L'HISTAMINE DES VINS

Suzanne LAFON-LAFOURCADE
Institut d'Œnologie - Université de Bordeaux II
Institut National de la Recherche Agronomique
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

Travail effectué avec la collaboration technique d'Annick JOYEUX

INTRODUCTION

L'histamine ou imidazoléthylamine a été découverte par ACKERMANN en 1910 dans les produits de dégradation bactérienne de l'histidine. Cette base azotée se rencontre dans certains aliments : viande, poisson, charcuterie. Toxique sévère, son ingestion à la dose de 10 mg suffit pour provoquer des troubles pathologiques notables (MASQUELIER 1974). On comprend dès lors, l'intérêt que les biochimistes ont porté à sa recherche.

Aux méthodes de dosage biologiques (mesure de la contraction de l'iléon du cobaye), chimiques (utilisant les colorants diazoïques), isotopiques (BARSKY et **al.**, 1961), on a souvent préféré la méthode fluorimétrique pour sa sensibilité et sa spécificité (SHORE, 1959 ; OATES, 1962 ; OUGH, 1971 ; MICHAELSON, 1969). Plus récemment MACK (1973) a utilisé un analyseur automatique d'acides aminés. Ces techniques ont été appliquées en particulier à la détermination de l'histamine dans les tissus et humeurs animales.

En 1963, MARQUARDT et **al.** signalent la présence d'histamine dans les vins allemands. L'étude est reprise, par QUEVAUVILLIER en France (1969), PUPUTTI et SUOMALAINEN en Finlande (1968), OUGH (1971) en Californie notamment. On doit aux Suisses MAYER et PAUSE (1971-1972) l'enquête la plus complète : elle porte sur 181 vins blancs et 214 vins rouges.

Les chercheurs étrangers rapportent pour les vins, des teneurs moyennes en histamine généralement très faibles (d'après MAYER : 3,5 mg par litre dans les vins rouges, 1,1 mg par litre dans les vins blancs) et des teneurs maximales dépassant rarement 10 mg par litre. En France, on a cité souvent des chiffres plus élevés (QUEVAUVILLIER, 1969 ; PLUMAS, 1970), les différences provenant vraisemblablement des méthodes de dosages utilisées.

Tous les auteurs s'accordent pour reconnaître que les vins rouges, et particulièrement les vins ayant subi la fermentation malolactique, présentent des doses d'histamine supérieures à celles des vins blancs. En conséquence, la capacité bien connue de certaines bactéries **(E. coli** par exemple) de décarboxyler l'histidine en histamine a été étendue aux bactéries lactiques du vin, spécialement au type **coccus** (SCHNEYDER, 1972 ; MAYER, 1971), un peu hâtivement semble-t-il.

Le présent travail propose tout d'abord une documentation sur les teneurs en histamine rencontrées dans une centaine de vins, notamment du Bordelais. Nous avons ensuite recherché l'origine de cette substance et déterminé la capacité des souches bactériennes isolées des vins à former de l'histamine en précisant les conditions qui contrôlent cette formation.

METHODES EXPERIMENTALES

1°) Technique utilisée

La technique utilisée reprend celle décrite par PLUMAS (1970). Nous avons été amenée à lui apporter quelques modifications dans le mode opératoire et particulièrement dans la formule de calcul qui donne des résultats trop élevés. Inspirée de la méthode de SHORE (1959), elle se distingue de celle de MAYER et PAUSE (1973) par le mode de séparation et s'appuie sur un dosage fluorimétrique.

2°) Principe

L'histamine est fixée sur Amberlite CG 50 d'où elle est éluée par une solution de HCl 2N. Elle est ensuite condensée avec le dialdéhyde orthophtalique (OPT) pour former un fluorophore. Dans des limites précises (de 0 à 0,4 µg d'histamine par ml), la concentration en fluorophore est proportionnelle à la fluorescence émise.

3°) Mode opératoire

On opère avec un étalon interne.

Pour chaque dosage, on prévoit deux colonnes de 6 mm de diamètre remplies d'Amberlite CG 50 convenablement préparée (PLUMAS, 1970), sur une hauteur de 6 cm environ. Chacune d'elle reçoit :

	1re colonne	2e colonne
Tampon phosphaté pH 7,5	1 ml	1 ml
Echantillon à doser	2 ml	2 ml
Solution d'histamine à 1 mg par l	0	2 ml

(Le vin est préalablement neutralisé, le volume de l'échantillon est donné en ml de vin).

