



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

Année 2004-2005

THESE DE CHIMIE-PHYSIQUE
Pour l'obtention du Diplôme de
DOCTEUR 3^{ème} CYCLE
Spécialité: Photochimie Analytique

Présentée et soutenue publiquement par
Monsieur Rabani ADAMOU
Le 10 décembre 2005

SUJET

Elaboration d'une nouvelle méthode de dosage spectrofluorimétrique de l'histamine dans les produits halieutiques à l'aide de la fluorescamine comme sensibilisateur en solutions tensioactives aqueuse et organique

JURY

NOM	Prénom	Qualité	Organisme
M. TINE	Alphonse	Président	UCAD-FST
M. NDIAYE	Sérigne Amadou	Examineur	UCAD-FST
M. DIOP	Abdoulaye	Examineur	UCAD-FST
M. DIOP	Cheikh	Examineur	UCAD-ISE
M. COLY	Atanasse	Directeur	UCAD-FST

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Photochimie et d'Analyse (LPA) du département de chimie de la faculté des Sciences et Techniques (FST) de l'Université Cheikh Anta Diop (UCAD) de Dakar, sous la direction de Monsieur Atanasse COLY, Maître de Conférences (UCAD) à qui j'exprime ma profonde reconnaissance. Je l'assure de toute ma gratitude pour la très grande disponibilité qu'il a eue à mon égard tout au long de ce travail.

Par la même occasion, je tiens à remercier profondément le Professeur Alphonse TINE (UCAD) pour tant d'estimables avis et conseils qu'il m'a prodigué pendant toute la durée de mes travaux et pour tout son engagement pour la bonne marche du Laboratoire de Photochimie et d'Analyse.

Mes remerciements vont également à :

Monsieur le Professeur Sérigne Amadou NDIAYE pour l'honneur qu'il me fait de juger ce travail et de participer à ce jury

Monsieur Abdoulaye DIOP Maître de Conférences (UCAD) pour avoir bien voulu juger ce travail.

Monsieur Cheikh DIOP, Maître Assistant à l'Institut des Sciences de l'environnement (ISE, UCAD) pour l'honneur qu'il me fait de juger mon travail.

Madame Diabou GAYE-SEYE Maître de Conférences (UCAD) pour ses conseils et pour l'Analyse de mes échantillons à l'ITODYS (Université Paris 7).

Monsieur Bocar Fally Gallédo Maître de Conférences (UCAD) pour ses commentaires sur le complexe histamine-fluorescamine.

Le Professeur Joseph R. LAKOWICZ directeur du Center of Fluorescence Spectroscopy (CFS) de l'école de médecine de Baltimore (Université de Maryland, USA) et son Assistante Melle Mary ROSENFELD pour leur aide en documentation tout au long de ce travail et aussi pour la formation en spectroscopie de fluorescence dont j'ai profité gratuitement dans leur centre à Baltimore en 2003.

Le Professeur Adama SABA responsable du Laboratoire de Chimie Bio-Organique et Phytochimie de l'UFR des Sciences Exactes et Appliquées de l'Université de Ouagadougou pour ses suggestions sur le mécanisme de la formation du complexe histamine-fluorescamine.

Je tiens à remercier Monsieur Moussa ELY pour l'analyse de mes échantillons à VITODYS (Université Paris 7).

Je présente également mes sincères remerciements aux autorités académiques de l'université Cheikh Anta DIOP de Dakar pour m'avoir facilité les conditions d'inscriptions et d'études.

Ma reconnaissance va aussi à tous mes camarades de laboratoire (LPA), à tous les enseignants et au personnel technique et administratif du Département de Chimie (FST) pour m'avoir manifesté beaucoup de sympathie et de compréhension.

Je remercie enfin L'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) qui a financé ce travail à travers le projet JER N° 6018.

DEDICACES

Ce travail est dédié à titre posthume à :

- ❖ *Mes grands-parents Fatouma Hanabery Hima et Abdou Sabey Hamani, je ne saurais oublier tous ce que vous avez fait pour moi et les nombreux conseils que vous m'avez donnés.*
- ❖ *Mon père, hélas très tôt parti pour toujours.*

Je dédie également ce travail à :

- *Ma mère, une femme formidable qui a été toujours à nos côtés,*
- *Ma tante Mintou Seybou qui a été toujours avec nous,*
- *Mes petits frères et soeurs (Bassirou, Halimatou, Hassiatou et Issa), mon neveu Fataoulaye Amadou, ma cousine Katoumi. A.Sirfi et mes autres parents.*
- *Toutes les personnes qui m'ont aidé dans mon parcours,*
 - *La famille Mâazou Moha,*
 - *La famille Hima Bello,*
 - *La Famille Siddo Moumouni,*
 - *La famille Tiné,*
 - *La famille Issa Mamadou,*
 - *Mon cousin Niandou Garba,*
 - *Mes oncles Souleymane, Adamou et Siddo,*
 - *Toute personne que je n'ai pas citée ici et qui d'une façon ou d'une autre m'a soutenu dans mes études.*

Je dédie enfin ce travail à :

Tous mes enseignants pas seulement pour le savoir que vous m'avez transmis mais aussi pour vos conseils. Cela m'a permis de tenir malgré les dures épreuves de la vie, je vous remercie infiniment.

GLOSSAIRE DES SIGLES.....	8
GLOSSAIRE DES TERMES MATHEMATIQUES	9
INTRODUCTION GENERALE	10
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I.A. PRINCIPE DE LA METHODE DE LA FLUORESCENCE.....	15
I.A.1. LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....	15
I.A.1.1. Excitation et émission de fluorescence.....	15
I.A.1.2. Facteurs affectant le signal de fluorescence.....	17
I.A.1.3. Description quantique d'un fluorophore.....	18
I.A.1.4. Analyse quantitative	19
I.A.1.5. Choix de la méthode fluorimétrique.....	20
I.A.2. LA METHODE DE DERIVATISATION.....	21
I.A.2.1. La Fluorescamine.....	22
I.A.2.2. L'OPA et le NDA	24
I.A.2.3. Le chlorure de Dansyl et autres chlorures.....	26
I.A.2.4. Les dérivés NBD.....	27
I.A.3. EFFETS DU SOLVANT SUR LA FLUORESCENCE	28
I.A.3.1. Les différents types de solvant.....	28
I.A.3.2. Effet solvatochromique d'un solvant.....	30
I.A.3.3. Effet hyperchrome et hypochrome du solvant.....	32
I.A.4. EFFET DES MICELLES SUR LA FLUORESCENCE.....	33
I.A.4.1. Molécule tensioactive	33
I.A.4.2. Structure des micelles.....	34
I.A.4.3. La concentration micellaire critique (cmc).....	35
I.A.4.4. Effets micellaires	36
I.B. PRODUCTION ET MODE D'ACTION D'HISTAMINE.....	38
I.B.1. PRODUCTION DE L'HISTAMINE	38
I.B.2. MODE D'ACTION DE L'HISTAMINE	39
I.B.3. LES METHODES DE DOSAGE DE L'HISTAMINE	42
I.B.3.1. Méthodes de dosage indirectes.....	44
I.B.3.2. Les méthodes de dosage direct.....	48
II. TECHNIQUES EXPERIMENTALES	52
II.A. PRODUITS UTILISES.....	52
II.A.1. LES SOLVANTS	52
II.A.1.1. Solvant polaire protique.....	52
II.A.1.2. Solvant aprotique.....	52
II.A.2. LES REACTIFS ANALYTIQUES	52
II.A.3. LES REACTIFS D'EXTRACTION	52
II.A.4. LES SURFACTANTS	53
II.A.4.1. Propriétés des surfactants.....	53

II.B. INSTRUMENTATION	54
II.B.1. SPECTRE UV-VISIBLE	54
II.B.2. SPECTRE DE FLUORESCENCE.....	54
II.B.3. SPECTRE INFRA ROUGE (IR).....	54
II.B.4. SPECTRE DE MASSE	54
II.B.5. EXTRACTION DE L'HISTAMINE.....	55
II.B.6. TRAITEMENT DES RESULTATS	55
II.C. PROCEDURE EXPERIMENTALE	55
II.C.1. PREPARATION DES SOLUTIONS	55
II.C.2. METHODES DE MESURE	56
II.C.3. PROCEDURES D'EXTRACTION DE L'HISTAMINE	57
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	62
CHAPITRE III.A. LE DERIVE HISTAMINE-FLUORESCAMINE.....	62
III.A.1. REACTION DE CONDENSATION	63
III.A.2. FACTEURS AFFECTANT LA REACTION DE CONDENSATION	64
III.A.2.1. Le milieu aqueux.....	64
III.A.2.2. Ordre d'ajout des réactifs.....	65
III.A.2.3. La concentration de la fluorescamine.....	67
III.A.2.3.1. Stœchiométrie du complexe histamine-fluorescamine	67
III.A.2.3.2. Optimisation de la concentration de la fluorescamine.....	68
III.A.3. ETUDE SPECTROSCOPIQUE DU COMPLEXE HISTAMINE-FLUORESCAMINE.....	70
III.A.3.1. Spectroscopie d'absorption uv-vis	70
III.A.3.1.1. Absorption uv-vis de l'histamine.....	71
III.A.3.1.2. Absorption uv-vis de la fluorescamine	71
III.A.3.1.3. Absorption uv-vis du complexe histamine-fluorescamine.....	72
III.A.3.2. Spectroscopie de fluorescence	74
III.A.3.3. Diagramme énergétique du dérivé fluorophore.....	77
III.A.3.4. Spectroscopie infra Rouge (IR).....	78
III.A.3.4.1. Spectres IR de l'histamine	79
III.A.3.4.2. Spectres IR de la fluorescamine.....	81
III.A.3.4.3. Le spectre IR du dérivé fluorophore	81
III.A.3.5. Chromatographie en phase gazeuse	82
III.A.3.6. spectrométrie de masse.....	84
III.A.3.6.1. Spectre de masse du pic à 1,56 min	84
III.A.3.6.2. Spectre de masse du pic à 2.125 min	87
III.A.3.6.3. Spectre de masse du pic à 3,358 min	89
CHAPITRE III.B. EFFETS DE SOLVANT	93
III.B.1. EFFET DE SOLVANTS SUR LES SPECTRES D'EXCITATION ET D'EMISSION	94
III.B.2. EFFET SOLVATOCHROMIQUE ET HYPERCHROMIQUE	95
III.B.2.1. Effet solvatochromique	95
III.B.2.2. Effet hyper ou hypochromique.....	97
III.B.2.2.1. Effet de l'indice de réfraction	98
III.B.2.2.2. Effet de la constante diélectrique ϵ sur la fluorescence.....	100

III.B.2.2.3. Effet du moment dipolaire sur la fluorescence.....	100
III.B.3. INTERACTION SOLVANT-SENSIBILISATEUR	102
III.B.4. EFFET DE L'IRRADIATION DE LA LAMPE EN XENON.....	103
III.B.5. CALIBRATION POUR LE DOSAGE DE L'HISTAMINE	105
III.B.5.1. Calibration dans l'eau.....	105
III.B.5.2. Calibration dans l'acétonitrile	106
III.B.5.3. Calibration dans l'éthanol.....	106
III.B.6. ANALYSE D'ÉCHANTILLONS REELS.....	107
III.B.6.1. Solvant eau	107
III.B.6.2. Solvant acétonitrile.....	108
III.B.6.3. Solvant éthanol.....	108
III.B.7. PERFORMANCE ANALYTIQUE	109
CHAPITRE III.C. DOSAGE EN SOLUTIONS TENSIOACTIVES.....	110
III.C.1. DOSAGE EN SOLUTION MICELLAIRE AQUEUSE	111
III.C.1.1. Effet du solvant micellaire sur les spectres	111
III.C.1.2. Optimisation des conditions opératoires	112
III.C.1.2.1. Optimisation du pH en solution micellaire aqueuse.....	112
III.C.1.2.2. La stabilité du complexe (Etude cinétique).....	113
faible	116
III.C.1.2.3. Effet de la concentration micellaire	116
III.C.1.2.3.1. Effet de la variation de la concentration de Brij-700.....	116
III.C.1.2.3.2. Effet de la concentration de SDS.....	117
III.C.1.2.3.3. Effet de la concentration de CTAC	118
III.C.1.2.4. Effet de la concentration de NaCl.....	118
III.C.1.3. Courbes de calibration.....	119
III.C.1.3.1. Calibration dans l'eau	119
III.C.1.3.2. Calibration dans le BRIJ-700	120
III.C.1.3.3. Calibration dans le SDS	121
III.C.1.3.4. Calibration dans le CTAC.....	122
III.C.1.4. Application analytique.....	122
III.C.1.4.1. Dosage d'échantillons réels de poissons	122
III.C.1.4.2. Performance Analytique.....	124
III.C.2. LES TENSIOACTIFS EN MILIEU ORGANIQUE	124
III.C.2.1. Fluorescence en milieux tensioactifs.....	124
III.C.2.1.1. Préparation de l'échantillon	125
III.C.2.1.2. Effet de solvant sur les spectres	125
III.C.2.2. Optimisation de la concentration de CTAC	126
III.C.2.3. Effet de NaOH et HCl	127
III.C.2.4. Etude Cinétique	129
III.C.2.5. Calibration en solution tensioactive	131
CHAPITRE III.D. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE NOTRE METHODE.....	134
III.D.1. ETUDE COMPARATIVE	134
III.D.1.1. Sensibilité et stabilité comparative.....	135
III.D.1.2. Effet du pH en milieu binaire eau-méthanol	137
III.D.1.3. Comparaison de nos résultats avec les autres méthodes	138
CONCLUSION GENERALE	142
REFERENCES.....	144

Glossaire des Sigles

ABVT: azote basique volatile total

AOAC: association of official analytical chemists

CBQA: 3-(4-Carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde

CCM: chromatographie sur couche mince

CI: conversion interne

CIS: conversion inter système

CLHP: chromatographie liquide haute performance

cmc: concentration micellaire critique

CPG: chromatographie en phase gazeuse

CTAC: chlorure de cétyltriméthyl-ammonium

Dansyl : 5-Diméthylaminonaphthalene-1-acide sulfonique

DMF: diméthyl formamide

DMSO : diméthyl sulfoxyde

FITC : la fluorescein-5-isothiocyanate

fcf : facteur de Franck Condon

FQC : 3-(2-Furoyl) quinoline-2-carboxaldehyde

FHM: fluorescamine+histamine+micelle

FMH: fluorescamine+micelle+histamine

HFM: histamine+fluorescamine+micelle

HMF : histamine+micelle+fluorescamine

HV : haut voltage

IR : infra rouge

Kit : trousse

MQAE : N(ethoxycarboxylmethyl)6-methoxyquinolinium

NBD : 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4yl

NDA: naphtalene-2,3-dicarboxaldehyde

NIST: national institute of standards and technology

OPA : orthophthalaldéhyde

SDS: sulfate dodécyle de sodium

TCA: trichloroacétique acid

TE : transfert d'énergie

UV-VIS : ultra violet et visible

Glossaire des Termes Mathématiques

A : absorbance

$\alpha(\nu)$: coefficient d'absorption

C : concentration (M)

ΔH : enthalpie (KJ mol⁻¹)

Δf : polarisabilité

E^G : énergie à l'état fondamental (KJ)

E^E : énergie à l'état excité (KJ)

ϵ : constante diélectrique

$\epsilon(\lambda)$: coefficient d'extinction molaire
(M⁻¹ cm⁻¹)

Φ : rendement quantique

Γ : constante de désactivation radiative

Γ_0 : constante de désactivation radiative
dans le vide

I : intensité

I_0 : intensité initiale

k_r : constante de désactivation
radiative (s⁻¹)

l : longueur de la cuve (cm)

LD : limite de détection (ng ml⁻¹)

LDA : limite de détection absolue (ng)

LQ : limite de quantification (ng ml⁻¹)

λ_{ex} : longueur d'onde d'excitation (nm)

λ_{em} : longueur d'onde d'émission (nm)

μ : moment dipolaire (debye, D)

μ_{ij} : moment dipolaire de transition (D)

μ_G : moment dipolaire à l'état
fondamental (D)

μ_E : moment dipolaire à l'état excité (D)

n : indice de réfraction du milieu

ν_A : fréquence d'absorption (Hz)

ν_E : fréquence d'émission (Hz)

$\bar{\nu}$: nombre d'onde (cm⁻¹)

$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_E$: déplacement de Stokes (cm⁻¹)

pH : potentiel d'hydrogène

ppm : parti par million (μg/g)

ppb : parti par billion (ng/g)

ψ : fonction d'onde

r : rayon de la molécule

R : coefficient de corrélation

R_{el}^G : champs électrique à l'état
fondamental

R_{el}^E : champs électrique à l'état excité

R_{or}^G : champs électrique d'orientation

S : moment magnétique de spin

s_p : état singulet p (p=0,1,2,3...)

s_{pv} : état singulet p, niveau
vibrationnel v

σ : écart type

T^{*} : teneur en histamine

INTRODUCTION GENERALE

Trouver une nouvelle méthode efficace (sensible, sélective, spécifique) permettant de donner une réponse à toutes les insuffisances observées dans les méthodes actuelles (instabilité, interférences, longue durée pour un test, coût élevé) utilisées pour le dosage de l'histamine dans les produits alimentaires (produits halieutiques et dérivés, certains végétaux, les œufs, chocolats, etc.) et dans les liquides physiologiques (sang, plasma, urine, larme, etc.) présente un enjeu sanitaire et économique très important. En effet, l'histamine est une amine biogène présente dans tout l'organisme et dans de nombreux produits alimentaires. A très faible dose, l'histamine joue de nombreux rôles de régulation dans l'organisme mais est très toxique à une certaine teneur (au delà de 0.1 µg/g de produit). Cette substance est aussi à l'origine de l'allergie de type I (allergie à effets immédiats) et de l'intoxication scombroid. Dans les deux cas, elle provoque des troubles respiratoires, des démangeaisons, une hypersécrétion gastrique d'acide chlorhydrique, des troubles de la vigilance, des crampes, des vomissements, de diarrhées, etc. Dans des cas graves, des complications peuvent survenir et conduire à la mort. Sur le plan économique, le prix moyen d'un test varie entre 5 et 7 dollars US. Dans le domaine de la grande pêche, les statistiques de la FAO (FAO, 1994) estiment la production entre 1972 et 1992 à près de 85 millions de tonnes de poissons par an. En raison d'un test par tonne cela constitue un enjeu économique très important. Dans le domaine agroalimentaire (dérivé des produits halieutiques et autres aliments histamino-producteurs) et médicale, le gain est énorme. Cela explique la bataille féroce autour des procédures de dosage de l'histamine pour le contrôle de ce marché très juteux.

Dans le présent travail nous nous sommes fixé comme objectif principal de trouver une alternative (simple et moins onéreuse) aux différentes méthodes de dosage actuelles de l'histamine dans les produits halieutiques. En effet, l'amélioration de la sensibilité en fluorescence

nécessite généralement une instrumentation sophistiquée et très onéreuse (détecteur à compteur de photon unique, spectrofluorimètre haute technologie à source d'excitation laser, etc.). Pour atteindre cet objectif, nous avons d'une part certes opté pour la voie fluorimétrique mais cette fois, avec des moyens simples (solvants). D'autre part, contrairement aux autres travaux basés sur la fluorescence qui utilisent le plus souvent l'OPA comme sensibilisateur, nous avons opté dans le présent travail pour la fluorescamine. A la différence des autres sensibilisateurs (OPA, chlorure de dansyl et de NBD, etc.), la fluorescamine est un réactif spécifique de la fonction amine primaire dans certaines conditions opératoires (pH 7-10) et elle réagit instantanément avec l'histamine pour donner un dérivé fluorescent. Il faut savoir aussi que comme l'histamine, ni la fluorescamine, ni ses produits d'hydrolyse ne sont fluorescents, éliminant ainsi de nombreuses sources d'interférences observées dans les autres méthodes. Cette fois ci, à la différence des autres méthodes, nous avons réalisé une étude en solution tensioactive aqueuse et organique de cetyltriméthylammonium (CTAC, micelle cationique) de sulfate dodécyle de sodium (SDS, micelle anionique) et de Brij-700 (micelle neutre). En effet, les molécules tensioactives sont susceptibles de former des micelles directes ou inverses (selon la polarité du solvant) capables d'encapsuler dans certains cas de nombreux fluorophores dans leur cavité hydrophobe (micelles directes) ou hydrophile (micelles inverses). Ce phénomène se traduit généralement par une augmentation importante du signal de fluorescence, par suite de l'isolement du fluorophore et de sa protection vis-à-vis des autres processus de désactivations non radiatives.

Ce mémoire comporte essentiellement trois parties:

❖ La première partie consacrée à une étude bibliographique est composée de deux chapitres. Dans le premier chapitre (I.A), nous avons rappelé le principe de la méthode fluorimétrique à savoir la théorie de la spectroscopie de fluorescence analytique, la méthode de dérivation

d'un analyte avec un sensibilisateur en vue de former un dérivé fluorescent dans le cas du dosage des composés aminés en général et de l'histamine en particulier. Dans ce chapitre nous avons également traité des effets de solvant en général et des solutions micellaires en particulier sur le signal de fluorescence. cela en vue d'optimiser la sensibilité de notre méthode dans le but de trouver une alternative moins coûteuse à la voie technologique de gain de sensibilité fluorimétrique. Dans le second chapitre (I.B), nous avons traité de la production de l'histamine dans l'organisme et chez les aliments histamino-producteurs (poissons, végétaux, etc.) mais aussi de son mode d'action dans l'organisme dans les cas d'allergie naturelle et d'intoxication scombroid. Enfin, nous avons réalisé une étude détaillée des différentes méthodes tant indirectes que directes de dosage de l'histamine dans les produits halieutiques. Nous avons ainsi passé en revue les différentes méthodes de dosage de l'histamine dans les produits halieutiques et de ses dérivés tout en précisant dans chaque cas les avantages et les inconvénients.

