 7094–7101.

Vanderslice, P., Copeland, W.C., Robertus, J.D., 1986. Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a. J. Biol. Chem. 261, 15186–15191.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 3, research0034.

Valdenegro-Vega, V., Naeem, S., Carson, J., Bowman, J.P., Tejedor del Real, J.L., Nowak, B., 2013. Culturable microbiota of ranched southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii* Castelnau). J. Appl. Microbiol. n/a–n/a.

Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C., 2004. Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. Eur. Food Res. Technol. 218, 284–288.

Veciana-Nogués, M.T., Mariné-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. J. Agric. Food Chem. 45, 2036–2041.

Veillon, L., Muniruzzaman, S., Henderson, G., Laine, R., 2010. Toxic effects of 2-deoxy-D-galactose on *Coptotermes formosanus* (Isoptera: *Rhinotermitidae*) and symbionts. *J. Econ. Entomology* 103, 1647–1656.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 149–164.

Vescovo, M., Scolari, G., Zacconi, C., 2006. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* 23, 689–693.

Visciano, P., Perugini, M., Manera, M., Amorena, M., 2009. Selected polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked tuna, swordfish and Atlantic salmon fillets. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 2028–2032.

## W

Wang, R., Feng, J., Su, Y., Ye, L., Wang, J., 2013. Studies on the isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity. *Vet. Microbiol.* 162, 957–963.

Wang, X., Jothikumar, N., Griffiths, M.W., 2004. Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J. Food Prot.* 67, 189–192.

Wauters, G., Avesani, V., Charlier, J., Janssens, M., Delmee, M., 2004. Histidine decarboxylase in *Enterobacteriaceae* revisited. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5923–5924.

Wei, C. i., Chen, C.-M., Koburger, J.A., Otwell, W.S., Marshall, M.R., 1990. Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. *J. Food Sci.* 55, 59–63.

Weiss, A., Hammes, W.P., 2006. Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold-smoked salmon. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 343–346.

Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Prot.* 58, 280–283.

Will, C., Thürmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schrumpf, M., Gutknecht, J., Wubet, T., Buscot, F., Daniel, R., 2010. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6751–6759.

Williams, A.M., Fryer, J.L., Collins, M.D., 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.* 68, 109–113.

Winslow, C.-E., Kliger, I.J., Rothberg, W., 1919. Studies on the classification of the colon-typhoid group of bacteria with special reference to their fermentative reactions. *J. Bacteriol.* 429–503.

Wong, H.-C., Chen, Y.-L., 1988. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2179–2184.

Woolford, M.K., 1975. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *J. Sci. Food Agric.* 26, 229–237.

Wouters, J.A., Frenkiel, H., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., Abee, T., 2001. Cold Shock Proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 Are Involved in Cryoprotection and in the Production of Cold-Induced Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5171–5178.

Wu, S., Wang, G., Angert, E.R., Wang, W., Li, W., Zou, H., 2012. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in Grass Carp intestine. *PLoS ONE* 7, e30440.

## X

Xu, Y., Xia, W., Yang, F., Kim, J.M., Nie, X., 2010. Effect of fermentation temperature on the microbial and physicochemical properties of silver carp sausages inoculated with *Pediococcus pentosaceus*. *Food Chem.* 118, 512–518.

## Y

Yamanaka, H., Itagaki, K., Shiomi, K., Kikuchi, T., Okuzumi, M., 1985. Influences of the concentration of sodium chloride on the formation of histamine in the meat of mackerel (*Scomber japonicus*). *J. Tokyo Univ. Fish.* 72.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., Montville, T.J., 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *J. Food Prot.* 66, 1420–1425.

Yongsawatdigul, J., Choi, Y.J., Udornporn, S., 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *J. Food Sci.* 69, FCT312–FCT319.

Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., Raksakulthai, N., 2007. Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. *J. Food Sci.* 72, M382–390.

## Z

Zaman, M.Z., Abu Bakar, F., Jinap, S., Bakar, J., 2011. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 84–91.

Zaman, M.Z., Bakar, F.A., Selamat, J., Bakar, J., Ang, S.S., Chong, C.Y., 2014. Degradation of histamine by the halotolerant *Staphylococcus carnosus* FS19 isolate obtained from fish sauce. Food Control 40, 58–63.

Zarkasi, K.Z., Abell, G.C.J., Taylor, R.S., Neuman, C., Hatje, E., Tamplin, M.L., Katouli, M., Bowman, J.P., 2014. Pyrosequencing-based characterization of gastrointestinal bacteria of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) within a commercial mariculture system. J Appl Microbiol n/a–n/a

Zeng, X., Xia, W., Yang, F., Jiang, Q., 2013. Changes of biogenic amines in Chinese low-salt fermented fish pieces (*Suan yu*) inoculated with mixed starter cultures. Int. J. Food Sci. Technol. 48, 685–692.

Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L., 2009. Erythromycin- and tetracycline-resistant *Lactobacilli* in Italian fermented dry sausages. J. Appl. Microbiol. 107, 1559–1568.

Zotos, A., Petridis, D., Siskos, I., Gougoulis, C., 2001. Production and quality assessment of a smoked tuna (*Euthynnus affinis*) product. J. Food Sci. 66, 1184–1190.





## Quantification des bactéries histaminogènes et maîtrise de la formation d'histamine dans les produits marins par biopréservation

Des bactéries histaminogènes ont été isolées de produits de la mer naturellement contaminés ou responsables d'intoxications histaminiques. En parallèle, des bactéries lactiques ont été isolées de ces mêmes produits et regroupées en fonction de leur pouvoir inhibiteur face à 4 bactéries histaminogènes, afin de développer une nouvelle méthode de biopréservation. Elles ont majoritairement été identifiées comme *Lactobacillus fuchuensis* et *Lactobacillus sakei*. Douze bactéries lactiques ont été sélectionnées pour des challenge-tests sur du thon appertisé, cuit ou fumé. Des challenge-tests réalisés sur du thon face à *Morganella psychrotolerans* et *Morganella morganii*, combinés à une analyse sensorielle des produits, ont démontré l'effet bio-protecteur de *L. sakei* CNCM I-4704. En effet, le nombre total de ces bactéries a été réduit de 3 à 5 log UFC/g tandis que le taux d'histamine a été maintenu en dessous de 50 mg/kg après 4 jours de stockage à 15°C et 11 jours à 4°C (pour *M. psychrotolerans*). D'après les analyses sensorielles, l'ajout de cette souche permet aussi de prolonger la durée de vie du thon cuit jusqu'à 8 jours de stockage à 15°C. Une méthode de PCR en temps réel spécifique de *M. psychrotolerans* et *M. morganii* avec une étape d'enrichissement sélectif a été mise au point. Après enrichissement, cette méthode permet de quantifier *M. psychrotolerans* et *M. morganii* de 50 UFC/g à 10<sup>4</sup> UFC/g, tandis que la méthode directe quantifie ces bactéries de 10<sup>4</sup> UFC/g à 10<sup>9</sup> UFC/g. Finalement, le développement d'une méthode de RT-qPCR a été initié pour démontrer la sur-expression des gènes responsables de la réduction de l'histidine en histamine en réponse à un stress acide.

**Mots-clés :** biopréservation, thon, bactérie lactique, intoxication histaminique, *Morganella morganii*, *Morganella psychrotolerans*, *Lactobacillus sakei*, analyse sensorielle, PCR en temps réel, étape d'enrichissement, RT-qPCR

---

## Quantification of histamine-producing bacteria and control of histamine formation in seafood by biopreservation

Histamine-producing bacteria were isolated from naturally contaminated seafood, some of responsible for histamine-poisoning. At the same time, lactic acid bacteria were isolated on the same products and clustered according to their inhibitory activity against 4 histamine-producing species. Most of the strains were identified as *Lactobacillus fuchuensis* or *Lactobacillus sakei*. Twelve lactic acid bacteria were selected for challenge-test on canned, cooked or smoked tuna. Challenge-test combined with sensory analysis performed on cooked vacuum-packed tuna against *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii*, demonstrated an important inhibitory effect on growth and production of histamine with *L. sakei* CNCM I-4707. Bacterial count was reduced by 3 to 5 log CFU/g and histamine production was reduced under 50 mg/kg by *L. sakei* after 4 days of storage at 15°C and 11 days at 4°C (for *M. psychrotolerans*). Based on sensory evaluation, biopreservation performed with *L. sakei* also extended the shelf-life of cooked tuna up to 8 days at 15°C. A real-time PCR method specific of *M. psychrotolerans* and *M. morganii* with a selective enrichment step was developed. After enrichment, this method allowed to quantify *M. psychrotolerans* and *M. morganii* between 50 CFU/g to 10<sup>4</sup> CFU/g, while direct amplification quantified these bacteria between 10<sup>4</sup> CFU/g to 10<sup>9</sup> CFU/g. Finally, the development of a new RT-qPCR method was initiated to demonstrate an over-expression of the genes involved in the reduction of histidine into histamine under acidic stress.

**Keywords:** biopreservation, tuna, lactic acid bacteria, scombroid poisoning, *Morganella morganii*, *Morganella psychrotolerans*, *Lactobacillus sakei*, sensory analysis, real-time PCR, enrichment step, RT-qPCR