On règle le débit d'écoulement à environ 2 gouttes par minute. On lave avec un tampon phosphaté de pH 7,5, jusqu'à l'obtention d'un volume de 30 ml.

L'histamine fixée sur résine est éluée par une solution de HCl 2N jusqu'à l'obtention d'un volume final de 16 ml d'éluat, le débit demeurant le même que précédemment.

L'éluat est ensuite porté exactement à pH 12,45 par addition de soude au pHmètre au 1/100 ; on ajuste son volume à 20 ml.

A 6 ml d'éluat on ajoute 0,3 ml d'une solution d'OPT dans le méthanol. La condensation histamine-OPT est complète après 4 mn. On arrête la réaction de fluorescence en ramenant le milieu réactionnel exactement à pH 7,0, mesuré au pHmètre au 1/100, par addition de HCl.

Parallèlement un essai à blanc est réalisé sur le même volume d'éluat à pH 7,0 additionné de 0,3 ml de la solution d'OPT.

Les trois préparations sont ajustées au même volume 10 ml, et on mesure la fluorescence de chacune d'elles, à 450 nm, en étalonnant le 100 du fluorimètre à l'aide du milieu « échantillon + étalon interne ».

si « x_1 » est la valeur fluorimétrique de la préparation : « essai à blanc »,

si « x_2 » est la valeur fluorimétrique de la préparation : « échantillon »,

si « 100 » est la valeur fluorimétrique de la préparation : « échantillon + étalon interne »

$(100 - x_2)$ représente la valeur fluorimétrique de « l'étalon interne », pour $\frac{2}{16}$ µg d'histamine

La concentration en histamine, C, est donnée par la formule suivante, exprimée en mg par litre :

$$C = \frac{x_2 - x_1}{100 - x_2}$$

L'erreur-type pour des séries de dosages est de 0,03. Les additions dans le vin sont retrouvées à quelques centièmes de mg près. L'exemple suivant concerne un vin de Saint-Emilion :

Echantillon	Histamine (mg par litre)	Ecart à la moyenne ($x_i - x$)	$(x_i - x)^2$
1	0,83	— 0,03	0,0009
2	0,84	— 0,02	0,0004
3	0,85	— 0,01	0,0001
4	0,90	+ 0,04	0,0016
5	0,90	+ 0,04	0,0016
moyenne	0,86		0,0046

$$\delta = \sqrt{\frac{\Sigma\,(x_i - x)^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{0,0046}{4}} = 0,03$$

RESULTATS

1°) Présence d'histamine dans les vins

D'après nos résultats, l'histamine est présente dans 98 p. 100 des vins rouges et 75 p. 100 des vins blancs, mais à doses généralement très faibles (voir tableau I). Les vins rouges en contiennent presque toujours des teneurs plus élevées que les vins blancs ; ces derniers qu'ils soient secs ou liquoreux n'en présentent que des traces. Parmi les vins rouges, les concentrations les plus fortes ont été rencontrées dans des vins de la Côte d'Or (21 et 18 mg par litre).

L'âge des vins qui s'étend, en ce qui concerne les vins soumis à notre expérimentation, de 1962 à 1973, paraît importer peu. A titre d'exemple, pour un même cru de Pomerol, on relève : 1 mg d'histamine par litre dans un vin de 1962, 2,5 mg par litre dans un 1964, 0,5 mg par litre dans un 1966. Le vin de 1972 d'un cru de Saint-Emilion contient davantage d'histamine que celui de 1973 ; pour les mêmes années d'un autre cru, le résultat est inverse.

D'autre part, tous les vins rouges analysés appartiennent à de grands crus et on s'est attaché à s'assurer de leur fermentation malolactique. Parmi ceux dans lesquels l'acide malique a été fermenté, on relève des teneurs extrêmement variables en histamine : 8,9 mg par litre dans un Médoc, 0,1 mg par litre dans un Pomerol, 1,7 mg par litre dans un Saint-Emilion ; 0,4 mg par litre dans un Hermitage, 21 mg par litre dans un Mâcon.

Nos résultats confirment un certain nombre de données déjà connues. Mais elles infirment cependant le rapport étroit que certains auteurs ont cru pouvoir établir dans le vin, entre la fermentation malolactique et la concentration en histamine. En outre, nous avons dosé cette substance dans un certain nombre de vins altérés par un développement bactérien, riches en acétate d'éthyle, présentant des acidités volatiles élevées ou ayant subi des arrêts de fermentation ; les teneurs en histamine n'ont pourtant jamais dépassé 2,4 mg par litre.