❖ La deuxième partie traite des techniques expérimentales à savoir l'instrumentation, les solvants et les réactifs utilisés dans ce travail. En plus, nous avons réalisé une étude détaillée des procédures, de préparation des solutions, de mesure du signal de fluorescence car une étude en milieux micellaires nécessite la maîtrise de l'ordre d'ajout des différents réactifs dans le milieu réactionnel. Enfin, nous avons décrit la procédure d'extraction de l'histamine de l'échantillon réel (méthode Lerke et Bell) que nous avons adapté aux conditions d'utilisation de notre sensibilisateur (la fluoescamine).

❖ La troisième partie composée de quatre chapitres contient une discussion de l'ensemble de nos résultats expérimentaux. Dans le premier chapitre (III.A) nous avons traité de la réaction de dérivatisation entre l'histamine et la fluoescamine et de la nature du complexe formé. Dans cette étude à l'aide de la spectroscopie d'absorption uv-visible, de

fluorescence et d'infra rouge, nous avons montré la formation d'un complexe entre l'histamine et la fluorescamine et donner ses propriétés énergétiques. Un traitement en chromatographie en phase gazeuse du mélange histamine et fluorescamine suivi d'une spectrométrie de masse des différents pics observés au chromatogramme a permis d'identifier les différents constituants du mélange et de proposer une structure pour le complexe histamine-fluorescamine. Dans le deuxième chapitre (III.B), en se fondant sur nos résultats bibliographiques concernant le solvant à savoir qu'il est possible de gagner en sensibilité. Nous avons réalisé une étude d'optimisation du signal de fluorescence dans divers milieux aqueux et organiques suivis d'une analyse des échantillons réels dans nos conditions optimales. Dans le troisième chapitre (III.C), suivant le même objectif que précédemment nous avons réalisé un dosage de l'histamine en milieux tensioactifs aqueux et organiques. Enfin, dans le quatrième chapitre (III.D) après avoir mis en relief les insuffisances de la méthode classique de dosage de l'histamine dans les produits halieutiques (méthode AOAC 977.13), nous avons effectué une étude comparative des résultats de notre méthode avec ceux des autres méthodes en vigueur sur le marché international.

PREMIERE PARTIE
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.A. Principe de la méthode de la fluorescence

La fluorescence est un outil efficace d'analyse et d'investigation très utilisé dans des domaines variés. Dans l'agroalimentaire elle est utilisée pour la détermination du degré de toxicité et d'altération des produits. Dans le domaine médical et pharmaceutique la fluorescence permet l'analyse des liquides physiologiques (sang, plasma, urines, larmes, etc.), l'étude de la structure et l'ultra structure cellulaire notamment le séquençage de l'ADN, la recherche de drogues (dopage), le contrôle de la qualité des produits pharmaceutiques. Dans le domaine spatial, elle est utilisée pour la recherche des résidus organiques dans des poussières interstellaires et dans la récupération des engins spatiaux. Dans la technologie, elle sert à la production des lasers.

Cette technique analytique repose sur l'émission d'une radiation lumineuse à partir d'un analyte (fluorophore) préalablement excité. Dans le cas où l'analyte n'émet pas, il est transformé en un dérivé fluorescent à l'aide d'un sensibilisateur approprié par une méthode de dérivatisation.

I.A.1. La spectroscopie de fluorescence

La fluorimétrie nécessite la maîtrise, de l'instrumentation utilisée, de la spectroscopie d'absorption et/ou de l'excitation et de l'émission de fluorescence. Elle demande aussi la prise en compte de tous les effets affectant le signal de fluorescence (solvants, pH, température, etc.) afin d'augmenter la sensibilité et la fiabilité des analyses.

I.A.1.1. Excitation et émission de fluorescence

Lors de l'émission de fluorescence comme dans l'absorption, la transition électronique est représentée de façon verticale (principe de Franck Condon) car la durée de la transition est très petite (1 fs) devant le temps que mettraient les noyaux relativement lourds pour se déplacer (1

A° en 100 fs) [1-3]. Etant donné que l'énergie émise est inférieure à l'énergie absorbée, le spectre de fluorescence (b) est décalé vers le domaine des grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'excitation (a) (Fig. I.1). C'est le déplacement dit de Stokes.

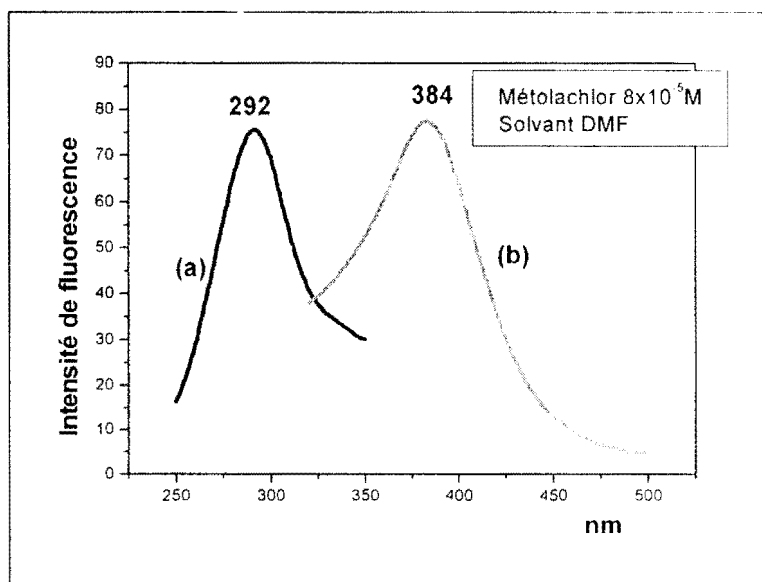


Fig. I. 1. Spectres d'excitation (a) et d'émission (b) du métolachlor dans le DMF.

Pour un même solvant, le pic d'émission ne change pas de position en faisant varier la longueur d'onde d'excitation. La variation de l'excitation se traduit simplement par une diminution de l'intensité d'émission ; ce qui permet de ne pas confondre le pic d'émission de fluorescence avec les pics de diffusion de Rayleigh et de Raman.

➤ Diffusion Rayleigh

L'intensité du pic dépend de la polarisabilité des molécules du solvant. Ces dernières réémettent dans toutes les directions une petite fraction de la lumière excitatrice pour des multiples entiers de la longueur d'onde de la radiation excitatrice [3].

➤ Diffusion Raman

L'intensité du pic est 100 à 1000 fois plus faible que celui de Rayleigh et sa position se trouve du côté des grandes longueurs d'onde car correspond au transfert d'une petite partie de l'énergie excitatrice aux

molécules du solvant sous forme d'énergie vibrationnelle. Ensuite, ces molécules réémettent des photons de moindre énergie. La particularité de ce pic est que pour un même solvant, la différence d'énergie entre les photons absorbés et les photons réémis est une constante ; ce qui fait qu'en déplaçant la longueur d'onde d'excitation, le pic de Raman change de position [3,4].

I.A.1.2. Facteurs affectant le signal de fluorescence

La fluorescence (F) étant un processus compétitif, son intensité dépendra alors de l'importance relative des autres processus concurrents de désactivation de l'état excité décrits dans le diagramme de Jablonsky. Ainsi, la présence d'autres types de molécules favorise le transfert d'énergie (TE) au dépend de la fluorescence. Une élévation de température favorise les processus de désactivation non radiatifs: La relaxation vibrationnelle (rv) suivie d'une conversion interne (CI), la conversion intersystème (CIS), le transfert de l'énergie (TE) et les réactions photochimiques (R) avec des molécules du milieu. La somme des rendements quantiques de tous ces processus doit être égale à l'unité, soit : $\Phi_F + \Phi_{CI} + \Phi_{CIS} + \Phi_{TE} + \Phi_R = 1$.

Le solvant, le pH, la concentration et la structure de l'analyte ont aussi des effets non négligeables sur le signal de fluorescence. C'est ainsi que la planéité et la rigidité des molécules sont favorables à l'émission de signal de fluorescence. D'autre part les composés insaturés comportant un système conjugué d'électrons π délocalisés sont en général fluorescents, contrairement aux molécules saturées qui subissent une prédissociation dans l'UV lointain. Ainsi, le phénol est très fluorescent alors que le cyclohexanol ne l'est pas. Les groupements électrodonneurs (-OH, CH₃O-, -NH₂, etc.) tendent à exalter le signal de fluorescence tandis que les groupements électroattracteurs (-NO₂, -CO₂H, -X, etc.) provoquent dans certains cas une extinction plus ou moins importante du signal [4].

Par conséquent, avant toute étude analytique, la prise en compte de tous ces facteurs est nécessaire [1,2,4].

I.A.1.3. Description quantique d'un fluorophore

Les propriétés physiques et chimiques d'une molécule sont largement liées à son moment dipolaire. Pour atteindre cet observable, on associe à la molécule une fonction d'onde ψ_i décrivant la configuration de la molécule fluorophore dans un état i . L'opérateur moment dipolaire μ_i associé s'écrira:

$$\vec{\mu}_i = \sum q_m \vec{r}_m \quad (1)$$

Avec m le nombre de particule, q_m la charge élémentaire et \vec{r}_m son rayon vecteur.

La probabilité de transition de l'état i à un autre état j ou inversement est fonction du moment dipolaire de transition de la molécule ; elle est proportionnelle au carré du module de l'intégrale $P_{j \leftarrow i}$ ou $p_{j \rightarrow i}$ [5].

$$P_{i \leftarrow j} = \int \Psi_i \mu_{ij} \Psi_j dV \quad (2)$$

Une molécule fluorescente étant un ensemble de particules (m) composé de particules de charge positive (proton) et de particules de charge négative (électron), lorsqu'elle est dans un état stationnaire (état fondamental ou états excités), elle est décrite par une fonction ψ_i dite stationnaire (ne change pas avec le temps) qui vérifie l'équation de Schrödinger $\hat{H}\Psi_i = E\Psi_i$, avec \hat{H} l'opérateur Hamiltonien associé à l'énergie E du système. Pour ce qui concerne les états transitoires décrivant l'absorption, c'est à dire le passage de l'état fondamental (stationnaire) à un état excité (stationnaire) et l'émission de fluorescence entre l'état excité S_1 (stationnaire) à l'état fondamental S_0 (stationnaire), ils sont décrits par une fonction ψ_{ij} qui peut être une combinaison linéaire des fonctions décrivant les états stationnaires ψ_i et ψ_j . Le moment dipolaire électrique de la molécule fluorophore correspondante est :

$$\mu_{ij} = \iiint \dots \int_m \Psi_j^* \vec{\mu} \Psi_i dx_1 dy_1 dz_1 \dots dx_m dy_m dz_m \quad (3)$$

Les différents $\vec{\mu}_{ij}$ sont les éléments de la matrice du moment dipolaire électrique.

- Les éléments $\bar{\mu}_{ij}$ avec $i \neq j$ décrivent les processus correspondant à l'excitation et à l'émission. Dans les états j les molécules oscillent avec une vitesse angulaire ω_{ij} .

$$\omega_{j \leftarrow i} = 2\pi\nu = \frac{E_j - E_i}{\hbar} \quad (4)$$

Pour l'émission de fluorescence, la transition $0 \leftarrow 1$ est la plus essentielle. Les molécules excitées émettent dans certains cas de façon spontanée ou stimulée une radiation lumineuse pour retourner à l'état fondamental.

- Les éléments de la diagonale $\bar{\mu}_{ij}$ avec $i=j$ décrivent la solvatochromie. Pour $i=j=0$, si $\mu_{00} = 0$, la molécule est dite non polaire à l'état fondamental et si $\mu_{00} \neq 0$, elle est dite polaire; on assiste alors à un déplacement des bandes du spectre d'émission et/ou d'excitation. Si $\mu_{11} = \mu_{00} = 0$, théoriquement il n'y a pas d'effet, on dit que la molécule n'est pas solvatochromique bien que dans la réalité on observe un léger déplacement. Cela est dû à la désactivation vibrationnelle de l'état excité $(S_{10})^*$ d'énergie supérieure à l'état $(S_{10})^*$ où a lieu l'émission [1].

I.A.1.4. Analyse quantitative

A partir d'un spectre d'émission, la mesure de l'intensité du signal de fluorescence permet de déterminer la concentration d'un analyte. En effet, on démontre qu'il existe une relation quantitative simple entre l'intensité I_F de fluorescence et la concentration C d'un soluté donné [1,2].

$$\phi_f = \frac{I_f}{I_a} = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}}, \text{ avec } I_f = \phi_f (I_0 - I_t) = \phi_f I_0 (1 - 10^{-A}),$$

Pour $A < 0,01$ on a $10^{-A} \approx 1 - 2,303A$ et comme $A = \epsilon l C$ alors : $I_f = 2,303 \phi_f I_0 \epsilon l C$ (5)

ϕ_f : rendement quantique de fluorescence.

I_0 : intensité du rayonnement incident.

ϵ : coefficient d'extinction molaire de la substance ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) considéré comme constante pour une longueur d'onde donnée.

l : longueur du trajet optique à travers la substance, (cm)

C : concentration molaire de la substance à doser (M)

Pour un composé fluorescent dans un solvant donné, à la température donnée, placé dans une cellule aux dimensions connues, les mesures étant faites à une longueur d'onde d'émission fixe avec un appareil donné (I_0 fixe), seule la concentration peut varier. La relation précédente devient $I_F = KC$, ce qui démontre que l'intensité de fluorescence (I_F) est une fonction linéaire de la concentration pour des solutions diluées [3,4]. Ce résultat correspond à un spectrofluorimètre idéal, seulement en l'état actuel des spectrofluorimètres, d'une part le nombre de photons par seconde de la radiation incidente (I_0) n'est pas constant dans le temps et d'autre part, la transmission des photons par le monochromateur et l'efficacité de leur détection par le photomultiplicateur sont fonction de la longueur d'onde. Ainsi, dans la pratique afin de réduire les erreurs sur les résultats de dosage, la détermination de la teneur d'un analyte passe généralement par une courbe de calibration.

I.A.1.5. Choix de la méthode fluorimétrique

La fluorimétrie possède quelques avantages sur les autres méthodes analytiques (la colorimétrie, la conductimétrie, la spectroscopie d'absorption (UV-VIS et IR), et la chromatographie (CCM, CPG et CLHP) directe (qui lie la masse du soluté à analyser à l'aire de son pic dans le chromatogramme) et celle couplée d'une détection UV-VIS et IR. La Fluorimétrie a l'avantage d'être plus sélective, plus spécifique et plus sensible [3,4].

➤ Sélectivité

Seuls certains types de molécules sont capables d'émettre un signal de fluorescence. Il est donc possible de doser des molécules fluorescentes, en présence d'autres molécules non fluorescentes qui interfèrent en absorption.

➤ Sensibilité

La fluorimétrie est souvent 10^2 à 10^4 fois plus sensible que l'absorption uv-vis et son domaine de linéarité est 10^3 fois plus grand. Elle permet de détecter des quantités minimales de substances de l'ordre du nano au picogramme, généralement plus basses que celles détectées en chromatographie en phase gazeuse.

➤ **Spécificité**

De nombreux composés organiques absorbent dans l'UV où il se pose d'énormes problèmes d'interférences. Il est possible que deux substances quelconques soient excitées par la même longueur d'onde, mais il est peu probable, quoi qu'il en soit, que ces deux substances émettent à la même longueur d'onde. Dans les cas critiques, il est possible par dérivatisation d'obtenir une émission loin de toute zone d'interférence.

I.A.2. La méthode de dérivatisation

C'est une technique qui permet de surmonter certaines difficultés rencontrées lors de l'étude analytique d'une substance. Elle est utilisée de façon générale pour deux raisons principales:

- Permettre l'analyse de composés volatils ou instables par transformation des groupements polaires des molécules volatiles (O-H, N-H, S-H) en groupements moins polaires et plus stables.

- Accroître le comportement chromatographique d'une molécule (en augmentant son temps de rétention) ou sa détectabilité par absorption UV-VIS et/ou par fluorescence en le transformant à l'aide d'un sensibilisateur en un complexe détectable de préférence, loin de toute zone d'interférence. Un bon sensibilisateur doit remplir les conditions essentielles suivantes :

- ❖ avoir une réaction de dérivatisation quasi instantanée;
- ❖ avoir un rendement de la réaction de dérivatisation $\geq 95\%$;
- ❖ présenter peu ou pas d'interactions avec les autres molécules présent dans l'échantillon réel à analyser ;

- ❖ conduire à un dérivé stable ou à une stabilité suffisante pour procéder à une analyse.

Dans le cas particulier du marquage fluorogénique, la réaction de dérivatisation est utilisée dans 2 cas spécifiques:

a) Pour l'analyse d'un composé fluorescent mais qui interfère avec des molécules du milieu: il est alors possible de transformer ce composé à l'aide d'un sensibilisateur approprié par une réaction chimique spécifique, totale et rapide, en un dérivé émettant à une longueur d'onde éloignée de la zone d'interférence.

b) Pour rendre fluorescent un analyte non fluorescent : dans ce cas, il est possible de transformer le composé en un dérivé permettant d'observer une fluorescence, à l'aide d'un traitement spécial (chimique, thermique, photochimique, etc.) avec un sensibilisateur déjà fluorescent ou non, mais conduisant à un dérivé fluorescent.

Dans le cas des amines en général et de l'histamine en particulier, le dérivé fluorescent est obtenu par voie chimique au moyen d'une réaction simple (amidation, substitution nucléophile, etc.) grâce à l'usage de réactifs parmi lesquels nous avons : la fluorescamine, l'orthophthalaldéhyde (OPA), le chlorure ou le fluorure de NBD, le chlorure de dansyl, etc.

I.A.2.1. La Fluorescamine

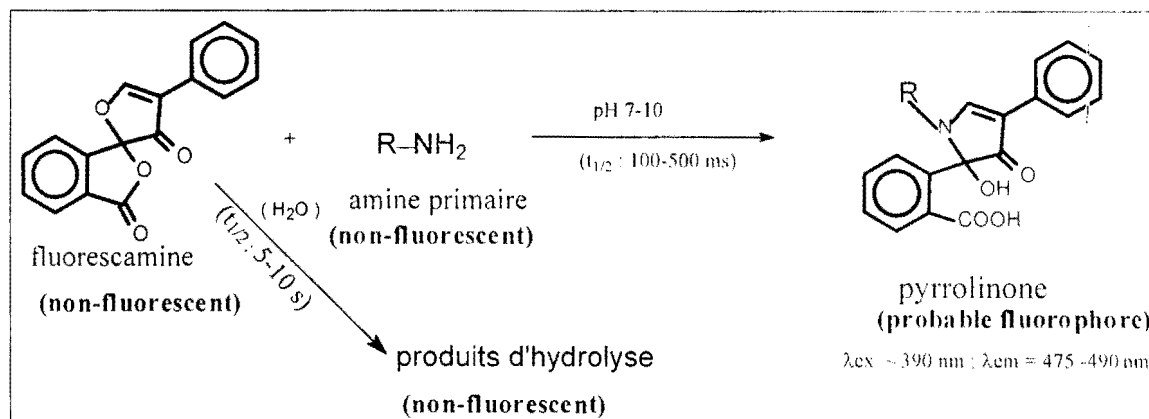


Fig. I. 2. Réaction de condensation entre la fluorescamine et les amines primaires en solution aqueuse.

Le 3,3'-dione, 4-phenyl Spiro (furan-2(3H),1'(3'H)-isobenzofuran) appelé fluorescamine ($C_{17}H_{10}O_4$) réagit instantanément ($t_{1/2}=100-500$ ms) avec les amines primaires (fig. I.2), en solution aqueuse (pH=7-10) pour donner un dérivé fluorescent [6,7]. La fluorescamine est un réactif spécifique des amines primaires, mais elle réagit aussi dans certaines conditions analytiques (pH acide et absence d'amines primaires) avec les amines aromatiques et secondaires comme la proline [8] ; de plus, l'excès de fluorescamine dans le milieu réactionnel est rapidement hydrolysé ($t_{1/2}=5-10$ s) [9]. L'avantage de cette molécule est que ni elle, ni ses produits d'hydrolyse ne sont fluorescents. L'instantanéité de la réaction de condensation avec les amines primaires rend intéressante la fluorescamine pour le dosage des amines biogènes et des protéines [10,11]. En effet, elle est généralement utilisée pour la détection des traces de résidus organiques aminés de faible poids moléculaire par spectrofluorimétrie simple, par CLHP [12] ou par électrophorèse capillaire [13]. Les dérivés aminés de la fluorescamine (pyrrolinone) sont excitables vers 390 nm et émettent entre 475-490 nm [1,6,7,8,14,15].

Pour ce qui concerne l'analyse de l'histamine, des études par CLHP couplées à une détection fluorimétrique ont été réalisées [15-19]. Il a été montré que l'histamine forme avec la fluorescamine un dérivé fluorescent émettant autour de 460 nm en solution aqueuse. Ces études ont donné malgré le caractère complexe de ce fluorophore en solution aqueuse des limites de quantification autour de 0,5 ppm et un taux de récupération de près de 95% [16,17]. Toutefois, la stabilité du fluorophore et donc la sensibilité de la méthode reste à améliorer ; étant donné que la fiabilité de l'analyse de trace d'histamine dans certains produits et dans les liquides physiologiques nécessite des limites de détection plus basses et une relative stabilité du complexe fluorophore.

I.A.2.2. L'OPA et le NDA

Le 1,2-benzènedicarboxaldehyde (OPA, $C_8H_6O_2$) et le naphthalène-2,3-dicarboxaldehyde (NDA, $C_{12}H_8O_2$) sont comme la fluorescamine des sensibilisateurs non fluorescents. Ils réagissent avec les amines primaires et secondaires pour donner des dérivés fluorescents [20,21] ; cette réaction n'est pas instantanée, mais il est possible d'augmenter la réactivité en la faisant en présence des ions cyanures (CN^-) ou des thiols comme le β -mercaptoéthanol ($HSCH_2CH_2OH$) ou l'acide 3-mercaptopropionique ($HSCH_2CH_2COOH$) ou des sulfites (SO_3^{2-}) [22] (fig. I.3).