Le traitement des vins par les « enzymes » pectolytiques, protéolytiques, par les lipases, dextranases, ne modifie pas de manière significative la teneur en histamine.

L'histamine des vins peut provenir de trois sources différentes : elle peut se trouver naturellement dans le jus de raisin ou découler du métabolisme levurien ou bactérien.

2°) **Teneur en histamine des jus de raisins**

Les dosages ont porté sur dix jus de raisins blancs, et douze jus de raisins rouges, (Tableau I).

Les moûts contiennent souvent de l'histamine, mais à dose extrêmement faible. Les teneurs moyennes sont de l'ordre de 0,3 mg par litre. Parmi les moûts blancs, les jus de raisins botrytisés ne présentent pas

de concentrations en histamine systématiquement plus élevées ; c'est toutefois dans un jus du Sauternais qu'est relevée la teneur maximale : 0,8 mg par litre.

TABLEAU I

Histamine dans les jus de raisins et les vins
(Les teneurs sont exprimées en mg par litre)

Nombre d'échantillons	Origine	Teneurs moyennes	Minimales	Maximales
10	Jus de raisins blancs	0,3	0	0,8
12	Jus de raisins rouges	0,3	0,2	0,5
21	Vins St-Emilion et Pomerol	0,9	0	2,2
9	Médoc	3,7	1,4	8,9
23	Bourgogne	6,4	0,4	21,0
4	Algérie	0,7	0,6	1,3
8	Rouges divers	1,3	0,3	4,8
27	Bordeaux blancs secs et liquoreux	0,2	0	0,8
6	Blancs divers : mousseux, champagnes	1,4	0,1	6,3
4	Porto	0,11	0	0,4

3°) **Formation d'histamine au cours de la fermentation alcoolique**

L'histamine a été dosée dans un même jus de raisin, fermenté respectivement par différentes levures, dans les mêmes conditions expérimentales (25 °C, aérobiose).

Des souches de **S. oviformis, S. carlsbengensis, H. uvarum, S. elegans, P. membranaefaciens, P. fermentans,** ne forment pas d'histamine. Mais on trouve 0,2 mg par litre dans le milieu fermenté avec **S. ellipsoideus** ou **S. rosei** et des teneurs voisines de 1 mg par litre avec **S. veronae, C. mycoderma** ou **S. ludwigii ; Schizosaccharomyces** en produit 2,2 mg par litre.

Cette expérimentation s'est limitée à l'étude d'une seule souche de chacune de ces espèces ou genres et dans un seul milieu ; nous pensons cependant pouvoir avancer que, s'il se forme souvent de l'histamine au cours de la fermentation alcoolique, c'est toujours en quantité faible et que, en outre, les levures alcoogènes qui assurent généralement la vinification des jus de raisins ont une capacité très réduite à produire cette substance.

4°) Formation d'histamine au cours de la croissance bactérienne en milieu nutritif sucré

Le milieu de culture utilisé se compose d'un jus de raisin conservé par pasteurisation qui a été dilué deux fois et a été enrichi par 5 g par litre d'extrait de levure (pH 4,5). Le même milieu est supplémenté en histidine à raison de 100 mg par litre. L'histamine est dosée dans l'un et l'autre milieu après un temps de culture de 15 jours à 1 mois, à 30 °C. Le milieu nutritif contient déjà une faible quantité d'histamine de l'ordre de 0,2 mg par litre qui a été soustraite des valeurs exposées dans le tableau II. L'expérimentation a porté sur 59 souches bactériennes, choisies parmi les quatre groupes principaux : Lactobacilles et coques homo et hétérofermentaires.

La formation d'histamine par les bactéries lactiques considérées, au cours de leur développement dans un milieu assurant des conditions optimales de croissance, demeure inférieur à 2 mg par litre. La présence d'histidine à forte concentration augmente de manière à peine sensible la production d'histamine par les coques : les teneurs moyennes sont plus élevées de 0,14 à 0,12 mg par litre respectivement pour les coques homo ou hétérofermentaires, tandis qu'elle aurait un effet plutôt négatif sur les lactobacilles. La plus forte production d'histamine est notée pour une souche de **Leuconostoc gracile** dans le milieu de culture supplémenté en histidine : 1,6 mg par litre. L'histaminogénèse bactérienne en milieu nutritif sucré apparaît donc extrêmement limitée ; de plus, elle ne semble pas être influencée de manière significative par la concentration du milieu en histidine.

5°) Formation d'histamine au cours de la dégradation malolactique par les bactéries non proliférantes

La dégradation bactérienne de l'acide malique peut être disjointe du phénomène de croissance et provoquée, dans des conditions expérimentales précises, par une masse suffisante de cellules précultivées en

TABLEAU II

Formation d'histamine au cours du développement des bactéries lactiques en milieu nutritif glucosé

(Les teneurs sont exprimées en mg d'histamine par litre)

Nombre de bactéries	Nature de la bactérie	Teneurs moyennes		Teneurs minimales		Teneurs maximales	
		Milieu nutritif	Milieu nutritif supplémenté en histidine	Milieu nutritif	Milieu nutritif supplémenté en histidine	Milieu nutritif	Milieu nutritif supplémenté en histidine
9	Bacilles homofermentaires	0,48	0,31	0	0	1,1	1,2
21	Bacilles hétérofermentaires	0,40	0,38	0	0	1,0	1,2
5	Coques homofermentaires	0,10	0,24	0	0,1	0,2	0,7
24	Coques hétérofermentaires	0,28	0,40	0	0	1,2	1,6

milieu nutritif (LAFON-LAFOURCADE, 1970). Nous avons déterminé la formation d'histamine au cours de la dégradation malolactique par les cellules non proliférantes en milieu synthétique et dans le vin.

— **En milieu synthétique**

La composition de ce milieu a été précisée ailleurs (LAFON-LAFOURCADE, 1970). Il s'agit d'un tampon phosphaté à pH 3,5, contenant 5 g d'acide L-malique par litre et des sels de Mg et de Mn. Les bactéries sont testées parallèlement dans le même milieu additionné de 100 mg d'histidine par litre. L'expérimentation a été menée avec cinq souches bactériennes appartenant aux quatre groupes bactériens.

Dans le milieu synthétique un poids de 1 g de cellules fraîches par litre a transformé 5 g d'acide L-malique par litre en 24 h à 30 °C. Les dosages effectués après 3 à 8 jours montrent que les bactéries ont libéré à partir de leur propre substance des quantités d'histamine faibles, pour certaines identiques à celles formées au cours de leur développement en milieu nutritif sucré. En outre, pour les cinq bactéries considérées, on observe un taux d'histamine identique dans le milieu totalement dépourvu ou additionné d'histidine, de 0,1 à 0,2 mg par litre.

On peut en déduire que si une masse bactérienne libère toujours une petite quantité d'histamine, elle ne possède cependant pas la capacité de décarboxyler l'histidine, tout au moins en ce qui concerne les souches étudiées.

— **Dans le vin**

L'expérimentation a porté sur onze souches bactériennes. Celles-ci ont été testées dans deux vins rouges différents, amenés à pH 3,5 à la même concentration en alcool (10 p. 100) et en acide L-malique (4 g par litre) et additionnés ou non de 100 mg d'histidine par litre. Ces vins contiennent déjà de faibles teneurs en histamine, respectivement 0,8 et 1 mg par litre. Les dosages sont effectués après trois à cinq jours d'incubation à 30 °C, en présence de 1 g par litre de cellules bactériennes qui ont totalement dégradé l'acide L-malique.

Les teneurs en histamine varient en fonction de la souche et de la nature du vin, de 6,9 à 2,5 mg par litre dans le premier vin, de 7,3 à 1,2 mg par litre dans le second avec, en ce qui concerne les lactobacilles, une formation systématiquement plus faible dans ce dernier vin, (Ta-

bleau III). Pour toutes les souches, la libération d'histamine est fortement diminuée en présence d'un excès d'histidine : les teneurs observées deviennent inférieures à la concentration initiale, ce qui laisserait supposer une dégradation de l'histamine préexistante.

TABLEAU III

Formation d'histamine dans le vin par une bio-masse bactérienne précultivée

(Les teneurs sont exprimées en mg par litre)

	1° vin : Teneur en histamine 0,8 mg par l		**2° vin** : Teneur en histamine 1 mg par l	
	Vin témoin	Vin + 100 mg d'histidine par litre	Vin témoin	Vin + 100 mg d'histidine par litre
Bacilles homofermentaires				
U 565	4,6	1,3	2,2	0,5
JF 1	—		1,3	0,4
Bacilles hétérofermentaires				
Ba 41	3,8	traces	1,2	0,3
BC 2	—	—	2,8	0,1
F 69	6,3	0,9	—	—
CV 123	—	—	2,7	0,3
Coques homofermentaires				
SG 1	3,3	traces	3,7	0,5
CV 116	—	—	7,3	0,1
Coques hétérofermentaires				
CF 34	2,5	0,8	7,3	0,9
BR 3	6,9	0,2	—	—
J 6	—	—	1,3	0,9

Poids de la bio-masse : 1 g de cellules fraîches par litre ;
Température d'incubation : 30 °C ;
Temps d'incubation : 3 à 5 jours.