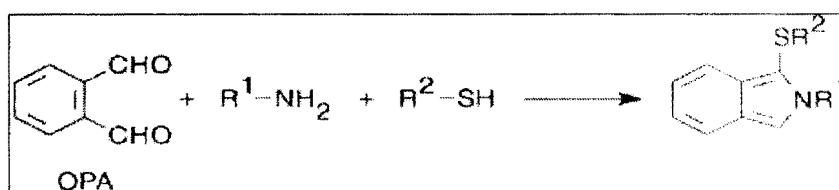


Fig. I.3. Schéma réactionnel de l'OPA avec les amines.

La réaction de condensation du NDA avec les composés aminés est identique à celle de l'OPA et se fait généralement en présence des ions cyanures pour augmenter sa réactivité (Fig. I.4).

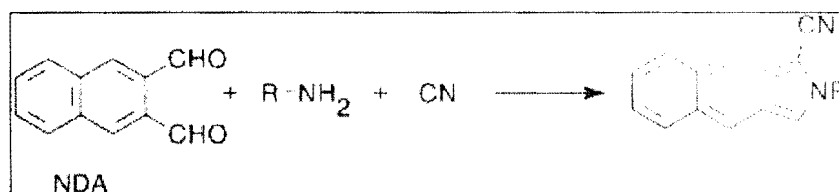


Fig. I.4. Schéma réactionnel du NDA avec les amines.

Une modification des conditions opératoires (par exemple amine en excès, et absence d'autre nucléophile) permet de détecter avec ce sensibilisateur les acides carboxyliques et les thiols, mais aussi des ions cyanures dans le sang et les urines [23,24]. Il est aussi possible en l'absence d'autres nucléophiles dans le milieu réactionnel de doser l'hydrazine (H_2NNH_2) et l'hydrazine méthyli ($\lambda_{ex} / \lambda_{em} \approx 403 / 500 \text{ nm}$) [25]. Les dérivés aminés de la NDA émettent pour des longueurs d'ondes plus grandes que ceux obtenus avec l'OPA. En plus, l'utilisation de la NDA donne une plus grande

sensibilité pour le dosage des composés aminés. La stabilité des dérivés aminés du NDA fait de ce sensibilisateur un outil très efficace pour la recherche [21]. L'OPA et la NDA sont largement utilisés pour une dérivation post et pré-colonne des composés aminés et des thiols en CLHP [26,27].

Pour ce qui concerne l'analyse de l'histamine, nous n'avons pas trouvé de travaux ayant utilisés la NDA comme sensibilisateur. En revanche, pour l'OPA, la première étude a été décrite par Shore dès 1959 [28]. Cette méthode a été depuis lors, perfectionnée puis automatisée à partir de 1972, mais la séparation des autres molécules interférentes (histidine surtout) avec l'histamine est très délicate.

La méthode est facile à mettre en œuvre : la réaction entre l'histamine et l'OPA se fait en milieu alcalin, puis 4 à 5 min après la solution est acidifiée dans le but de stabiliser le fluorophore formé. Après 25 min d'attente, le signal de fluorescence est mesuré.

Le complexe histamine-OPA a été à l'origine de nombreux travaux. La méthode a largement servi pour la détermination de la teneur en histamine des produits halieutiques et dérivés à travers le monde. Elle est aussi utilisée dans le domaine médical. Ainsi, la détermination de la teneur en histamine dans le sang a permis de faire une corrélation avec l'acidité du suc gastrique car la libération en excès d'histamine ou l'intoxication en histamine entraîne la stimulation du récepteur H₂ qui a pour conséquence immédiate une sécrétion de l'acide chlorhydrique au niveau du suc gastrique. De même, une étude comparative chez des personnes saines et des patients de la teneur en histamine dans les larmes et dans les muqueuses nasales a permis de percevoir le rôle de l'histamine, respectivement dans la conjonctivite et dans certains cas de rhume [29].

En dépit de toutes ces applications et les résultats importants obtenus, la stabilité du fluorophore histamine-OPA reste toujours à améliorer car, même après la phase d'acidification suivie de 25 min d'attente, le signal n'est pas réellement stable. De plus cette durée constitue un temps considérable pour l'analyse d'un échantillon réel. Ainsi,

des travaux récents [30] amènent à se poser des interrogations sur la fiabilité des études anciennes.

I.A.2.3. Le chlorure de Dansyl et autres chlorures

Le chlorure 5-diméthylaminonaphthalène-1-sulfonyl, (ou chlorure de dansyl, $C_{12}H_{12}ClNO_2S$), le chlorure 1-pyrenesulfonyl et le chlorure dapoxyl sulfonyl (Fig. I.5) réagissent avec les amines primaires par substitution d'un atome de chlore (Fig. I.6). La réactivité de ces sensibilisateurs peut être augmenté en employant le cycloheptaamylose ou β -cyclodextrine, [31].

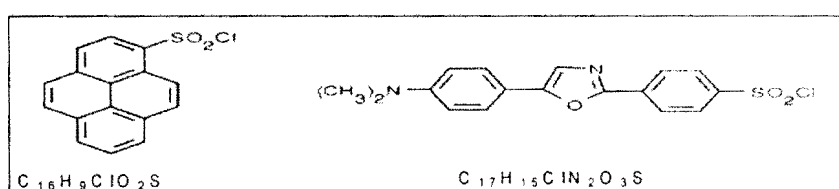


Fig. I.5. Le chlorure 1-pyrenesulfonyl (gauche) et le Chlorure de Dapoxyl sulphonyl (droite).

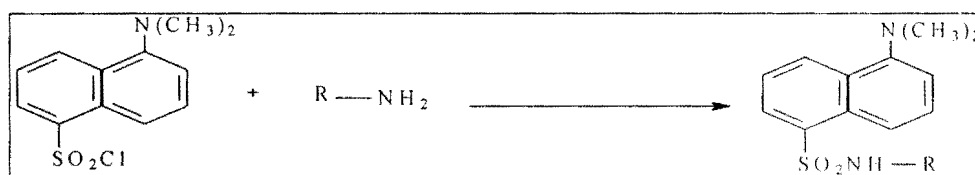


Fig. I.6. Schéma de la réaction du chlorure de dansyl avec les amines.

Par mis ces sensibilisateurs, le chlorure de dansyl est le plus utilisé depuis sa découverte en 1951 par Weber [31]. Il a servi pour la détection d'acide aminé N-terminal mais surtout pour former des dérivés fluorophores dans le dosage de substances aminés (drogues, acides aminés, oligonucléotides et protéines) [32]. Il est non fluorescent mais conduit avec les amines à un dérivé fluorescent avec un grand déplacement de Stokes. Le dérivé formé est relativement stable mais ce réactif n'est pas spécifique aux amines primaires (réagit aussi avec les amines secondaires, les thiols et les alcools), d'où la nécessité de séparer

les dérivés formés avec les impuretés interférentes par des méthodes chromatographiques ou par électrophorèse capillaire.

Pour ce qui concerne l'analyse de l'histamine, des tentatives dans notre laboratoire nous ont montré que la formation du dérivé fluorescent est très laborieuse, le temps de réaction est très long et nécessite une température élevée.

I.A.2.4. Les dérivés NBD

Le 4-chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (ou chlorure de NBD, $C_6H_2ClN_3O_3$) est introduit en 1968 comme marqueur fluorogénique des composés aminés [33] à des longueurs d'ondes d'excitation (470-480 nm) et d'émission (530-560 nm). Il réagit aussi avec les thiols et les alcools. L'avantage du chlorure de NBD est que les dérivés formés avec les thiols et les alcools absorbent et émettent à des longueurs d'ondes plus petites que les dérivés aminés et ils sont moins fluorescents que ces derniers [34].

Le 4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (ou fluorure de NBD) donne le même dérivé que le chlorure de NBD (Fig. I.7), mais l'avantage du fluorure de NBD est que la réaction est plus rapide [35]; avec la glycine la réaction est 500 fois plus rapide qu'avec le chlorure de NBD [36].

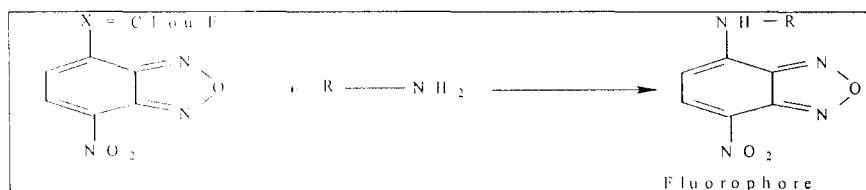


Fig. I.7. Schéma de la réaction du chlorure ou du fluorure de NBD avec les amines.

Le spectre d'émission et d'excitation, le rendement quantique de fluorescence et le coefficient d'extinction molaire des dérivés aminés du NBD dépendent fortement du solvant [37]. A la température ordinaire le rendement quantique dans l'eau est très faible ($<0,01$), particulièrement

pour les amines secondaires; les dérivés des amines aromatiques quant à eux ne sont pas du tout fluorescents.

Ces deux sensibilisateurs ont été largement utilisés (en fluorimétrie, en chromatographie et en électrophorèse capillaire) pour l'analyse de composés aminés.

Avec l'histamine, des essais dans notre laboratoire ont montré que la méthode est un peu pénible car la réaction est très lente, et nécessite un chauffage (70 °C pendant 30 min).

I.A.3. Effets du solvant sur la fluorescence

I.A.3.1. Les différents types de solvant

Il existe deux grandes classes de solvant (solvant aprotique et protique), pour lesquelles nous avons deux paramètres (ϵ et μ) très importants permettant de déterminer leurs propriétés en fluorimétrie.

Les solvants aprotiques sont séparés en deux catégories: les solvants aprotiques apolaires (ϵ et μ faibles) et aprotiques polaires (ϵ et μ élevés). Dans ces solvants tous les hydrogènes sont liés à des atomes de carbone alors que dans les solvants protiques, certains atomes d'hydrogènes sont liés à un hétéroatome tel que O, N, S, etc. Les solvants protiques sont capables de former des liaisons hydrogène ou de protonner les anions car, ils sont très ionisants.

Les tableaux suivants classent les différents solvants en fonction de leur constante diélectrique (ϵ) et de leur moment dipolaire (μ) en debye.

Tab. I.1. Constante diélectrique (ϵ) et moment dipolaire (μ) de quelques solvants protiques à la température de 25 °C.

Solvants protiques		
Solvants	ϵ (25°C)	μ
Acide acétique	6,15	1,68
Pentan-3-ol	13,0	1,65
Cyclohexanol	15,0	1,86
Propan-2-ol	18,3	1,65
Ethanol	24,5	1,74
Diéthylèneglycol	31,7	2,31
Méthanol	32,7	1,76
éthylèneglycol	37,7	2,28
Eau	78,54	1,80

Tab. I.2. Constante diélectrique (ϵ) et moment dipolaire (μ) de quelques solvants aprotiques à la température de 25 °C.

Solvants aprotiques					
Solvants aprotiques apolaires			Solvants aprotiques polaires		
Solvants	ϵ (25°C)	μ	Solvants	ϵ (25°C)	μ
n-héxane	1,88	0,00	Pyridine	12,4	2,37
Cyclohexane	2,02	0,00	Butan-2-one	18,5	5,22
1,4-dioxane	2,21	-	Acétone	20,7	2,86
CCl ₄	2,24	0,00	Ac ₂ O	20,7	2,82
Benzène	2,28	0,00	(Me ₂ N) ₂ CO	23,5	3,48
Cl ₂ C=CCl ₂	2,30	0,00	PhCN	25,2	4,05
Toluène	2,38	0,43	CH ₃ CH ₂ CN	27,2	3,57
CS ₂	2,64	0,00	HMPA	29,6	5,55
Cl ₂ C=CHCl	3,42	0,81	PhNO ₂	34,8	4,02
Et ₂ O	4,34	1,30	MeNO ₂	35,9	3,57
Chloroforme	4,81	1,15	DMF	37,71	3,87
PhBr	5,40	1,55	MeCN	37,5	3,45
PhCl	5,62	1,54	Sulfolane	43,3	4,80
CH ₃ CO ₂ Et	6,02	1,88	DMSO	46,7	3,90
DME	7,20	1,71	HCONH ₂	111	3,36
THF	7,58	1,75	HCONHMe	182,4	3,87
CH ₂ Cl ₂	8,93	1,55	CH ₃ CONHMe	191,3	4,38
Cl ₂ CHMe	10,00	1,98			
ClCH ₂ CH ₂ Cl	10,36	1,86			

Dans un solvant, qu'il soit protique ou aprotique un fluorophore est considéré comme un dipôle de moment dipolaire μ_i se trouvant dans un

milieu continu isotrope d'indice de réfraction n et de constante diélectrique ϵ . La cavité contenant le fluorophore peut être sphérique de rayon a ou ellipsoïdale suite aux interactions avec les molécules du solvant [1]. Ces interactions se traduisent par un déplacement de la bande d'émission en fonction du solvant (effet solvatochromique) ou par une exaltation ou inhibition de l'intensité du signal (effet hyperchromique ou hypochromique).

I.A.3.2. Effet solvatochromique d'un solvant

La polarité du solvant affecte profondément le spectre d'émission d'un analyte fluorophore polaire avec pour conséquence immédiate un déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde (faibles énergies) des bandes d'émission et/ou d'excitation. Cette baisse d'énergie constatée résulte d'une variété de processus dynamique ayant lieu après l'absorption. Le fluorophore excité a généralement un moment dipolaire plus grand (μ_E) que dans son état fondamental (μ_G). Après excitation du fluorophore, le solvant réoriente le moment dipolaire μ de ses molécules autour du moment dipolaire du fluorophore excité μ_E , engendrant ainsi un abaissement de l'énergie de celui-ci. Ceci conduit à l'émission de photon de grandes longueurs d'ondes, c'est à dire de faible énergie [1].

Le processus de déplacement des maximums des bandes d'émission et d'excitation en fonction du solvant, est un problème complexe car, en plus de l'effet général du solvant (décrit à l'aide de l'équation de Lippert), il y a les effets spécifiques liés aux propriétés intrinsèques du fluorophore et de l'environnement (liaisons hydrogène, transfert d'énergie, etc.) [1].

Dans la théorie générale de l'effet du solvant décrit par Lippert, l'effet solvatochromique d'un solvant dépend du moment dipolaire μ du soluté, de la constante diélectrique ϵ du solvant qui caractérise le déplacement électronique au sein des molécules du solvant et l'orientation du moment dipolaire de ces dernières dans la même direction que celui du fluorophore excité et de l'indice de réfraction n du milieu. En

schématisant le processus de l'excitation et de l'émission d'un fluorophore dans un solvant donné (Fig. I.8), il est possible d'établir la formule de Lippert donnant une relation entre le déplacement de Stokes et les propriétés du solvant (ϵ , n) et du fluorophore (μ_G , μ_E et a).

μ_G et μ_E : sont les moments dipolaires du fluorophore respectivement à l'état fondamental et à l'état excité dans un solvant donné.

a : représente le rayon de la cavité logeant le fluorophore dans ce solvant.

E_V^G et E_V^E : sont les niveaux énergétiques du fluorophore respectivement à l'état fondamental (G) et à l'état excité (E) dans un état de vapeur, c'est à dire sans aucune interaction.

R_{el}^G, R_{el}^E et R_{or}^G, R_{or}^E : sont les champs électriques induits à l'état fondamental et à l'état excité, respectivement lors de la transition électronique (el) et lors de la réorganisation ou orientation (or) des molécules du solvant.

$$E^G(\text{absorption}) = E_V^G - \mu_G R_{or}^G - \mu_G R_{el}^G \text{ et } E^E(\text{absorption}) = E_V^E - \mu_E R_{or}^G - \mu_E R_{el}^G$$

$$E^G(\text{émission}) = E_V^G - \mu_G R_{or}^E - \mu_G R_{el}^E \text{ et } E^E(\text{émission}) = E_V^E - \mu_E R_{or}^E - \mu_E R_{el}^E$$

Calculons la variation d'énergie pour l'absorption et l'émission:

$$\Delta E(\text{absorption}) = E^E(\text{absorption}) - E^G(\text{absorption})$$

$$\Delta E(\text{émission}) = E^E(\text{émission}) - E^G(\text{émission})$$

Après résolution on a :

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2\Delta f}{hc a^3} (\mu_E - \mu_G)^2 + \text{constante} \quad \text{avec} \quad \Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad \text{décrivant}$$

l'orientation de la polarisabilité du solvant c'est à dire sa polarité qui gouverne la relaxation des molécules du solvant autour du fluorophore excité. On retrouve ainsi l'effet solvatochromique qui est décrit par l'équation empirique de Lippert. C'est l'une des conséquences immédiates du solvant sur un fluorophore.

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{constante} \quad (6)$$

Ainsi, les fluorophores non polaires ($\mu_E = \mu_G = 0$) engendrent de faible déplacement spectral contrairement au fluorophore polaire ($\mu_E > \mu_G$).

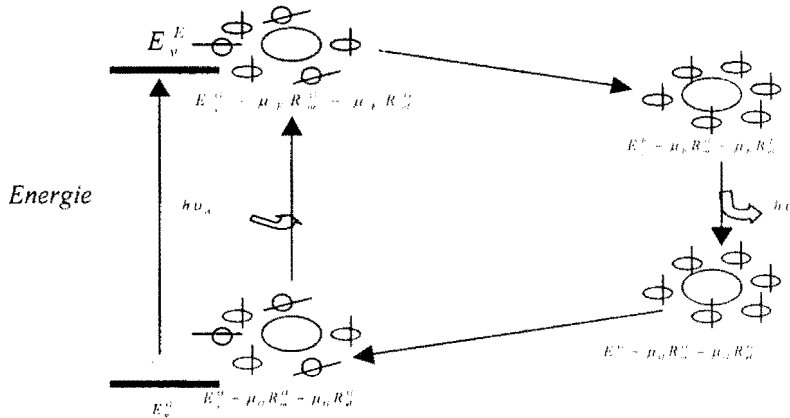


Fig. I.8. Effet d'un solvant sur l'émission de fluorescence d'un fluorophore.

I.A.3.3. Effet hyperchrome et hypochrome du solvant

La désactivation radiative par fluorescence résulte d'un couplage entre la molécule fluorophore excitée et l'onde électromagnétique émise (radiation lumineuse). Les caractéristiques de cette onde sont fonction du fluorophore mais aussi des propriétés optiques de son environnement (solvant) ; ce qui fait que la durée de vie et le rendement quantique dans un solvant sont différents de ceux dans le vide qui dépendent des seules propriétés intrinsèques du fluorophore.

Les effets d'exaltation et d'inhibition du signal de fluorescence par le solvant, bien que longtemps abordée par des chercheurs est encore mal connue. La première formule théorique relatant cet effet est publié par Perrin en 1926. Cette formule lie l'indice de réfraction (n) du milieu à la constante de désactivation radiative du fluorophore excité [1,38].

$$k_f = \frac{1}{\tau_0} = \frac{8\pi n^2}{c^2} \nu_m^2 \frac{1}{N} \int \alpha(\nu) d\nu \quad (7)$$

Dans cette formule;

n : indice de réfraction du milieu
 ν_m : fréquence principale de l'émission de fluorescence
 N : nombre de molécules fluorescentes
 $\alpha(\nu)$: coefficient d'absorption à la fréquence ν
 τ_0 : durée de vie du fluorophore à l'état excité
 C : la vitesse de la lumière dans le vide

Cette formule n'étant pas très précise notamment en ce qui concerne les molécules présentant un grand déplacement de Stokes, elle fut corrigée par celle donnée en 1962 par Strickler et Berg [38]:

$$k_f = \frac{1}{\tau_0} = \frac{8\pi n^2}{c^2} \langle \bar{\nu}_f^3 \rangle_{Av}^{-1} \frac{\ln(10)}{N_A} \int \frac{\varepsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (8)$$

ν_f : fréquence de l'émission de fluorescence

$\bar{\nu}_f$: nombre d'onde

$\langle \bar{\nu}^3 \rangle_{Av} = c^3 \times \langle \bar{\nu}^3 \rangle_{fcf}$ (Facteur de Franck - Condon)

Dans le cas pratique de l'émission spontanée :

$$k_f = \Gamma = f^2 n \Gamma_0, \text{ avec } \Gamma_0 = \frac{64\pi^4}{3h} |\mu_{01}|^2 \langle \bar{\nu} \rangle_{fcf} \quad (9)$$

Avec Γ_0 : la constante de désactivation radiative dans le vide : cette grandeur dépend uniquement des propriétés intrinsèques du fluorophore et f est une fonction de la cavité logeant le fluorophore dans le solvant. Toutes ces différentes formules traduisent l'effet de la nature du solvant sur la sensibilité de la mesure à effectuer.

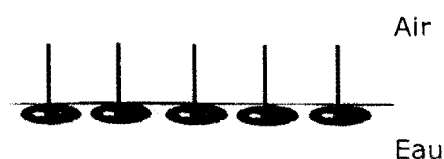
Il est donc possible, en jouant sur le solvant, d'augmenter la sensibilité d'une mesure fluorimétrique.

I.A.4. Effet des micelles sur la fluorescence

I.A.4.1. Molécule tensioactive

Une molécule tensioactive ou amphiphile est une molécule constituée d'une tête polaire hydrophile et d'une queue apolaire hydrophobe. Dans un milieu aqueux (polaire), elle oriente sa tête polaire en contact des molécules d'eau et sa queue hydrophobe flottant dans l'air ou dans une solution non polaire. La présence de ces molécules à cette surface, perturbe l'énergie surfacique, avec pour conséquence un abaissement de

la tension de surface c'est pourquoi on les appelle molécules surfaces actives ou surfactants.



Tab. I.3. Structures et propriétés des molécules tensioactives.

Parties	Partie hydrophile ou lipophile	Partie lipophile ou hydrophobe
Polarité	Polaire	Apolaire
Composition	Groupe carboxylate $-\text{COO}^-$, sulfonate $-\text{S}(\text{O}_2)\text{O}^-$,	Longue chaîne carbonée saturée $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ou partiellement insaturée $-\text{CH}=\text{CH}-$
Attirée par des composés	polaires, comme l'eau et les solutions aqueuses	apolaires, comme les graisses ou les solvants organiques

Lorsque la concentration de molécules tensioactives devient importante, il y a formation d'agrégat aboutissant à une autre organisation appelée micelle. L'association de ces molécules tensioactives en agrégat de micelle est favorisée entre autres, par l'action combinée de trois facteurs:

- Les interactions répulsives hydrophobes entre les queues non polaires des monomères et l'environnement aqueux;
- Les répulsions entre les têtes ioniques;
- Les attractions de Van Der Waals entre les chaînes alkyles.

I.A.4.2. Structure des micelles

Dans les solvants polaires tel que l'eau il se forme des micelles directes; les têtes polaires des molécules tensioactives sont orientées vers l'extérieur en contact des molécules du solvant alors que les queues hydrophobes forment une cavité capable ainsi de solubiliser de nombreux solutés hydrophobes.

Dans les solvants apolaires tels que les huiles nous avons des micelles inverses : les queues hydrophobes sont orientées à l'extérieur en contact

des molécules du solvant alors que les têtes polaires forment une cavité hydrophile, apte à solubiliser des solutés hydrophiles. Dans les deux cas, les micelles formées sont soit de formes sphériques ou ellipsoïdales (fig. I.9).

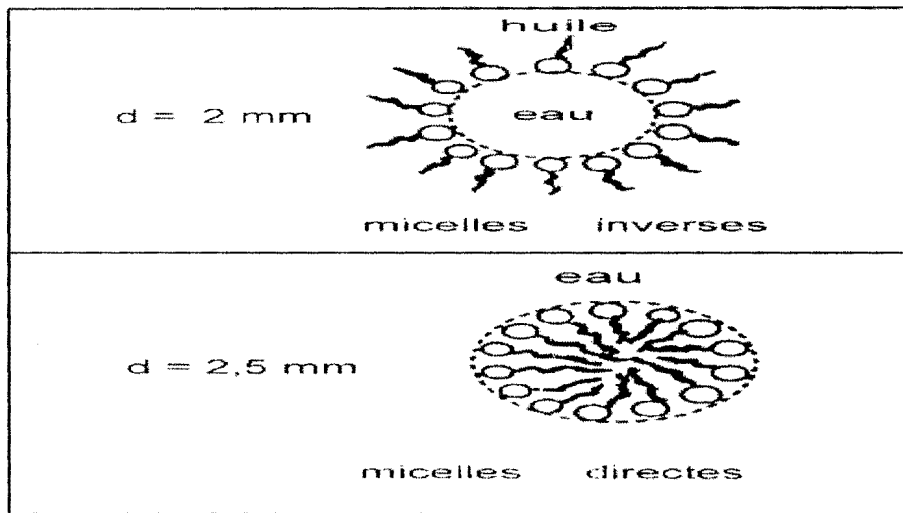


Fig. I.9. Structure d'une micelle directe ou inverse.

I.A.4.3. La concentration micellaire critique (cmc)

La concentration micellaire critique est la concentration minimale de monomères tensioactifs nécessaire pour produire une micellisation pour laquelle la tension de surface reste constante.

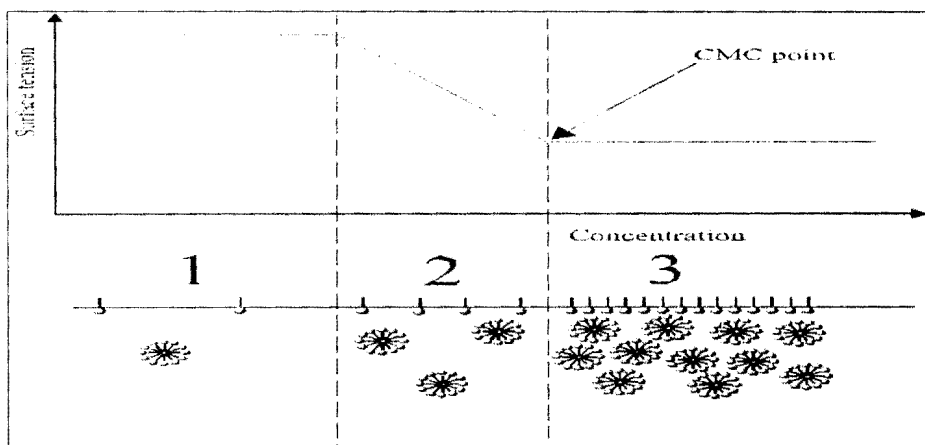


Fig. I.10. Effet de la concentration micellaire sur la tension de surface.

L'ajout de molécules tensioactives dans une solution présente 3 phases (fig.I.10):

❖ La première phase (1): montre qu'à faible concentration de monomères tensioactifs la tension de surface reste pratiquement constante.

❖ La deuxième phase (2) : montre que la tension de surface décroît avec la concentration de surfactants jusqu'à une concentration limite appelé concentration micellaire critique (cmc).

❖ La troisième phase (3): indique, qu'au-delà de la cmc, la tension de surface reste constante quelle que soit la concentration de surfactants ajoutée. Ainsi, les propriétés physiques d'une solution micellaire deviennent donc invariables dès qu'on atteint la concentration micellaire mais cela n'empêche pas la formation d'autres agrégats. Il est donc souhaitable d'utiliser en fluorimétrie des concentrations plus importantes que la cmc afin d'obtenir une population micellaire plus importante.

I.A.4.4. Effets micellaires

La fluorescence, comme nous l'avons vu, est un processus compétitif de désactivation de l'état excité d'un fluorophore. Ainsi, le rendement quantique de fluorescence dépend largement de la protection de l'état excité contre les autres processus concurrents de désactivation. A cet effet, plusieurs solvants appelés milieux organisés ont été utilisés (solutions tensioactives et les dérivés cyclodextrines). Dans une solution micellaire, par exemple en milieu polaire, le fluorophore reste à l'extérieur dans la phase polaire prédominante s'il est lui-même polaire, avec pour conséquence un effet micellaire minimal ; tandis qu'un composé apolaire est rapidement encapsulé dans la cavité hydrophobe protégeant le fluorophore excité contre les autres processus de désactivation. Ce fait aura pour conséquence immédiate une exaltation du signal de fluorescence.

Le fluorophore sera adsorbé à la surface interne s'il présente une partie polaire et une autre partie apolaire [39-41]. Il est donc souhaitable d'utiliser des solutions micellaires de 3 à 5 fois supérieures à la

concentration micellaire critique afin d'accroître la concentration des micelles par conséquent l'encapsulation ou l'adsorption des molécules fluorophores selon leurs natures.

Pour un emploi efficace des micelles il faut aussi tenir compte de la polarité du solvant et des micelles mais aussi du pH car il peut influencer sur le processus de micellisation et sur le comportement des micelles vis-à-vis d'un fluorophore.

Dans ce travail nous avons utilisé 3 types de micelles: le CTAC, le SDS et le Brij-700 dont les propriétés ont été décrites dans la partie expérimentale (II.A.4.) de ce document.

I.B. Production et mode d'action d'histamine

L'histamine est une substance chimique largement étudiée mais qui jusque là présente encore des contours non élucidés, notamment son rôle exact dans l'organisme, son degré de toxicité et la recherche d'une méthode efficace de son dosage. Elle présente un enjeu sanitaire et économique énorme.

Une recherche rapide sur l'histamine (0,24s ; Google.com) sur le réseau Internet présente 635.000 liens dont 96.600 parlent de sa toxicité. Cela démontre l'intérêt général accordé à cette substance.

I.B.1. Production de l'histamine

L'histamine ($C_5H_9N_3$) est une amine biogène obtenue par la décarboxylation enzymatique de la L-histidine libre (acide aminé naturel) sous l'effet de la L-histidine décarboxylase (Fig. I.11) [42].

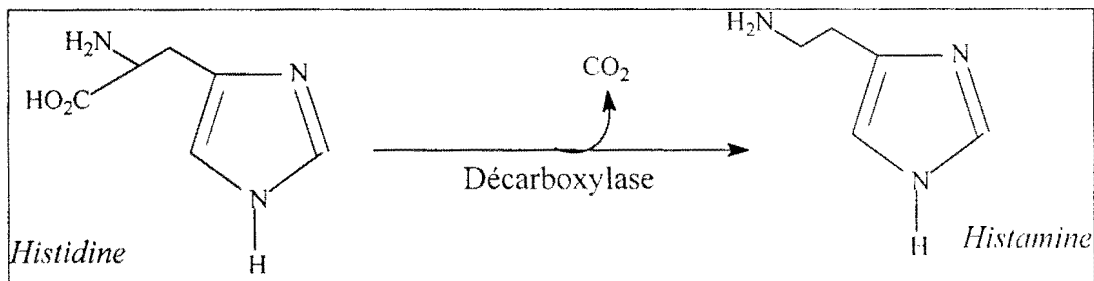


Fig. I.11. Formation de l'histamine à partir de l'histidine.

C'est donc une substance naturelle présente dans les produits halieutiques et leurs dérivés (poissons, mollusques, crustacées) [42-47] et en général chez tous les mammifères (dans tous les tissus à l'état normal) [48,49]. On le rencontre aussi dans les fruits (fraise, ananas, banane, papaye, etc.), dans les légumineuses (pois, soja, lentille, fève, arachide, tomate, etc.), dans le chocolat et certains fromages (Rocquefort, Guyere, etc.) [43], dans les œufs (jaune d'œuf).

Chez l'homme les tissus les plus riches en histamine sont le foie, les poumons et la peau. La teneur en histamine est relativement faible chez une personne saine (autour de 1 $\mu\text{g/l}$ de plasma), mais très importante

chez une personne malade ; dans certains cas chez un asthmatique elle varie entre 10 et 100 µg/l de plasma [50].

Chez l'homme l'histamine est fabriquée par des cellules appartenant à une certaine catégorie de globules blancs (les polynucléaires basophiles et les mastocytes) au sein desquels elle est stockée dans des granulations où elle est libérée dans certaines conditions à but régulatrice ou dans des phénomènes d'allergies. Dans ce dernier cas, le système immunitaire réagit de manière anormale face une substance appelée allergène (pollen, poussière, médicament, etc.) en libérant de l'histamine [42,49].

Dans les produits halieutiques l'histamine provient également de la décarboxylation enzymatique de l'histidine sous l'effet de la décarboxylase produite par certains microbes (*klebsiella pneumoniae*) lors de la décomposition du produit (poisson par exemple) [48]. Ici, la teneur en histamine produite dépend de la température, de la classe microbienne présente et de la nature du produit. Ainsi, les principales familles de poissons responsables de l'intoxication à l'histamine sont les clupéidés (hareng, sardine) et les coryphénidés (mahi-mahi ou *coryphaena hippurus* (dauphin)) [49].

I.B.2. Mode d'action de l'histamine

Dans l'organisme, à l'état normal, l'histamine libérée à faible dose joue le rôle de médiateur chimique du système nerveux où elle assure un rôle de régulation, du système nerveux central et périphérique, du système immunitaire, du cœur, des vaisseaux sanguins, etc. [42].

Lors des phénomènes d'allergies ou dans des cas d'intoxication par consommation de produits riches en histamine, cette dernière diffuse rapidement dans les tissus environnants gagnant en 2 min le sang. Elle se fixe sur des récepteurs histaminiques (H1, H2, H3, H4). Ces récepteurs sont des glycoprotéines présentes dans les membranes cellulaires. Les récepteurs histaminiques les plus connus sont le H1 (stimulation de la phospholipase C) découvert il y a plus de 50 ans et le H2 (stimulation de l'adénylcyclase) découvert en 1972. Le récepteur H1 se situe au niveau

des bronches, de la peau et des capillaires. La stimulation de H1 se traduit par une contraction des muscles, un accroissement de la perméabilité vasculaire (rougeur) et des démangeaisons. Le récepteur H2, lui, est situé aux mêmes endroits mais surtout au niveau de l'estomac, son activation se traduit par une hypersécrétion d'acide gastrique et une diminution de la sécrétion de la muqueuse des voies respiratoires et en même temps entraîne une contraction de l'œsophage. Une description plus détaillée des effets de l'activation de ces deux récepteurs (H1 et H2) se trouve dans le tableau suivant (Tab. I.4). Le récepteur H3 découvert en 1983 par l'équipe française de J. C. Schwartz se situe au niveau du tissu neural et du poumon où il joue un rôle très important dans la libération d'histamine au niveau du système nerveux central et périphérique (stimulation de la vigilance). Le récepteur H4 découvert récemment reste à approfondir car ses propriétés ne sont pas encore totalement définies. Il reste également à définir clairement le rôle de l'histamine dans les réactions immunitaires, son rôle comme messenger intercellulaire et son rôle probable dans la croissance cellulaire.

Tab. I.4. Principaux effets H1 et H2 de l'histamine.

Effets de l'Histamine		
Récepteurs	H1 (par stimulation de la phospholipase C)	H2 (par stimulation de l'adénylcyclase)
Cœur	Ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire	Inotrope positif Chronotrope positif (effet sinusal)
Vaisseaux	Dilatation (rapide et fugace) Coronaires : constriction.	Dilatation (durable) Coronaires : dilatation.
Fibres lisses	Contraction	Relâchement
Sécrétion gastrique		Augmentation de la sécrétion de HCl
Allergie	Augmentation de la perméabilité capillaire	Effet immunorégulateur probable
Système nerveux central	Stimulation de la vigilance Diminution de l'appétit	Hyperpolarisation cellulaire

L'aggravation de tous ces effets observés ci dessus (sensation de chaleur, céphalée, tachycardie, collapsus, œdèmes, bronchoconstriction, inflammation et anaphylaxie, ulcère de l'estomac, vomissement, crampe, diarrhée, etc.) peuvent conduire dans certains cas à la mort [42,49,].

Fort heureusement lorsque l'histamine est libérée dans l'organisme, 2 à 3% sont excrétés intactes dans les urines, et une partie est métabolisée sous forme de méthyl-histamine (50 à 70%) sous l'effet de l'enzyme méthyle transférase et le reste se transforme en acide imidazole acétique (30 à 40%) sous l'effet de la diamine oxydase ou histaminase (Fig. I.12) [50-52].

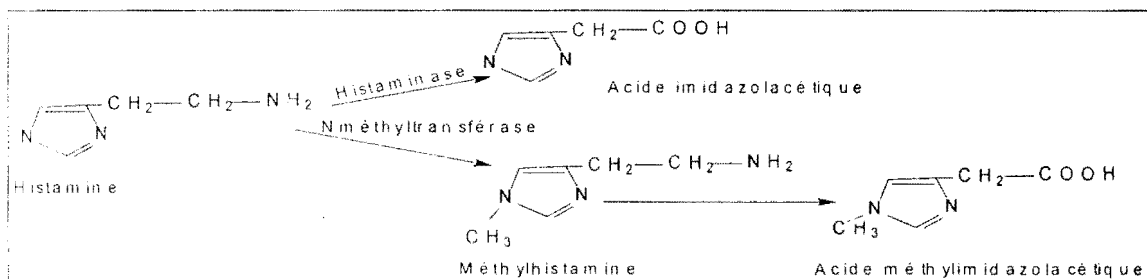


Fig. I.12. Réaction de métabolisme de l'histamine dans l'organisme.

Dans des cas graves d'allergie ou d'intoxication alimentaire où l'organisme n'arrive plus à réguler la teneur d'histamine libérée ou ingérée, la prise d'antihistaminique est incontournable. Les premiers antihistaminiques furent proposés, il y a plus de 60 ans. La première démarche était d'empêcher la libération de l'histamine par des antihistaminiques inhibant la libération au niveau des leucocytes basophiles. Ces médicaments ne sont pas très efficaces car ils freinent uniquement la production de l'histamine, d'où l'intérêt de s'attaquer à la source de la stimulation des récepteurs (H1, H2) dans le but d'éviter toute manifestation allergique, cela en injectant dans l'organisme des molécules qui ont la même affinité que l'histamine pour ces récepteurs mais n'ayant pas les mêmes effets. Ces molécules se fixent de façon compétitive pour éviter que l'histamine se fixe. Les médicaments de 1^{ère} génération (1^{er} test en 1940) ont l'azote du fragment moléculaire alkylé. C'est le cas de la

prométhazine et de la buclizine mais l'inconvénient de ces antihistaminiques est qu'ils n'agissent que sur l'effet vasodilatateur et l'augmentation de la perméabilité capillaire à l'origine des réactions œdémateuses. Ils ne s'opposent pas aux réactions antigène/anticorps, ni à la libération d'histamine. En plus, ils présentent des effets secondaires graves car la plupart passent la barrière hématoencéphalique entraînant une action sédatrice et hypnotique. Les antihistaminiques H1 de 2^{ème} génération font de l'azote une partie intégrante de la pipérazine et de la pipéridine, leurs seuls avantages par rapport à la 1^{ère} génération est qu'ils ne présentent pas d'effets secondaires. Afin de prendre en compte les effets des récepteurs H2, les chercheurs ont mis au point de nouveaux antihistaminiques qui ont une très grande ressemblance avec l'histamine (noyaux imidazole) mais se lient plus fortement sur le récepteur H2. Le premier fut la burinamide, puis suivront d'autres antihistaminiques H2 car ce premier a le défaut de ne pas être administrable oralement. Pour le récepteur H3, le premier médicament est la thio-péramide (1990).

En plus de ces antihistaminiques, il est possible dans le cas de l'allergie d'avoir recours à la méthode dite de désensibilisation, qui consiste à induire une tolérance progressive des patients vis à vis de l'allergène mis en cause. Mais la réussite de ce traitement n'est pas systématique c'est pourquoi de nos jours l'emploi des antihistaminiques s'est largement généralisé.

Tous ces antihistaminiques ont été mis à jours grâce aux différentes méthodes de dosage de l'histamine et de ces différents métabolites qui ont permis en partie de mieux cerner son rôle dans le mécanisme de l'allergie et de l'intoxication scombroid.

I.B.3. Les méthodes de dosage de l'histamine

De nombreuses méthodes de dosage de l'histamine furent proposées tant dans les liquides physiologiques (sang, urine, larmes, suc gastrique) que dans les sources d'intoxications externes notamment les produits halieutiques et dérivés, qui sont en fait les principales sources de

protéines de la population mondiale. Ainsi, chaque année de nombreux cas d'intoxication à l'histamine sont relevés à travers le monde suite principalement à la consommation des poissons de la famille des scombridés et des scombrésocidés (thon, bonite, et maquereau) qui ont donné leurs noms à la désignation médicale de l'intoxication à l'histamine (intoxication scombroid) et d'autres familles telles que les clupéidés (hareng, sardine) et les coryphénidés (mahi-mahi ou *coryphaena hippurus* (dauphin)) [53]. Une étude de l'agence australienne pour la sécurité alimentaire a montré que 3,5 % des poissons (soit 1/29) et 14,3% (soit 1/7) des produits dérivés contiennent de l'histamine [47], d'où la nécessité d'une réglementation plus sévère en vue de prévenir les intoxications alimentaires collectives.

Les teneurs en histamine des produits varient entre 50, 100 et 200 µg/g de produit selon les espèces. Par exemple le mahi-mahi, à la température ambiante, peu après la capture peut avoir dans certains cas une teneur en histamine dépassant 100 µg/g. La réglementation fixant la dose de tolérance varie aussi selon les régions, car certaines zones ont développé une immunité naturelle plus importante à l'histamine que d'autres, notamment les populations d'Asie qui par leurs habitudes alimentaires, basées sur une alimentation riche en histamine, supportent plus l'effet de ce dernier [53].

Dans le but de sécuriser la consommation de ces produits histamino-producteurs, de nombreuses méthodes d'analyses ont été mises au point [53-58] depuis la découverte de l'histamine en 1916. Un intérêt particulier a été apporté à la détermination d'un indicateur chimique pouvant permettre de doser la teneur en histamine dans de nombreuses matrices, soit de façon directe (détermination directe de la teneur d'histamine) ou de façon indirecte en essayant de faire une corrélation entre cet indicateur et la teneur en histamine de l'échantillon.

I.B.3.1. Méthodes de dosage indirectes

Il est clairement démontré que l'histamine est produite pendant la période post mortem par action microbienne. Cela entraîne en plus de la toxicité, une altération du produit. Il arrive ainsi de confondre le degré de toxicité d'un échantillon et son degré d'altération bien qu'ils ne soient pas toujours liés. Le premier renseigne sur la présence de substances nocives tels que l'histamine, les toxines, les métaux lourds, etc. alors que le second renseigne sur la perte de la qualité de la chair par altération autolytique ou microbienne.