CONCLUSIONS

L'histamine, sous-produit du métabolisme des microorganismes du vin, se trouve dans la plupart des vins, mais à concentration généralement extrêmement faible, très largement inférieure au seuil de toxicité. Elle découle de l'activité bactérienne et même pour une faible part de la fermentation alcoolique.

Nous avons constaté que les bactéries lactiques isolées des vins présentent une capacité très réduite à former de l'histamine au cours de leur développement, même dans un milieu optimum de croissance et quelle que soit par ailleurs la richesse de ce milieu en histidine. La propriété de décarboxyler l'histidine en histamine est en effet très peu répandue parmi les bactéries lactiques isolées de vins ; RADLER (1973) a cité le cas d'une seule souche. Pour notre part nous n'en avons rencontré aucune ayant cette propriété.

Expérimentalement, une bio-masse bactérienne non proliférante peut développer dans le vin, une histaminogénèse sensible, en fonction de la souche et des caractères propres au milieu ; cela pourrait expliquer des teneurs plus élevées observées accidentellement dans certains cas, rares et isolés. La supplémentation des vins en histidine, loin de favoriser la formation d'histamine, a au contraire pour effet de l'inhiber, et provoque même la dégradation de l'histamine préexistante.

Il apparaît donc que la synthèse de cette substance par les bactéries lactiques, toujours très réduite, relève de processus biochimiques beaucoup plus complexes que la simple décarboxylation de l'histidine dont l'hypothèse avait été avancée; à notre avis elle serait plutôt liée à des conditions de carence.

Manuscrit reçu le 12 mai 1975.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARSKY Y., BURKHALTER A., CLARK W.G., 1961. Les méthodes employées pour l'étude du métabolisme et de la libération de l'histamine, **J. Phys., 53,** 847-894.

LAFON-LAFOURCADE S., 1970. Etude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins. **Ann. Technol. Agric., 19,** 141-154.

MACK D., 1973. Bestimmung von Histamin in Wein mit dem automatischen Aminosaürenalysator. **L. Lebensm. Unters. Forsch., 152,** 321.

MARQUARDT P., SCHMIDT H., SPATH M., 1963. Histamin in alkoholhaltigen Getränken. **Arzneimittel Forschung., 13,** 1100-1102.

MASQUELIER J., 1974. Communication personnelle.

MAYER K., PAUSE G., VETSCH U., 1971. Histaminbildung wahrend der Weinbereitung. **Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg., 62,** 397-406.

MAYER K. et PAUSE G., 1973. Dosage de l'histamine dans les vins. **B.O.I.V.,** 140/FV/441.

MAYER K., 1974. Teneurs des vins suisses en histamine, **B.O.I.V.,** 214/FV/466.

MICHAELSON A. et COFFMAN P., 1969. An improved ion-exchange purification procedure for the fluorometric assay of histamine, **Anal. Broch., 27,** 257.

OATES J., MARSH E., SJOERDSMA A., 1962. Studies of histamin in human urin using a fluorometric method of assay. **Clin. Chim. Act., 7,** 488-497.

OUCH C., 1971. Measurement of histamine in California wines, **J. Agr. Food Chem., 19,** 241-244.

PAUSE G. et MAYER K., 1972. Bestimmung von biogenen Aminen in Wein, **Die Wein-Wissenschaft,** n° 7-8, 174-178.

PLUMAS B., 1970. Etude de la formation d'histamine dans les vins par dosage simultané de l'histidine et de l'histamine. Diplôme Ingénieur CNAM, Paris.

PUPUTTI E. et SUOMALAINEN H., 1969. Über die biogenen Amine der Weine, **Mittelungen, 19,** 184-192.

QUEVAUVILLIER et MAZIERE, 1969. Recherche de dosage biologique de l'histamine dans le vin. **Acad. Pharm., 27,** 411-414.

RADLER F., 1973. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. **Fourth Long Ashton Symposium.**

SCHNEYDER J., 1972. Zusammenfassende Darstellung des derzeitigen Wissens über Histamin und ahnliche Stoffe in Wein, **Mitteilungen, 22,** 313.

SCHNEYDER J., 1973. Histamine et substances similaires dans les vins, Causes de leur formation. Méthodes de leur élimination du vin. **B.O.I.V., 46,** n° 511-821.

SHORE A., 1959. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissues. **J. Pharmac., 127,** 182-186.