Le degré d'altération d'un échantillon est généralement déterminé par le dosage des amines biogènes (putrescine, cadaverine, tyramine, l'histamine, etc.) ou par la méthode ABVT (Azote basique volatile total). Ainsi, Il est possible en dosant les teneurs en putrescine, cadaverine, tyramine, histamine, etc. d'un échantillon de connaître son état car ces amines biogènes sont libérées par décarboxylation enzymatique des acides aminés respectifs l'ornithine, la lysine, la tyrosine et l'histidine. Farn et Sims [59] ont montré qu'à 20°C la production de cadaverine et d'histamine augmente de façon exponentielle après une période initiale de latence d'environ 36 heures et que la teneur en putrescine augmente lentement après une phase initiale de latence de 48 heures. Le taux de cadaverine peut atteindre 5 à 6 µg/g de thon. Comme la putrescine et la cadaverine, l'histamine libérée dans des conditions similaires sert aussi d'indicateur de toxicité de l'échantillon car cette substance est identifiée comme étant la source de l'intoxication scombroïde. Malgré ces similitudes entre l'histamine et les autres amines biogènes il n'existe pas une bonne corrélation entre sa teneur et les teneurs des autres amines biogènes. Ainsi, Il est démontré que le stockage sous glace ou en anaérobiose ne génère pas toujours d'histamine, mais n'empêche pas la libération des autres amines biogènes et la détérioration de la qualité de la chair du produit [59,60]. Cela est certainement lié au fait que les microbes responsables de la libération de la putrescine et de la cadaverine sont psychrotrophiques (se développent plus au froid) alors que ceux

permettant la libération d'histamine sont mésophyliques (se développent plus au chaud) et sont aérobiques [53,60]. Par ailleurs bien que ces amines biogènes soient de très bons indicateurs d'altération, leur absence dans certains échantillons ne signifie pas que le produit n'est pas altéré car il existe un autre mode d'altération en dehors de l'altération microbienne à savoir l'altération autolytique. Ainsi, dans la recherche de la qualité et de son évolution dans les produits halieutiques, en plus de la recherche des teneurs des amines biogènes, la méthode ABVT (Azote Basique Volatile Total) est également utilisée afin de bien saisir l'état de détérioration du produit grâce à la détermination de sa teneur en amines volatiles. En effet, après la période post mortem nous assistons aussi à l'altération autolytique qui est indépendante de l'altération d'origine microbienne [60]. Cette altération précède la libération des amines biogènes, elle est causée par les enzymes propres du produit. Les amines volatiles dosées par ABVT (TMA, DMA et NH_3) proviennent en grande partie de l'altération autolytique.

- ❖ La triméthylamine (TMA) est produite par altération autolytique suite à la réduction enzymatique de l'oxyde de triméthylamine (OTMA),
- ❖ La diméthylamine (DMA) est libérée aussi pendant l'altération autolytique à partir de l'adénosine ou de l'OTMA sous l'effet de l'OTMA diméthylase (enzyme présent dans certains poissons (gadidés)),
- ❖ L'ammoniac (NH_3) est produit par altération autolytique de l'adénosine monophosphate (AMP) mais aussi par la décarboxylation bactérienne des acides aminés libres, des protéines, des protides, des nucléotides et de l'urée.

Ces 3 amines constituent les composants essentiels de l'ABVT mais cette méthode bien que simple selon les travaux de Relibein et Oehlschlager [61] n'est pas fiable pour déterminer la détérioration dans les dix premières journées de la conservation sous glace. Par ailleurs la valeur d'ABVT dépend de la méthode utilisée ; les résultats de six différentes méthodes analytiques (les plus utilisées) présentent peu de concordance [62]. Ainsi, chaque méthode a son propre seuil de tolérance.

Il n'existe non plus pas de corrélation entre la méthode ABVT et les méthodes basées sur la détermination simple de la TMA ou de l'ammoniac (NH_3) [63] qui sont pourtant ses constituants essentiels. La méthode ABVT permet de voir l'altération d'un produit de manière relatif, mais ne permet pas de donner des renseignements sur sa toxicité en général ni sur sa teneur en histamine en particulier [60,62,63]. Les études analytiques de détermination d'altération (cadaverine, putrescine, TMA, DMA, ABVT, etc.) ne permettent pas d'avoir des informations fiables sur la teneur en histamine mais servent de tests complémentaires pour l'étude de la qualité de l'échantillon.

D'autres études de dosage indirectes de l'histamine sont basées sur l'étude du pH du milieu puisqu'il s'avère que la libération de l'histamine se traduit par une élévation de pH [53]. Mais l'interférence due aux autres amines biogènes et acides aminés libérés en même temps que l'histamine dans le milieu fait que cette méthode est inappropriée. En effet, des droites de calibration établies entre la teneur d'histamine déterminée par les méthodes quantitatives (CLHP, CPG et fluorimétrie) et le pH du milieu donnent des coefficients de corrélation faibles (autour de 0,68). Cette valeur indique qu'il est difficile de déduire de façon fiable la teneur en histamine à partir du pH de la matrice à analyser.

Actuellement de nombreuses méthodes enzymatiques sous forme de "kit" [64] sont sur le marché et sont utilisées avec plus de précision que dans le cas du pH car elles permettent d'avoir rapidement des renseignements précieux à titre qualitatif (détection du seuil de tolérance par colorimétrie) et semi-quantitatif. Pour des études plus précises ces méthodes sont limitées. Au début le principe de ces méthodes enzymatiques repose sur l'alkylation enzymatique de l'histamine par l'emploi d'un groupe méthyl marqué par un traceur radioactif. Cette méthode est peu pratique d'où l'intérêt pour une autre méthode consistant à catalyser enzymatiquement la conversion de l'histamine en imidazole acétaldéhyde puis à doser le peroxyde d'oxygène produit lors de cette transformation. Toutes ces méthodes enzymatiques, en plus du fait

qu'elles ne permettent pas une détection directe de la teneur en histamine de l'échantillon, laissent subsister les questions d'interférences avec les autres amines biogènes. Dans certains cas, elles sont jugées trop fatigantes, car exigent deux extractions longues et une période d'incubation de 2 heures [55]. En plus, elles lient la teneur d'histamine à un changement de couleur de la solution ; ce qui les transforme en tests véritablement sensoriels.

Des méthodes biologiques [44,45,48,53,65] ont été également employées, car il est clairement démontré que, pendant la période post mortem, la population bactérienne *klebsiella pneumoniae* (psychrotrophique et mésophilique) responsable de l'altération bactérienne est fonction de la température. Ainsi entre 0 et 10 °C c'est le développement du groupe psychrotrophique qui est important par rapport au groupe mésophilique, tandis qu'au-delà de 21 °C on observe uniquement le développement du groupe mésophilique. D'autre part, à la température ambiante, la croissance de la population bactérienne est très rapide dans le temps qu'à faible température. Des études ont montré qu'à 37 °C elles peuvent produire 442 mg d'histamine par 100 g de thon dans une période de 7 H [65]. Malgré toutes ces observations, le fait que les classes bactériennes aient une évolution très contrastée avec la température et du fait que ces bactéries sont différemment histamino-producteurs [53], l'utilisation des méthodes biologiques restent très délicate, car le taux d'amine biogène formée est fonction des espèces bactériennes mais aussi de la température et du temps d'exposition, et peut dépasser 1000 ppm dans certains cas [63].

Enfin, le test indirect le plus utilisé est celui du test sensoriel qui consiste à déterminer la qualité du produit en se servant des organes de sens [53,60,66]. Ce test se fonde sur l'odeur, l'apparence des yeux, les branchies, la couleur de la peau, les intestins, la fermeté, la couleur et l'odeur des muscles. Pour un ensemble de juges donnant une note moyenne variant entre 10 et 1 pour un produit analysé : la note moyenne de 10-9 correspond à un échantillon frais, 8-6 à un échantillon faiblement

décomposé, 5-3 à un échantillon définitivement décomposé et 2-1 à un échantillon en état de décomposition très avancée. Une corrélation de 0,82 est obtenue entre la teneur d'histamine détectée de façon quantitative (CLHP+fluorimétrie) et ces différentes notes moyennes attestant de l'état de l'échantillon [53]. Cette corrélation permet actuellement avant une analyse quantitative de pouvoir sélectionner avec succès les produits suspects. Dans ce test, parmi toutes les caractéristiques utilisées, l'odeur donne la meilleure corrélation (0,83) devant toutes les autres. Ici aussi, comme les autres méthodes indirectes, la voie sensorielle a ses inconvénients car elle n'est pas quantitative. Elle permet juste d'identifier les échantillons en décomposition avancée ou semi-avancée car il faut savoir qu'avant même de constater une différence d'odeur avec l'échantillon étalon frais, la production en histamine dans le produit est dans certains cas déjà supérieure au seuil de tolérance [53,60]. En plus, Le rapport entre la classe sensorielle et le taux d'histamine dépend du type de décomposition présent dans le poisson et du niveau de compétence de l'analyste sensoriel. Former des analystes sensoriels à reconnaître des odeurs et standardiser leurs décisions est un processus complexe et coûteux qui exige la formation minutieuse par des experts sur des échantillons de composition inconnue.

I.B.3.2. Les méthodes de dosage direct

Pour ce qui concerne les méthodes directes c'est à dire permettant une détermination directe de la teneur en histamine d'un échantillon à travers une relation liant cette dernière avec des observables (absorbance, intensité de fluorescence, intensité du pic du chromatogramme, etc.), de nombreuses méthodes quantitatives ont été utilisées. Les méthodes UV-VIS, IR, CCM, CPG, CLHP avec détection UV-VIS ou IR et les méthodes fluorimétriques (étude fluorimétrique directe, ou après prétraitement pré ou post colonne et coupler avec la CLHP ou la CPG [30,56-59]. Comme l'histamine n'est pas fluorescente, un dérivé

fluorescent est formé avec un dérivatiser approprié. Le sensibilisateur le plus utilisé est l'orthophthalaldéhyde (OPA).

Les premières méthodes quantitatives se caractérisent par un manque important de sensibilité ($LD \approx 1 \mu\text{g/ml}$) et surtout beaucoup de problèmes d'interférences dues dans certains cas à un effet de recouvrement de bandes spectrales (UV-VIS et IR), car beaucoup d'amines absorbent dans la même zone que l'histamine. Dans d'autres cas (CCM, CPG, CLHP+UV-VIS), elles se caractérisent par leurs mauvaises résolutions. Le temps de rétention de l'histamine et de nombreuses autres amines sont souvent similaires donnant un déplacement quasi identique pour l'histamine et ces dernières. La chromatographie sur couche mince est certes bon marché et permet beaucoup d'analyses sur une plaque, mais elle est semi-quantitative [67]. Pour ce qui concerne la CLHP avec une dérivatisation pré-colonne ou post-colonne, elle implique des extractions liquide/liquide qui sont un facteur limitant dans la quantification [68,69]. La CPG comme les autres méthodes chromatographiques se caractérise par une limite de détection de l'ordre du ppm.

De toutes les méthodes jusque là utilisées, c'est la voie fluorimétrique qui a donné les résultats les plus satisfaisants. Une méthode fluorimétrique officielle AOAC (977.13) [57] a été utilisée régulièrement pendant 20 années comme méthode de base pour le contrôle réglementaire de l'histamine dans le poisson [70]. Cette méthode a subi une légère modification en 1997, ainsi au lieu d'une extraction de l'analyte dans 100% de méthanol, la nouvelle méthode demande une extraction dans 75 :25 méthanol/eau afin que les autres amines biogènes tels que la cadaverine et la putrescine puissent être déterminées du même échantillon par la même occasion [58]. Les coefficients de corrélation entre les intensités mesurées et les teneurs d'histamine sont toujours autour de l'unité, en plus on note une très grande sensibilité ($LD \approx 10-100 \text{ ng/ml}$) et une grande sélectivité car il est possible de doser l'histamine en présence des autres amines biogènes et acides aminés du milieu

réactionnel. Cette méthode (méthode 977.13) qui est la méthode de référence dans le monde pour le dosage de l'histamine se fonde sur une détection fluorimétrique après formation en milieu alcalin d'un fluorophore entre l'histamine (de l'échantillon à analyser) et l'OPA. Mais du fait de l'instabilité du complexe fluorophore obtenu en milieu alcalin, 3 à 4 minutes après la condensation, le milieu est acidifié afin de ralentir la réaction. Après acidification, la stabilisation définitive du fluorophore nécessite 25 min avant de faire la mesure fluorimétrique du signal. Ajoutée aux temps de préparation des solutions étalons et de calibration, cette méthode nécessite un temps d'analyse long.

DEUXIEME PARTIE
TECHNIQUES EXPERIMENTALES

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

II.A. Produits utilisés

II.A.1. Les solvants

II.A.1.1. Solvant polaire protique

Dans cette étude, nous avons utilisé l'eau distillée et les solvants organiques suivants qui sont tous de qualité spectroscopique : le méthanol (Prolabo, 99.8% m/m); l'éthanol (Sigma Aldrich, 99.99% m/m); le propan-1-ol (Merck, 99.7% m/m); le butan-1-ol (Sigma Aldrich, 99.5% m/m).

II.A.1.2. Solvant aprotique

Les solvants polaires aprotiques utilisés sont l'acétonitrile (Janssen Chimica, +99% m/m); le DMF (Sigma Aldrich, 99.8% m/m) et le DMSO (Janssen Chimica, +99%).

Dans la classe des solvants aprotiques apolaires nous avons utilisé l'hexane et le cyclohexane (Sigma Aldrich, +99% m/m). Tous ces solvants sont de qualité spectroscopique.

II.A.2. les réactifs analytiques

L' amino-2 éthyl - 4 imidazole appelé histamine (96%, m/m) ; le 4-phenyl-spiro [furan -2 (3H), 1'-phathalan]-3,3'-dione) appelé fluorescamine (98%, m/m) ; le 1,2-benzènedicarboxaldehyde (OPA) (97%, m/m) et l'hydroxyde de sodium (97%, m/m), ont été achetés chez (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Allemagne). L'acide chlorhydrique (36%, m/m, d=1,17-1,18) provient de chez VWR international S.A.B (France).

II.A.3. les réactifs d'extraction

Pour le processus d'extraction de l'histamine de l'échantillon réel, les produits suivants ont été employés : l'acétate de sodium (CH_3COONa ,

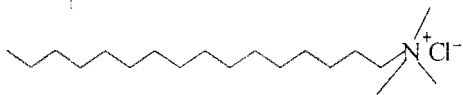
3H₂O, 99%, m/m); l'acide acétique (CH₃COOH pour analyse cristallisable, 99–100%, m/m) (Labosi, France) et l'acide trichloroacétique (TCA, CCl₃COOH, d=1,62) (Janssen Chimica).

II.A.4. Les Surfactants

Le chlorure de cetyltriméthylammonium (CTAC, 25 %, m/m en solution aqueuse, d=0.968); le sulfate dodécyle de sodium (SDS, 98%, m/m) et le Brij-700 (n=100) proviennent de Sigma Aldrich.

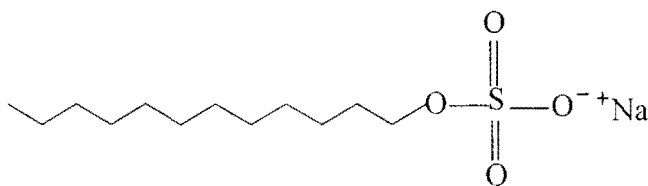
II.A.4.1. Propriétés des surfactants

❖ Le chlorure d'hexadécyl-triméthylammonium ou le chlorure de cetyl triméthylammonium (CTAC) : C'est une molécule tensioactive cationique de formule CH₃(CH₂)₁₅N(CH₃)₃Cl.



Sa concentration micellaire critique (cmc) en solution aqueuse est $1,3 \times 10^{-3}$ M.

❖ Le sulfate dodécyle de sodium (SDS) : C'est une molécule tensioactive anionique CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na.



Sa concentration micellaire critique (cmc) en solution aqueuse est $8,6 \times 10^{-3}$ M.

❖ Le Brij -700 ; c'est une micelle neutre de formule : C₁₈H₃₇(OCH₂CH₂)₁₀₀OH.



Sa concentration micellaire critique (cmc) est 2×10^{-5} M en solution aqueuse.

II.B. Instrumentation

II.B.1. Spectre UV-Visible

Les spectres d'absorption UV-Vis de l'histamine, la fluoescamine et du dérivé histamine+fluoescamine dans le méthanol sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis Hélios Gamma (ThermoSpectronic) relié à une imprimante matricielle EPSON LQ 1170 (ESC EPSON).

II.B.2. Spectre de Fluorescence

La mesure du signal de fluorescence est réalisée à la température ambiante avec un spectrophotofluorimètre Kontron Modèle SFM-25 (Zurich, Suisse) relié à un ordinateur et piloté par le logiciel Lcwin.

Une micropipette pipetman de 20 µl (Gilson, France) et une cuve en quartz (1 cm) (Hellma, Mulheim, Allemagne) sont utilisées pour respectivement les prélèvements et les mesures analytiques.

II.B.3. Spectre infra rouge (IR)

Les spectres IR ont été enregistrés à la température ambiante avec un spectrophotomètre à transformé de Fourier (Perkin Elmer). Le spectre de l'échantillon dans le méthanol est réalisé avec une cellule de KBr. Tous les Spectres ont été traités par un logiciel approprié (Spectrum version 3.02.01, Perkin Elmer).

Des spectres IR de l'histamine et de la fluoescamine en phase gazeuse de la banque de données de l'institut national des normes et technologie des USA (NIST/USA) sont utilisés [71].

II.B.4. Spectre de masse

Les spectres de masse ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre de masse couplé d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse (Carlo Erba Instruments modèle QMD 1000 GC-MS).

Des spectres de masse de l'histamine et de la fluoescamine de la banque de données ont été également utilisés [71].

II.B.5. Extraction de l'histamine

Pour l'extraction de l'histamine de l'échantillon réel, nous avons utilisé un broyeur (Moulinex, France), une colonne chromatographique à vanne d'arrêt en PTFE et fritté en verre porosité 40-60 μm (Fisher) et une résine Amberlite GC 50 type I (100-200 mesh) (Prolabo).

II.B.6. Traitement des résultats

Le signal de fluorescence est mesuré aux longueurs d'onde fixes d'excitation (λ_{ex}) et d'émission (λ_{em}) maximales analytiques du complexe histamine-fluorescamine en évaluant la hauteur du pic spectral.

Toutes les mesures de fluorescence pour le dosage sont corrigées avec le solvant ($I_F = I_{\text{mesuré}} - I_{\text{solvant}}$) et les différentes mesures analytiques sont réalisées dans les mêmes conditions de voltage (HV=400) et de sensibilité (facteur=1,5).

Les calculs, les courbes et les traitements statistiques sont faits avec les logiciels Microcal Origin 6.00 et Microsoft Excel 7.00.

II.C. Procédure expérimentale

II.C.1. Préparation des solutions

Les solutions mères d'histamine sont préparées dans l'eau ou dans un mélange eau-méthanol (25 :75 v/v). La fluorescamine est préparée dans les différents solvants organiques utilisés afin d'éviter son hydrolyse. Ces solutions sont protégées contre la lumière avec du papier aluminium. Elles sont conservées à la température du laboratoire (autour de 23 °C). Le complexe fluorophore histamine-fluorescamine est préparé dans une fiole de 5 ou 10 ml à partir des volumes d'histamine et de fluorescamine requises pour une concentration donnée avant de compléter à 5 ou 10 ml avec le solvant approprié.

II.C.2. Méthodes de mesure

La mesure de la fluorescence du complexe histamine-fluorescamine se fait à concentration variable; il est donc important de voir la procédure permettant d'atteindre cet objectif. Dans le présent travail, nous avons testé et comparé 3 méthodes de mesures à savoir, la méthode par ajout successif, la méthode par mesure répétitive et la méthode par dilution.

➤ Procédure par ajout successif

Elle consiste à mettre la solution de fluorescamine dans la cuve et à ajouter chaque fois un certain volume d'histamine et enregistrer le spectre. Elle est très pratique et minimise les erreurs liées aux mesures mais, elle est inutilisable en milieux micellaires pour les raisons de cosolubilisation et du fait aussi que la fluorescamine est facilement hydrolysable.

➤ Procédure par mesures répétitives

Dans cette procédure, après chaque mesure, il faut verser le contenu de la cuve, rincer, puis reprendre pour une autre concentration. Elle permet certes de trouver de très bons résultats, mais elle est très fastidieuse et plus susceptible d'engendrer des erreurs expérimentales sur les différentes concentrations.

➤ Procédure par dilution

Lorsque le complexe est stable, c'est à dire que le signal de fluorescence reste constant durant un temps suffisant (30 min par exemple), il est possible de faire une dilution de la solution se trouvant dans la cuve et de mesurer les nouvelles valeurs du signal de fluorescence. Tout se passe comme si on y avait introduit de nouvelles solutions ayant les mêmes concentrations que les solutions obtenues par dilution dans l'eau. Il est ainsi possible d'établir une droite de calibration $I_f = f([histamine])$, réduisant les erreurs de dosage dues à la méthode

répétitive. L'emploi d'une telle méthode exige la connaissance des effets de la moindre variation des facteurs du milieu.

Une étude comparative des deux dernières procédures (répétitives et par dilution) dans l'eau montre qu'il est possible d'utiliser l'une ou l'autre des deux méthodes avec la plus grande précision. La courbe de calibration est quasi identique pour les deux méthodes (Fig.II.1). Le coefficient de corrélation de la méthode répétitive ($R=0,996$) est légèrement inférieur à celui de la méthode par dilution ($R=0,999$), cela s'explique aisément par l'accumulation des erreurs expérimentales sur les différentes concentrations dans la méthode répétitive.

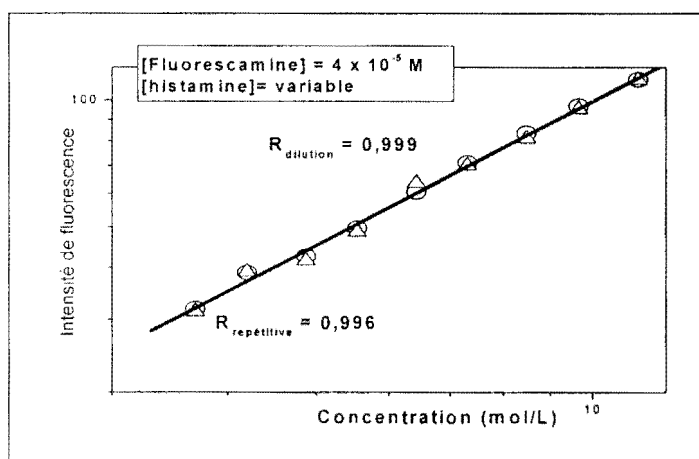


Fig. II. 1. Calibration dans l'eau par dosage Répétitif (Δ) et dosage par dilution (o).

II.C.3. Procédures d'extraction de l'histamine

La méthode d'extraction que nous avons utilisée est celle de Lerk et Bell en milieu trichloroacétique (TCA). Nous l'avons toutefois adaptée à notre sensibilisateur (fluorescamine), étant donné que la méthode est prévue au début pour la condensation de l'histamine avec l'orthophthalaldehyde (OPA).

➤ Solutions à préparer

Nous avons préparé un litre de NaOH 1 N, 1 litre de HCl 0,2 N, 1 litre d'acide trichloroacétique (TCA) 10% et 1 litre de tampon acétate 0,2 M, pH 4,62 à partir de solutions CH₃COOH et CH₃COONa toutes 1 N;

l'ajustement du pH a été réalisé par la solution CH_3COOH 1 N et une solution NaOH 1 N assisté d'un pH mètre digital.

➤ **Préparation de la colonne**

1 g de la résine Amberlite GC 50 est trempé dans 200 ml de tampon acétate pH 4,62, puis nous transvasons la solution de résine obtenue dans la colonne jusqu'à avoir un banc de 10 cm de résine.

➤ **L'extraction de l'histamine**

Nous avons prélevé plusieurs morceaux sur le poisson que nous avons transformé en pâte à l'aide d'un broyeur Moulinex. 10 g du broyat est placé dans 90 ml de TCA 10%, nous mélangeons au moins pendant 15 min, puis à l'aide d'un papier filtre nous recueillons dans une fiole de 50 ml le filtrat susceptible de contenir de l'histamine à la concentration C_0 . La fiole de 50 ml est recouverte de papier d'aluminium afin d'éviter l'effet de la lumière sur cette solution.

➤ **Purification de l'histamine**

Dans un bêcher, nous prélevons 8 ml de cette solution à laquelle nous ajoutons 12 ml de tampon acétate pH 4,62 afin d'obtenir une solution de concentration C_1 ($C_1 = \frac{8 \times C_0}{20}$), puis nous transvasons le tout dans la colonne avec un écoulement préalablement fixé à 1 goutte/3 secondes. Le bêcher est ensuite rincé par 30 ml de tampon acétate que nous versons dans la colonne cette fois en ouvrant totalement le robinet. En fait nous exploitons ici la sélectivité due à l'acidité du milieu pour une séparation sélective dans la résine de l'histamine des autres amines non précipités par la solution de TCA. Ainsi après plusieurs lavages, les autres amines sortent de la colonne, tandis que l'histamine ($\text{pK}_a=5,0$ et $9,7$) reste fixée dans la résine. Il est alors possible de la récupérer par élution au moyen d'une solution acide (HCl 0,2 N).

➤ Récupération de l'histamine

Après cette phase de séparation, l'histamine fixée sur la résine est récupérée dans un bécher à l'aide de 18 ml d'une solution d'acide chlorhydrique HCl 0,2 N en ouvrant totalement le robinet de la colonne. Avec de l'eau distillée, nous complétons à 20 ml afin d'obtenir une solution de concentration C_2 normalement égale à C_1 . Si toute l'histamine fixée sur la résine est recueillie, sinon il faut tenir compte du taux de récupération (t %) de la colonne. Dans ce cas, $C_2 = t\% \times C_1$. La valeur de t est obtenue à l'aide du test de fiabilité des différentes méthodes. Ainsi $C_2 = \frac{C_{mes} \times 5}{0,25}$ avec 5

ml le volume final de condensation, et 1 ml de volume de la solution d'histamine+75 % de méthanol ou acétonitrile et C_{mes} la concentration molaire en histamine déterminée à l'aide de la courbe de calibration. On obtient ainsi pour 8 ml de filtrat la concentration

$$C'_0 = \frac{20 \times (C_{mes} \times 5) \times 100}{8 \times t \times 0,25} = \frac{5000 \times C_{mes}}{t}$$

La masse d'histamine dans les 10 g de chair traité dans 90 ml de TCA est donc :

$$m = \frac{90 \times C'_0 \times M}{1000} = \frac{90 \times 5000 \times C_{mes} \times M}{1000 \times t} = \frac{450 \times C_{mes} \times M}{t}$$

avec M la masse molaire de l'histamine ($M = 111,15$ g / mol). La teneur T ($\mu\text{g/g}$ de produit) en histamine définie comme étant la masse d'histamine en μg dans 1 g de

$$\text{chair est } T = \frac{450 \times 10^6 \times C_{mes} \times M}{10 \times t} = \frac{45 \times 10^6 \times C_{mes} \times M}{t} \quad (10)$$

➤ Contrôle de l'efficacité de la procédure d'extraction

Il comprend trois phases et après chaque étape la résine est régénérée par une solution HCl 1 N.

La première se fait avant le début de la procédure d'extraction des échantillons réels : trois solutions étalons d'histamines furent soumises à la même procédure similaire d'extraction que les échantillons réels. La mesure de leur signal de fluorescence donne un pourcentage de recouvrement moyen de 98 % après comparaison avec les mêmes concentrations d'histamine non passés à la résine.

La deuxième phase consiste à faire passer par la même colonne juste après la procédure d'extraction, 20 ml du tampon acétate en ouvrant le robinet. La solution obtenue mélangée avec la fluorescamine ne présente pas de signal de fluorescence à 460 nm. De même aucune émission n'est observée lorsque la colonne est à nouveau lavée avec une solution de HCl 0,2 N. Ce test montre bien que la presque totalité de l'histamine présente dans la colonne est récupérée lors du premier traitement.

Dans la troisième phase, le précipité, résultant de la phase d'extraction est relavé avec du TCA puis refiltré. La solution obtenue est passée à la résine comme précédemment. Le spectre d'émission présentait un signal très faible après addition de la fluorescamine démontrant que l'histamine a été totalement récupérée du poisson.

TROISIEME PARTIE
RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre III.A. Le dérivé histamine-fluorescamine

L'histamine est une molécule non fluorescente. Par conséquent, son analyse fluorimétrique nécessite sa conversion en un dérivé fluorescent. C'est pourquoi, nous avons opté pour l'utilisation de la fluorescamine également non fluorescente comme dérivatisateur. En effet, de nombreuses études ont montré que la fluorescamine forme un complexe fluorescent de façon instantanée et spécifique (pH 7-10) avec les amines primaires [6,7]. Le fluorophore formé est excitable avec une lumière polychromatique autour de 390 nm pour une émission entre 475 et 490 nm. Le signal de fluorescence observé en mélangeant les deux solutions (histamine et fluorescamine) résulte donc probablement de la formation d'un complexe fluorophore entre les deux réactifs conformément à l'action de la fluorescamine sur les amines primaires.

Dans ce travail nous montrerons la formation du complexe et nous essayerons à la différence des autres méthodes fluorimétriques d'identifier la structure du dérivé fluorophore. En effet, malgré un emploi courant des dérivatisateurs dans les différents méthodes de dosages (amines biogènes, protéines et autres résidus organiques) l'étude de la structure du dérivé fluorophore a été très rarement abordée par les analystes. Aussi, malgré un usage répandu de l'OPA comme sensibilisateur pour le dosage fluorimétrique de l'histamine (depuis 1959), une étude de caractérisation du complexe histamine-OPA n'est pas disponible. Cela est certainement lié à la mise en avance des propriétés analytiques au dépend de toute considération structurale du fluorophore lui-même.

Pour répondre en partie à cette insuffisance dans le cas du dérivé fluorophore histamine-fluorescamine, nous avons réalisé:

- ❖ Une étude en absorption uv-visible des réactifs et du dérivé fluorophore,
- ❖ Une étude en spectroscopie d'excitation et d'émission de fluorescence du dérivé fluorophore histamine-fluorescamine,

- ❖ Une étude en infra rouge de l'histamine, de la fluorescamine et du mélange équimolaire de ces deux réactifs dans le méthanol. Ces résultats sont comparés aux spectres IR de référence des réactifs [71],
- ❖ Une étude Chromatographique afin de séparer les différents constituants du milieu réactionnel,
- ❖ Une étude en spectroscopie de masse des différents produits observés dans le chromatogramme précédent. Les spectres obtenus sont comparés avec ceux de référence de l'histamine et de la fluorescamine [71].

III.A.1. Réaction de Condensation

Selon Udenfriend et Weigle la réaction entre la fluorescamine et les amines primaires (Chap. I.A.2.1) se fait de façon instantanée en milieu alcalin ($t_{1/2}=0,5$ s) pour donner un dérivé pyrrolinone (fluorophore) selon la fig. III.A.1.

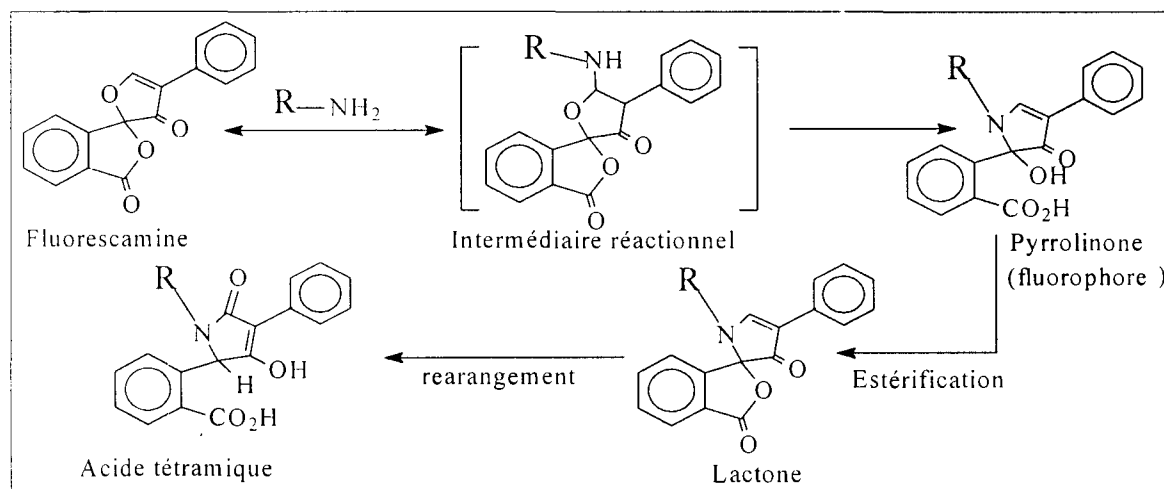


Fig. III.A.1. Réaction de condensation entre la fluorescamine et les amines primaires: Evolution du dérivé fluorophore (pyrrolinone).

L'évolution finale du complexe est fonction de la nature de l'amine primaire mais aussi du pH du milieu. Ainsi en milieu acide, le dérivé pyrrolinone (fluorophore) se dégrade pour donner un dérivé lactone (non fluorescent) qui peut subir à son tour une transformation structurale profonde aboutissant au dérivé acide tétramique. Suivant le même principe décrit pour les amines primaires en général [6,7], la réaction de

condensation entre la fluorescamine et l'histamine se traduira donc par la substitution de l'oxygène de l'hétérocycle spiro de la fluorescamine par l'azote de la fonction amine primaire de l'histamine (Fig. III.A.2). Cette réaction se fait à la température ambiante de façon instantanée en milieu neutre ou alcalin.

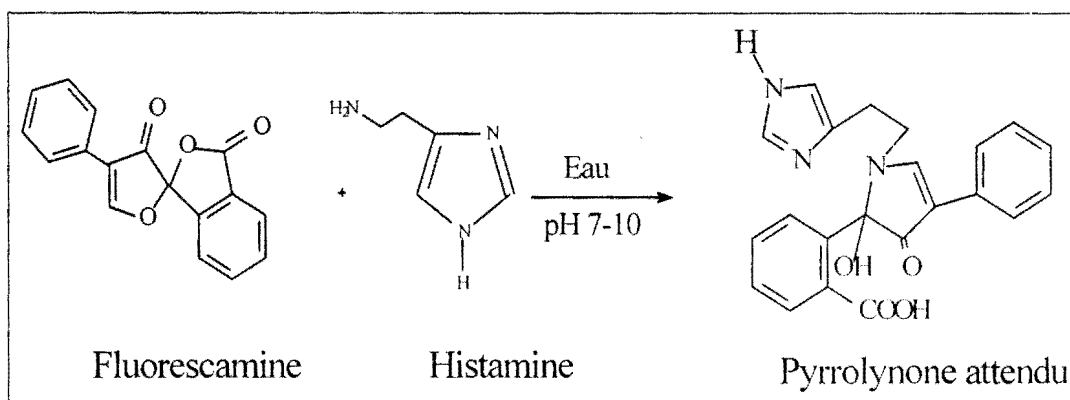


Fig. III.A. 2. Réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine.

III.A.2. Facteurs affectant la réaction de condensation

III.A.2.1. Le milieu aqueux

Nous nous proposons ici d'examiner l'influence de la présence d'eau sur la réaction de formation du complexe histamine-fluorescamine.

Afin de réaliser cette étude, nous avons préparé l'histamine ($6,56 \times 10^{-3}$ M) et la fluorescamine (5×10^{-3} M) dans le méthanol. Dans la cuve de mesure nous introduisons 20 μ l d'histamine $6,56 \times 10^{-3}$ M auquel nous ajoutons un volume V (ml) d'eau (0-2,5 ml). Après agitation nous ajoutons 100 μ l de fluorescamine 5×10^{-3} M. Après une seconde agitation nous complétons éventuellement à 2,5 ml par de l'eau distillée (fig. III.A.3).

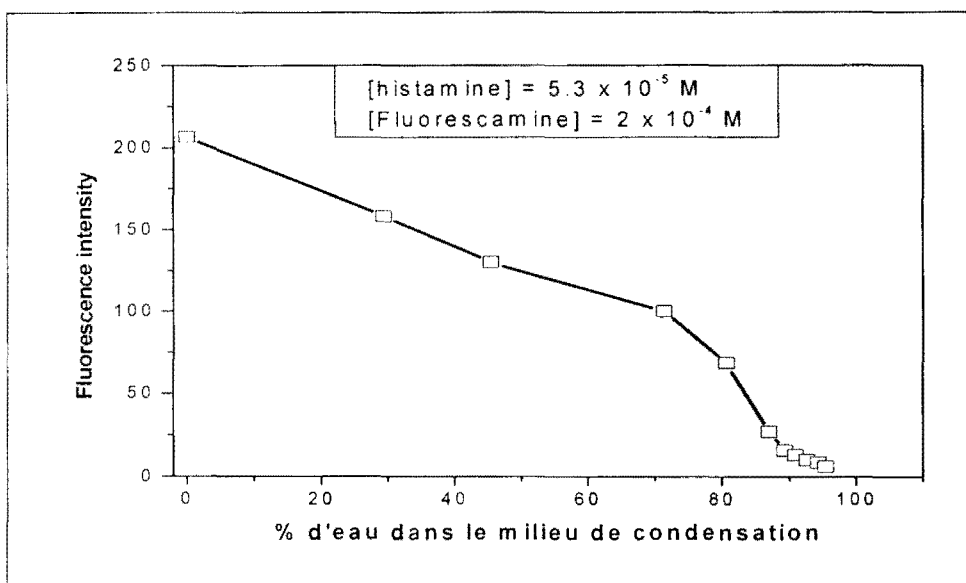


Fig.III.A.3. Effet de l'eau sur la réaction de condensation de l'histamine avec la fluorescamine.

Nous remarquons que plus la quantité d'eau dans le milieu réactionnel augmente, plus le signal de fluorescence diminue. Cette baisse de signal est due à la réaction de compétition entre les molécules d'eau et l'histamine vis à vis de la fluorescamine, qui comme nous le savions est une molécule très hydrolysables ($t_{1/2}=5-10$ s).

Ainsi, afin d'augmenter la sensibilité de notre méthode, il est nécessaire de faire la condensation entre la fluorescamine et l'histamine dans un milieu très faiblement aqueux.

III.A.2.2. Ordre d'ajout des réactifs

A cause des problèmes dus à l'effet de cosolubilisation de solutés multiples dans les micelles, l'ordre d'ajout des différents constituants dans le milieu réactionnel peut être déterminant pour les mesures à effectuer. Nous avons pu ainsi mettre en évidence 3 schémas différents pour la préparation de la solution finale à mettre dans la cuve de mesure.

➤ Procédure 1 (HMF)

Dans cette procédure, les différents produits sont introduits dans la fiole dans l'ordre suivant : histamine (H)+micelle (M)+fluorescamine (F), avant de compléter avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

➤ **Procédure 2 (FMH)**

Dans la procédure 2, l'ordre d'ajout est le suivant : fluorescamine+micelle+histamine.

➤ **Procédure 3 (HFM ou FHM)**

L'ordre d'ajout pour cette procédure est : histamine+fluorescamine ou l'inverse, puis la micelle.

➤ **Conclusion des 3 procédures**

Pour une même concentration des produits (histamine 5×10^{-6} M et fluorescamine 5×10^{-5} M) dans les 3 cas, l'intensité de fluorescence mesurée est de: 3, 5 et 135, respectivement pour la procédure HMF, FMH et HFM ou FHM.

Le spectre d'émission du complexe histamine-fluorescamine en solution micellaire de SDS (Fig. III.A.4) et dans les 2 autres micelles donne des effets similaires.

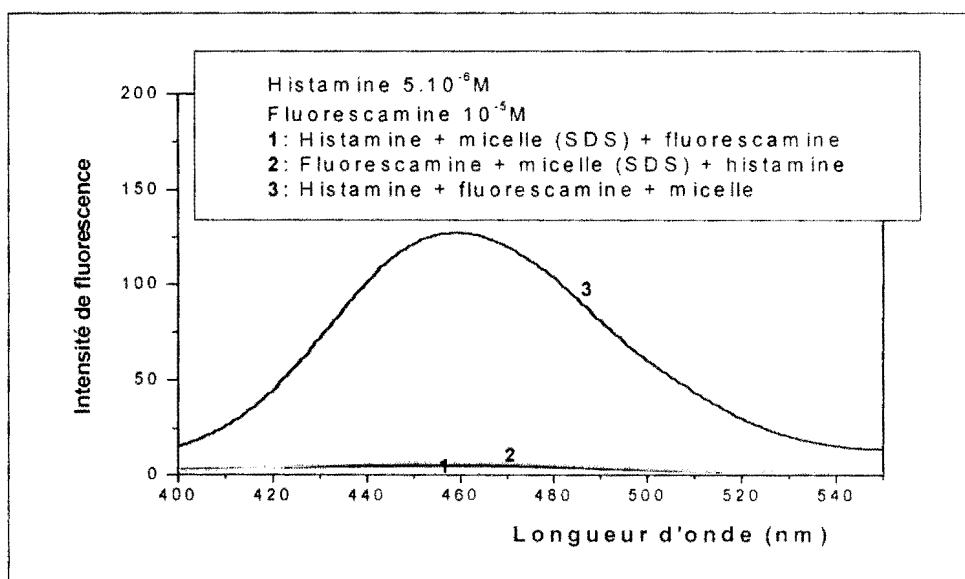


Fig. III.A.4. Spectre d'émission du complexe histamine-fluorescamine suivant l'ordre d'ajout des différents constituants.

Ces résultats montrent que la procédure 3 est la mieux indiquée pour le dosage de l'histamine par la fluorescamine en solution micellaire aqueuse puisque pour les deux premières, la micelle empêche la formation du complexe entre la fluorescamine et l'histamine. Cela est probablement dû à une encapsulation de l'un ou l'autre des réactifs, ce qui se traduit par une faible émission de fluorescence.

III.A.2.3. La concentration de la fluorescamine

III.A.2.3.1. Stœchiométrie du complexe histamine-fluorescamine

Nous avons d'abord commencé par déterminer la stœchiométrie de la réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine en milieu organique. En effet, cette étude ne saurait être conduite en solution aqueuse où la réaction d'hydrolyse de la fluorescamine pourrait entrer en compétition avec celle de la formation du complexe. Ainsi à partir de solutions méthanoliques des 2 composés, lorsque des quantités croissantes d'histamines (comprises entre 4×10^{-7} M et $3,2 \times 10^{-6}$ M) sont ajoutées à une concentration fixe de fluorescamine (2×10^{-6} M), une augmentation progressive du signal de fluorescence est observée. La courbe représentant la variation de l'intensité de fluorescence relative du complexe formé en fonction de la concentration de l'histamine donne 2 droites avec des coefficients de corrélation largement supérieurs à 0,9 (fig.III.A.5). La première droite caractérise la formation progressive du complexe tandis que la seconde, avec une pente plus faible, correspond au surplus d'histamine dans le milieu réactionnel. Le point de rencontre des 2 droites marque nettement la fin de la réaction. Ce résultat montre que la réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine est bien d'ordre 1:1.

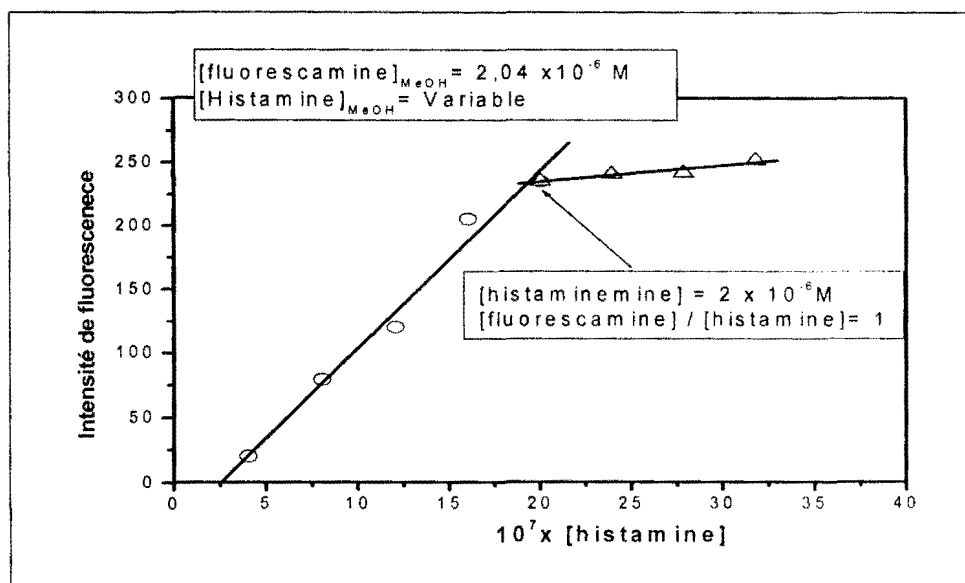


Fig. III.A.5. Stœchiométrie de la réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine.

III.A.2.3.2. Optimisation de la concentration de la fluorescamine

D'après l'étude précédente, l'idéal serait donc de faire la condensation entre l'histamine et la fluorescamine dans un milieu non aqueux car cela permettrait d'économiser le sensibilisateur. Malheureusement, les méthodes d'extraction d'histamine de l'échantillon réel se font généralement en solution entièrement aqueuse ou semi-aqueuse. Afin de prendre en compte de la présence d'eau dans le milieu réactionnel lors de l'analyse de l'échantillon réel, l'influence de la concentration de fluorescamine sur la formation du complexe est étudiée en présence de diverse proportion d'eaux ajoutées dans des solutions méthanoliques des 2 composés.

Le but de cette étude est de pouvoir prévoir la quantité de fluorescamine qui doit être utilisée en fonction de la proportion d'eau éventuellement présent dans le milieu réactionnel. La courbe représentant les variations de l'intensité de fluorescence du complexe en fonction du rapport de concentration fluorescamine/histamine (variant entre 0 et 10, avec une concentration fixe en histamine) montre que le maximum de fluorescence, obtenue à la fin de la réaction de condensation

est la même pour les différentes proportions d'eau (Fig. III.A.6). En effet, ce maximum correspond naturellement à l'émission du fluorophore de même concentration. Toutes fois, le rapport de concentration fluorescamine/histamine nécessaire pour arriver à ce maximum est de 5 et 7 en présence respectivement de 17% et 34% (v/v) d'eau, mais est supérieur à 10 pour une proportion d'eau au delà de 50% ; tandis qu'il vaudrait tout simplement 1 dans un milieu non aqueux. Ces différences en concentration pour la fluorescamine est due au fait qu'une partie de la quantité de ce composé est détruite par hydrolyse.

Nous pouvons conclure que pour la détermination de l'histamine en milieu semi-aqueux, le rapport de concentration fluorescamine/histamine recommandé doit être au moins égale à 10, pour éviter une sous estimation de la concentration de l'histamine dans les échantillons réels.

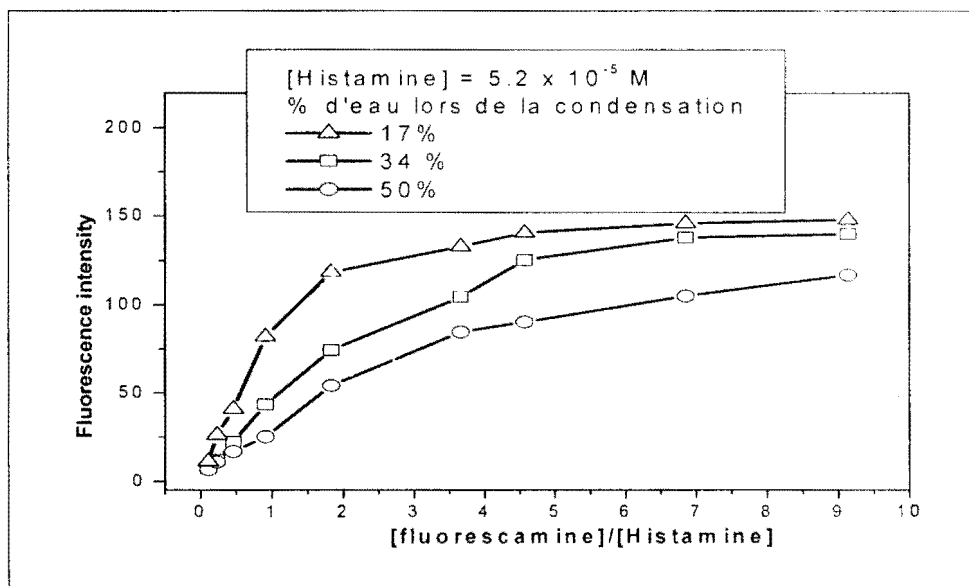


Fig. III.A.6. Optimisation de la concentration de fluorescamine pour une condensation en milieu aqueux.

III.A.3. Etude spectroscopique du complexe histamine-fluorescamine

III.A.3.1. Spectroscopie d'absorption uv-vis

Les solutions de même concentration $4,25 \times 10^{-4}$ M d'histamine, de fluorescamine et du mélange de ces deux réactifs sont préparées dans le méthanol à cause de la réaction d'hydrolyse de la fluorescamine qui est en compétition avec la réaction de formation du fluorophore en solution aqueuse.

Il est possible en se basant sur la valeur du coefficient d'extinction molaire (ϵ_{\max}) de donner la nature $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \sigma^*$ de quelques transitions électroniques rencontrées dans les spectres d'absorption électronique de l'histamine, de la fluorescamine et du dérivé histamine-fluorescamine. Cette étude se fonde en partie sur les résultats du Tab. III.A.1 et Tab. III.A.2 suivant.

Tab. III.A.1. Différents transitions électroniques $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$.

Bande d'absorption	ϵ_{\max} (l.mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Transition
Bande R	<100	$n \rightarrow \pi^*$
Bande K (k onjugierte)	>10000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Bande B (B enzénoïde)	<1000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Bande E (E thylénique)	1500-14000	$\pi \rightarrow \pi^*$

Tab. III.A.2. Différents transitions électroniques $n \rightarrow \sigma^*$ et $n \rightarrow \pi^*$ de différents groupes présentés dans l'histamine, la fluorescamine et le probable fluorophore dérivé.

Groupe	Transition	λ (nm)	ϵ_{\max} (l.mol ⁻¹ cm ⁻¹)
Alcool (O-H)	$n \rightarrow \sigma^*$	180	500
Ether (C-O-C)	$n \rightarrow \sigma^*$	190	2000
Amine (N-H)	$n \rightarrow \sigma^*$	220	800
Carbonyle (C=O)	$n \rightarrow \pi^*$	280	12
Azote (N=N)	$n \rightarrow \pi^*$	350	11
Imine (C=N)	$n \rightarrow \pi^*$	240	120

III.A.3.1.1. Absorption uv-vis de l'histamine

Nous avons réalisé le spectre d'absorption (Fig. III.A.7) à partir d'une solution d'histamine $4,25 \times 10^{-4}$ M dans le méthanol.

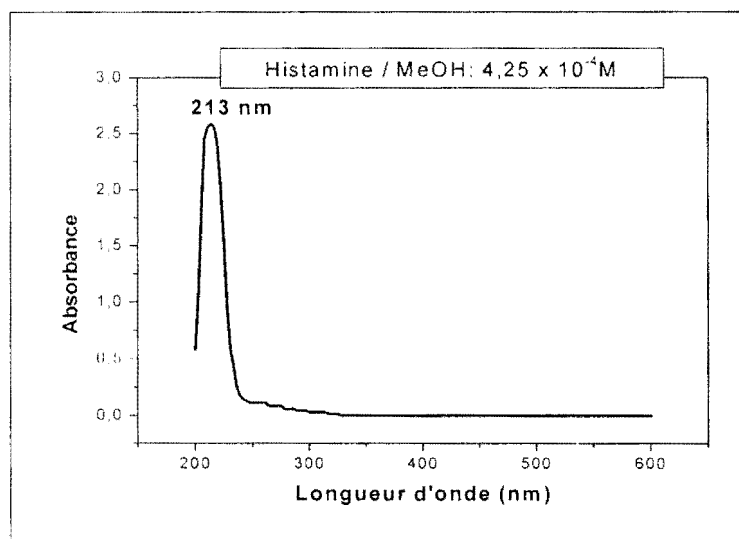


Fig. III.A.7. Spectre d'absorption uv-vis de l'histamine dans le méthanol.

Ce spectre présente une bande d'absorption relativement intense entre 200-250 nm avec un pic maximum à 213 nm. La transition électronique responsable de cette absorption se caractérise par un coefficient d'extinction molaire $\epsilon=6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dans le méthanol. Il s'agit d'une bande éthylénique (E) produite par les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ du noyau imidazole de l'histamine. Vers les grandes longueurs d'onde entre 220-350 nm, on observe une absorption de faible intensité correspondant aux transitions $n \rightarrow \sigma^*$ et $n \rightarrow \pi^*$ des liaisons N-H de la fonction amine primaire et C=N du noyau imidazole de l'histamine.

III.A.3.1.2. Absorption uv-vis de la fluorescamine

Une solution de fluorescamine $4,25 \times 10^{-4}$ M préparée dans le méthanol nous a permis de réaliser le spectre d'absorption électronique (Fig. III.A.8).

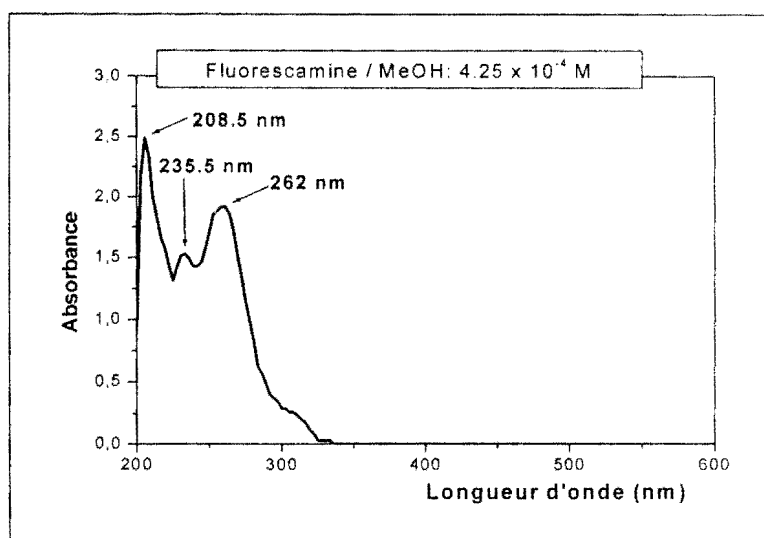


Fig. III.A. 8. Spectre d'absorption uv-vis de la fluorescamine dans le méthanol.

Ce spectre obtenu présente une bande relativement intense et large, entre 200 et 330 nm. On observe la présence de 3 pics importants. Le premier, le plus intense est autour de 208 nm, le second moins intense est aux environs de 235 nm et le troisième d'intensité moyenne se trouve au voisinage de 262 nm. Les coefficients d'extinction molaires des pics à 208, 235 et 262 nm sont respectivement 5882 , 3529 et $4471 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Une absorption intense vers les courtes longueurs d'onde montre que les transitions électroniques concernées sont des bandes éthyléniques $\pi \rightarrow \pi^*$. On note vers les faibles énergies (autour de 300 nm) la présence d'un épaulement de faible intensité avec un coefficient d'extinction molaire égal à $588 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ caractérisant la formation d'états excités $\pi\pi^*$ provenant d'une bande B (Benzénoïdes). Les transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \sigma^*$ faiblement intense caractérisant les fonctions carbonyles et C-O-C ne sont pas visibles ici à cause de l'interférence des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ très intense.

III.A.3.1.3. Absorption uv-vis du complexe histamine-fluorescamine

Dans une fiole de 5 ml, nous introduisons 0,5 ml d'une solution d'histamine $4,25 \times 10^{-3}$ M dans le méthanol et 0,5 ml d'une solution de fluorescamine de même concentration dans le méthanol. Après agitation nous complétons à 5 ml avec le méthanol. Nous prélevons 3 ml de cette solution que nous introduisons dans la cuve de mesure comme dans le cas

de l'histamine et de la fluorescamine. Nous réalisons à l'aide du spectrophotomètre le spectre d'absorption électronique suivant (Fig. III.A.9).

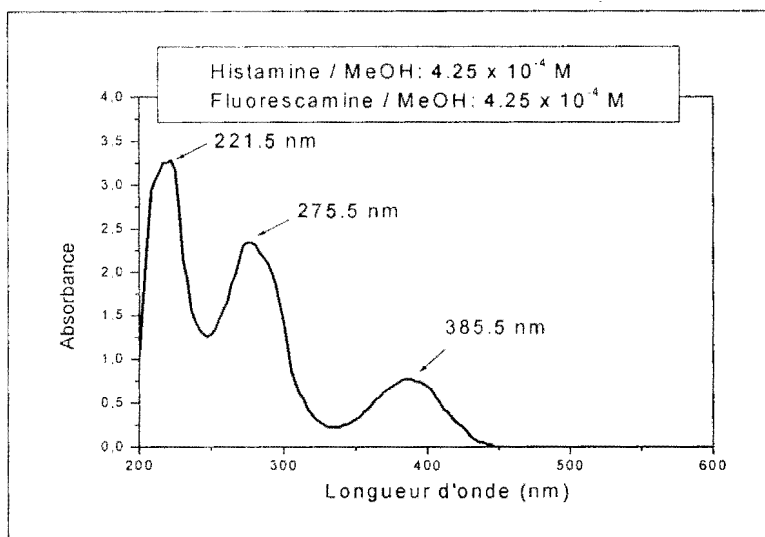


Fig. III.A. 9. Spectre d'absorption uv-vis du complexe histamine-fluorescamine dans le méthanol.

Le spectre obtenu présente une large bande d'absorption entre 200-450 nm. Cette bande se subdivise en trois autres. La première entre 200-250 nm, centrée sur 221 nm correspond probablement à des niveaux excités supérieurs qui reviendront sans doute à l'état fondamental par des processus de désactivation non radiatives. La deuxième bande entre 250-325 nm et d'intensité intermédiaire présente un maximum autour de 275 nm. La troisième bande apparaissant aux faibles énergies entre 325-450 nm est la moins intense avec une absorbance maximale autour de 385 nm. Elle est liée à des excitations électroniques qui demandent moins d'énergie par exemple $S_0 \rightarrow S_{1v}$ et par conséquent susceptibles dans le cas des fluorophores en général de se désactiver par voie radiative. Le spectre d'excitation électronique de fluorescence nous édifiera plus largement sur la nature de ces états excités observés dans le spectre d'absorption.

Les pics à 221, 275 et 385 nm du spectre du mélange histamine+fluorescamine ont pour coefficients d'extinction molaires respectifs de 7647, 5294 et $1765 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Les absorbances sont

relativement intenses, les transitions électroniques associées sont des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ provenant majoritairement d'une bande E (Ethylénique).

Les transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \sigma^*$ faiblement intense caractérisant les fonctions carbonyles et imines ne sont pas visibles à cause de l'interférence des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ très intense dans la même zone.

Les pics obtenus pour le dérivé histamine-fluorescamine diffèrent beaucoup de ceux des deux réactifs histamine et fluorescamine pris séparément, cela atteste de la présence d'une nouvelle molécule dans le milieu réactionnel.

III.A.3.2. Spectroscopie de fluorescence

L'histamine comme la fluorescamine ne sont pas fluorescents. Un mélange des deux solutions produit (dans l'eau et dans d'autres solvants organiques) une émission de fluorescence maximale autour de 460 nm (Fig. III.A.10).

Le spectre d'excitation du dérivé fluorophore entre l'histamine et la fluorescamine qui est aussi un spectre d'absorption électronique en le comparant au spectre d'absorption uv-vis du complexe nous édifiera sur les processus de désactivation des différents états excités observés. En effet, à la différence du spectre d'absorption uv-vis, le spectre d'excitation de fluorescence est lié à l'émission de fluorescence par la longueur d'onde d'émission maximale (λ_{em}). Ce spectre ne montre que les molécules excitées qui émettent à la longueur d'onde d'émission fixe (ici $\lambda_{em}=460$ nm) et par conséquent tous les autres états excités qui reviennent à l'état fondamental par voie non radiative ne seront pas comptabilisés (Fig. III.A.10) alors qu'ils sont visibles dans le spectre d'absorption uv-vis (Fig. III.A.9). Selon Parker [72] et Petrov [73] en observant les spectres d'absorption uv-vis et d'excitation de fluorescence, il est facile de connaître la part des processus non radiatifs pour un fluorophore.

Le coefficient d'extinction molaire du fluorophore à une longueur d'onde (λ) donnée s'écrira :

$$\varepsilon(\lambda) = \varepsilon'(\lambda) + \varepsilon''(\lambda)$$

$\varepsilon'(\lambda)$: pour les molécules se désactivant par voie radiative

$\varepsilon''(\lambda)$: pour les molécules se désactivant par voie non radiative

Dans une solution diluée l'absorbance totale $Abs(\lambda)$ et l'intensité de l'excitation de fluorescence (I) s'écriront respectivement :

$$Abs(\lambda) = \varepsilon(\lambda)lC = [\varepsilon'(\lambda) + \varepsilon''(\lambda)]l \times C$$

$$I \approx 2,3 \times \varphi \times [\varepsilon'(\lambda)l \times C]$$

Avec φ le rendement quantique de fluorescence indépendant de la longueur d'onde d'excitation et I l'intensité du spectre d'excitation corrigé.

La connaissance de I et φ permet d'obtenir les absorbances correspondant aux processus radiatifs $Abs' \approx [\varepsilon'(\lambda)lC]$ et non radiatifs $Abs'' \approx [\varepsilon''(\lambda)lC]$ et de voir le lien entre les spectres d'absorption uv-vis et d'excitation de fluorescence.

Le spectre d'excitation de fluorescence du dérivé histamine-fluorescamine présente deux bandes, la première entre 225-300 nm (moins intense) a un pic maximum autour de 272 nm et la deuxième bande entre 300-435 nm (plus intense) a son maximum autour de 380 nm (Fig. III.A.10).

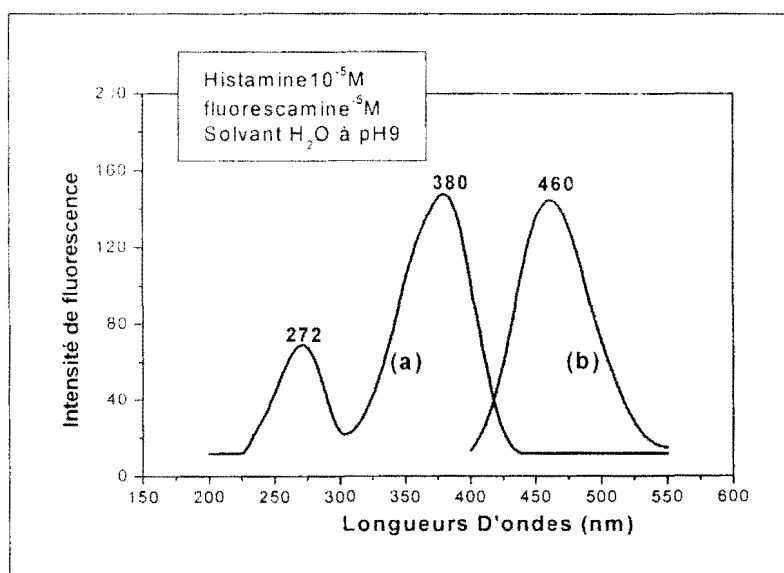


Fig. III.A.10. Spectres d'excitation (a) et d'émission (b) du dérivé histamine-fluorescamine.

La bande vers les grandes énergies (221 nm) observée dans le spectre d'absorption uv-vis a disparu. Cela confirme notre hypothèse à savoir qu'elle correspond à des excitations électroniques à des niveaux supérieures ($p \geq 2$) ou singulet s_1 à un niveau vibrationnel très élevé qui reviennent généralement à l'état fondamental par des voies non radiatives et qui par conséquent ne peuvent pas être observées dans le spectre d'excitation électronique de fluorescence.

Dans le spectre d'excitation, la bande autour de 272 nm est moins intense que celle autour de 380 nm bien que le spectre d'absorption uv-vis nous montre que les molécules excitées autour de cette longueur d'onde sont plus importantes. Cela s'explique par le fait qu'une bonne partie des molécules excitées autour de 272 nm revient à l'état fondamental par voies non radiatives contrairement à celles excitées autour de 380 nm. A cette dernière longueur d'onde, l'intensité relative d'excitation est quasi-égale à celle de l'émission de fluorescence. Il est donc possible de dire que l'excitation à 380 nm produit une transition de l'état fondamental (S_0) au premier état excité singulet (S_{1v}) alors que l'excitation à 272 nm qui demande plus d'énergie correspond très probablement à la transition S_0 pour un état excité singulet S_{2v} ou S_{1v} avec ici v assez élevé. Une partie de ces molécules excitées reviennent à l'état fondamental par voie non radiative et l'autre partie se désactive d'abord très rapidement (10^{-12} s) de façon non radiative jusqu'à l'état excité S_1 avant de rejoindre l'état fondamental par voie radiative. Ce fait explique bien que quelque soit la longueur d'onde (272 ou 380 nm), nous avons une émission unique à 460 nm. L'intensité de fluorescence est maximale pour une excitation à 380 nm, bien que la population excitée à cette longueur d'onde est la plus faible par rapport à celles excitées autour de 221 nm et 275 nm (Fig. III.A.9).

III.A.3.3. Diagramme énergétique du dérivé fluorophore

A l'aide du spectre d'absorption uv-vis du complexe histamine-fluorescamine (Fig. III.A.9) et de ses spectres d'excitation et d'émission de fluorescence (fig. III.A.10) il est possible de proposer un diagramme énergétique probable (diagramme de Jablonsky) du dérivé fluorophore histamine-fluorescamine.

L'excitation des molécules autour de 221 nm qui exige plus d'énergie produit des états excités singulet supérieurs (S_{pv} , $p \geq 2$ ou $p=1$ et v très grand). Ces derniers qui ne sont pas visibles dans le spectre d'excitation de fluorescence reviennent donc à l'état fondamental par voie non radiative. Cette transition se fait directement ou par étapes en passant par les états intermédiaires par relaxation vibrationnelle suivie de conversion interne. Cette désactivation non radiative peut se faire aussi par une conversion intersystème en passant par les états triplets ou dans certains cas par transfert d'énergie aux molécules environnantes ou par formation de complexe non fluorescent à l'état excité.

Pour ce qui concerne les molécules excitées autour de 272 nm, elles donnent très probablement des états excités S_{pv} avec $p=1$ ou 2. La majeure partie de ces états excités reviennent par voie non radiative comme ci dessus et l'autre partie après une première étape de relaxation vibrationnelle suivie de conversion interne arrive à s_{10} d'où ils se désactivent par voie radiative pour rejoindre S_{0v} .

L'excitation autour de 380 nm qui correspond à la plus faible énergie produit une émission très intense. Ces molécules excitées sont du côté de la bande 0-0 et sont donc à l'état S_{1v} avec v relativement faible. Ainsi, une grande partie de ces derniers par relaxation vibrationnelle reviennent à l'état S_{10} d'où ils se désactivent par voie radiative pour rejoindre S_{0v} .

En s'inspirant des informations tirées des spectres d'absorption uv-vis et d'excitation de fluorescence nous proposons le diagramme énergétique (Fig. III.A.11) appelé diagramme de Jablonsky du complexe fluorophore histamine-fluorescamine. Dans ce diagramme nous avons fait figurer simplement la nature radiative ou non des différents processus

sans tenir compte de toute la dynamique de désactivation des états excités (CI, RV, CIS, TE, R).

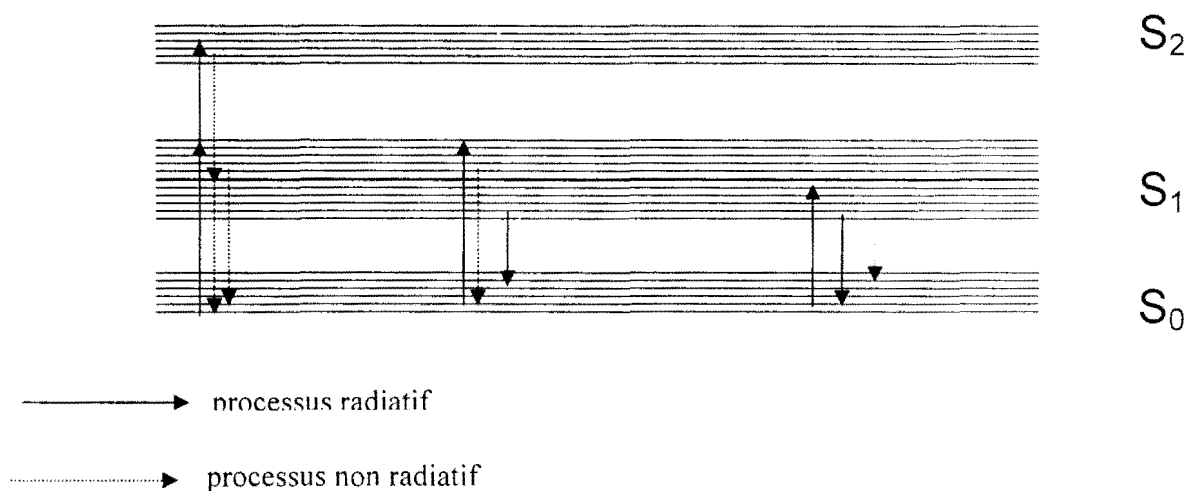


Fig. III.A.11. Diagramme énergétique du dérivé histamine-fluorescamine.

III.A.3.4. Spectroscopie infra Rouge (IR)

Les solutions d'histamine (11 mg dans 1 ml de méthanol), de fluorescamine (28 mg dans 1 ml de méthanol) et du dérivé histamine-fluorescamine (11 mg d'histamine+28 mg de fluorescamine dans 1 ml de méthanol) sont préparées. Ensuite nous faisons un dépôt de l'échantillon (histamine ou fluorescamine ou dérivé histamine-fluorescamine) sur la cellule de KBr puis nous laissons le méthanol s'évaporer et enfin nous réalisons le spectre infra rouge (IR).

Avant la réalisation des spectres IR de nos échantillons, nous avons effectué le spectre IR de la cellule de KBr seule et du méthanol sur la cellule de KBr. Ce dernier correspond pratiquement à celui de la cellule de KBr seule car le méthanol s'est pratiquement évaporé.

Nous avons procédé pour tous les échantillons de la même manière que pour l'histamine (Fig. III.A.12). Du spectre de l'échantillon sur la cellule de KBr (spectre 2), nous retranchons le spectre IR du méthanol sur

la cellule de KBr (spectre 1) afin d'obtenir le spectre IR de l'échantillon pur (spectre 3).

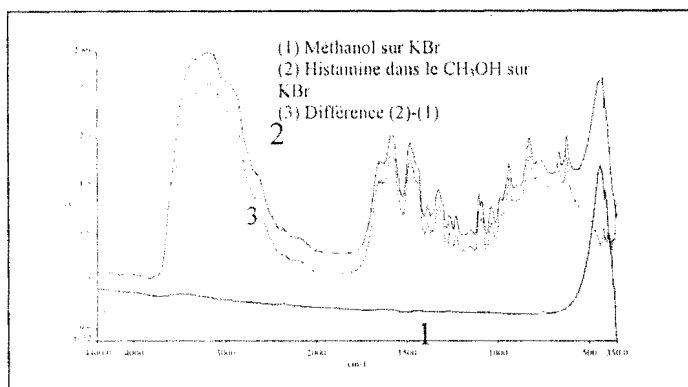


Fig. III.A.12. Technique de réalisation de nos spectres IR.

III.A.3.4.1. Spectres IR de l'histamine

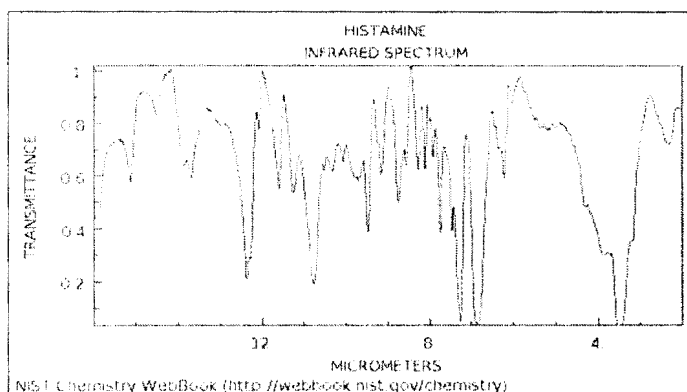


Fig. III.A.13. Spectre IR de référence de l'histamine en phase gazeuse [71].

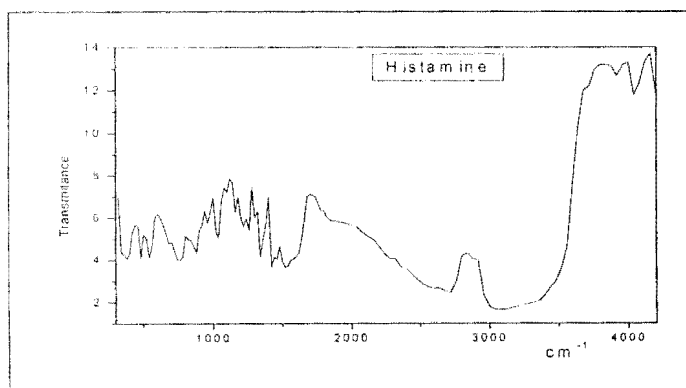


Fig. III.A.14. Spectre IR histamine dans le méthanol.

Nous retrouvons les mêmes bandes caractéristiques entre 3750-2000 cm^{-1} et 1700-1300 cm^{-1} dans le spectre IR de référence (NIST) de l'histamine en phase gazeuse (Fig. III.A.13) et le spectre de notre échantillon d'histamine réalisé en phase liquide-solide (Fig. III.A.14). La seule différence se situe au niveau de la largeur des bandes car elles sont plus larges et moins résolues dans notre échantillon que dans l'échantillon de référence (phase gazeuse). Cela s'explique d'une part par la présence des liaisons hydrogène entre les molécules d'histamine et celles du solvant (méthanol) et d'autre part par le fait que la spectroscopie IR en phase gazeuse est plus résolue que celle en phase liquide ou solide.

La bande entre 3750-2000 cm^{-1} est très large et très intense, elle présente deux pics maximums autour de 3113 et 2772 cm^{-1} . Ces pics caractérisent respectivement les élongations très intenses des liaisons N-H de la fonction amine primaire de l'histamine et les élongations C-H du fragment éthyle portant la fonction amine car les élongations C-H sont moins intenses que les N-H.

Pour la bande entre 1700-1300 cm^{-1} , les différents pics autour de 1600, 1400 et 1300 cm^{-1} caractérisent les déformations des liaisons N-H et C-H.

Aussi bien entre 3750-2000 cm^{-1} qu'entre 1700-1300 cm^{-1} , la largeur des bandes indique la présence de protons engagés dans des liaisons hydrogènes (interaction liaison N-H avec les autres molécules du solvant).

La formation d'une liaison covalente (C-N) entre l'histamine et la fluorescamine se remarquera donc plus facilement par la disparition de ces pics caractéristiques plutôt qu'à la détermination des vibrations de la nouvelle liaison C-N car ce dernier donne un pic de faible intensité non observable à cause des interférences des liaisons C-N et C-C déjà existantes dans le noyau imidazole de l'histamine qui absorbent aussi dans la même zone (entre 1250-1100 cm^{-1}).

III.A.3.4.2. Spectres IR de la fluoescamine

Pour ce qui concerne notre échantillon de fluoescamine (Fig. III.A.16), nous remarquons l'absence de bande importante dans la zone entre $4000-2000\text{ cm}^{-1}$ comme dans le cas du spectre de référence (Fig. III.A.15). Au-delà de 2000 cm^{-1} les deux spectres présentent les mêmes caractéristiques.

La transparence entre $4000-2000\text{ cm}^{-1}$ facilitera l'observation au niveau du spectre du mélange équimolaire histamine-fluoescamine de la disparition ou non de la bande large et intense entre $3750-2000\text{ cm}^{-1}$ caractérisant les liaisons N-H de l'histamine (Fig. III.A.14).

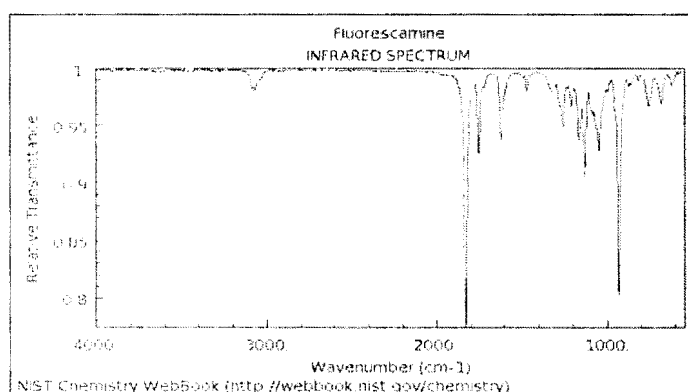


Fig. III.A.15. Spectre IR de référence de la fluoescamine en phase gazeuse [71].

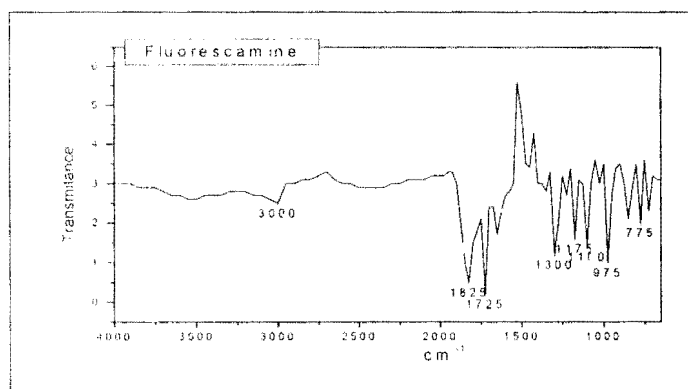


Fig. III.A.16. Spectre IR Fluoescamine dans le méthanol.

III.A.3.4.3. Le spectre IR du dérivé fluorophore

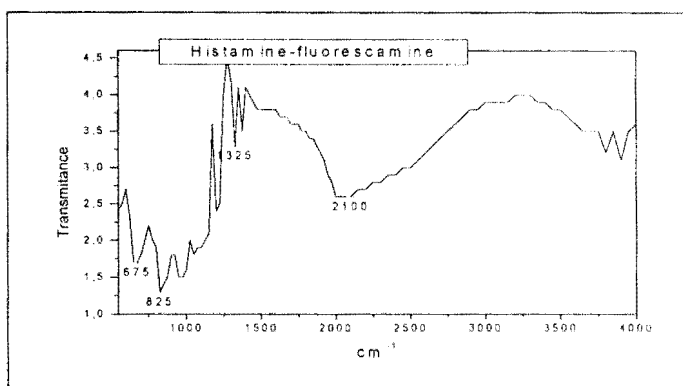


Fig. III.A.17. Spectre IR du dérivé histamine-fluorescamine dans le méthanol.

Nous constatons (Fig. III.A.17) la disparition de la bande autour de 3113 cm^{-1} et de nombreux pics entre $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ caractérisant les liaisons N-H au niveau du spectre IR de l'histamine. Cela rend très probable l'hypothèse de la formation d'une liaison covalente comme énoncée dans plusieurs travaux par substitution d'un hétéroatome (l'oxygène) dans la molécule de fluorescamine par l'azote de l'amine primaire de l'histamine.

III.A.3.5. Chromatographie en phase gazeuse

Dans une fiole de 10 ml contenant 2 ml de méthanol nous introduisons 10 mg d'histamine et 50,1 mg de fluorescamine, après agitation nous complétons à 10 ml avec le méthanol. Après une seconde agitation, 50 μl du mélange final sont injectés dans la colonne chromatographique pour analyse (Fig. III.A.18).

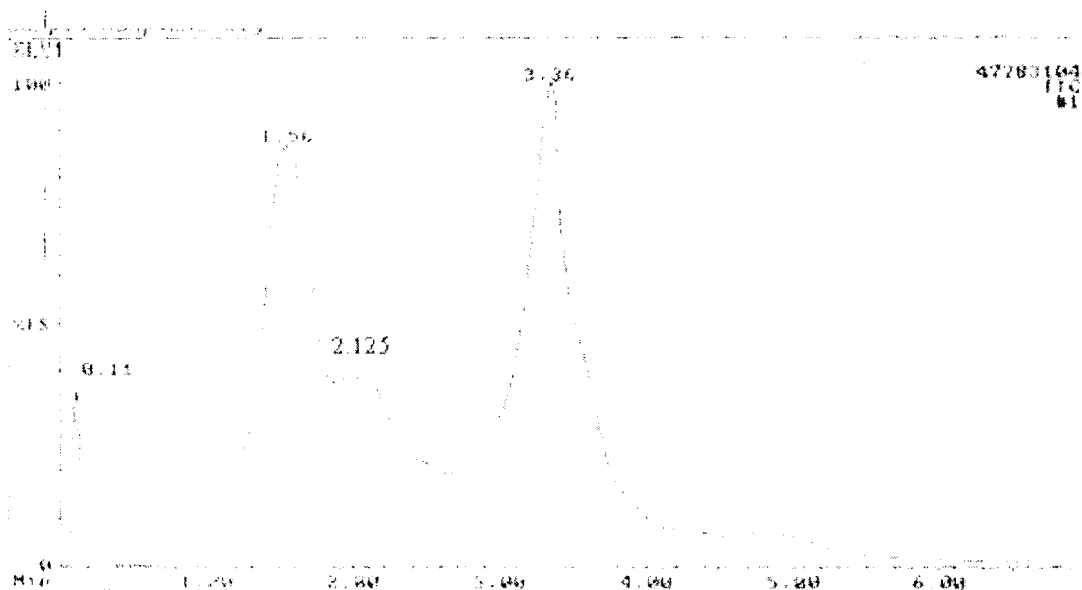


Fig. III.A.18. Chromatogramme d'un mélange fluorescamine et histamine dans le méthanol dans un rapport de concentration=2.

Le chromatogramme laisse apparaître 4 pics importants à des temps de rétention bien distincts. Le mélange étant réalisé dans les conditions d'une mole d'histamine pour 2 moles de fluorescamine il ne devrait pas y avoir de pic correspondant à l'histamine si la stœchiométrie de la réaction de condensation est bien d'ordre 1:1. Le premier pic à 0,11 min correspond au solvant (méthanol). Les 3 autres pics restants correspondent probablement au surplus de fluorescamine et aux produits formés. Pour tirer au clair cette question, pour chaque pic nous avons réalisé un spectre de masse.

III.A.3.6. spectrométrie de masse

III.A.3.6.1. Spectre de masse du pic à 1,56 min

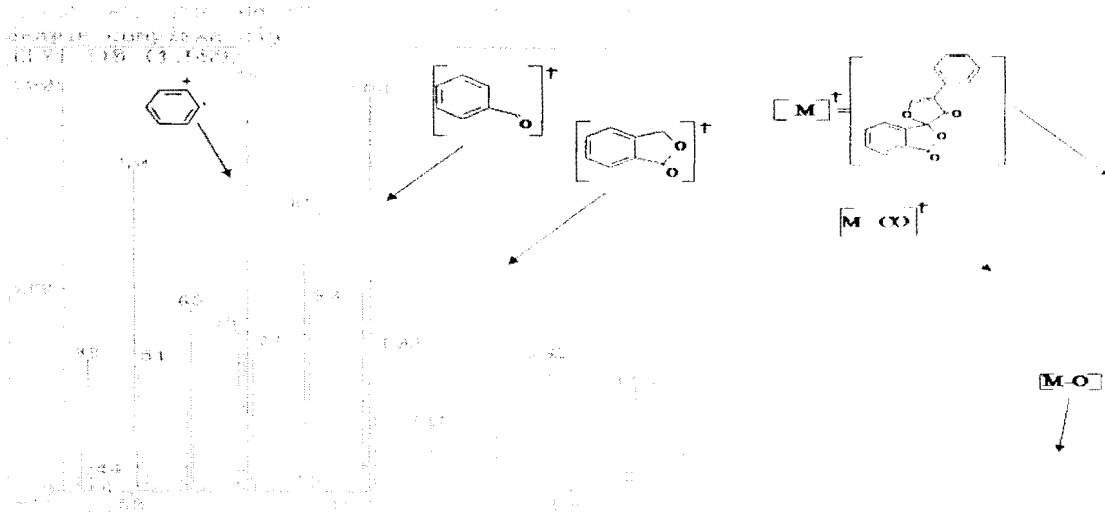


Fig. III.A.19. Spectre de masse du pic à 1,56 min.

Tab. III. A.3. Spectre de masse du pic à 1.56 min: abondance relative des autres pics par rapport à l'ion mère $m/z=76$.

m/z	39	50	51	63	75	76	77	89	90	102	104	105	118	132
%	32.73	78.18	29.09	45.45	36.36	100	32.73	69.09	43.64	62.73	97.27	31.82	16.36	60
m/z	133	145	165	176	194	206	222	234	249	250	262	278	279	280
%	15.45	32.73	26.36	8.18	10	14.55	33.64	3.64	20	67.27	4.55	70.91	13.64	1.82

Nous présentons dans la figure ci-dessus le spectre de masse réalisé pour le premier pic à 1.56 min. Du côté des grandes masses nous remarquons aisément l'ion le plus abondant apparaissant à $m/z=278$ (Tab. III.A.3). Cet ion, probablement en perdant un oxygène donne l'ion à $m/z=262$. Les pics apparaissant aux valeurs $m/z=279$ et 280 correspondent aux isotopes les moins abondants de cet ion moléculaire (M) et sera appelé l'ion non isotopique (A). Cette valeur ($m/z=278$) nous fait penser à la fluorescamine qui a la même masse molaire, mais pour plus de précision faisons la démarche habituelle d'identification standard d'un composé inconnu en spectrométrie de masse [74]. Pour cela nous considérons les ions moléculaires des isotopes A, A+1 et A+2, ensuite nous normalisons l'intensité de l'ion moléculaire le plus abondant (A) à

100 et après nous déterminerons l'importance relative des autres ions A+1 et A+2 par rapport à celui de A (Tab. III.A.4).

Tab. III.A.4. Abondance relative des ions moléculaires A+1 et A+2 par rapport à l'ion moléculaire A normalisé à 100 du pic à 1.56 min.

Masse	Ion	%	normalisation
278	A	70.91	100
279	A+1	13.64	19.23
280	A+2	1.82	2.56

Tab. III.A.5a. Contribution isotopique des carbones et des hydrogènes si l'abondance isotopique du pic A est normalisée a 100 [74].

C	A+1	A+2	C	A+1	A+2	A+3
C ₁	1.1	0.00	C ₁₆	18	1.5	0.1
C ₂	2.2	0.01	C ₁₇	19	1.7	0.1
C ₃	3.3	0.04	C ₁₈	20	1.9	0.1
C ₄	4.4	0.07	C ₁₉	21	2.1	0.1
C ₅	5.5	0.12	C ₂₀	22	2.3	0.2
C ₆	6.6	0.18	C ₂₂	24	2.8	0.2
C ₇	7.7	0.25	C ₂₄	26	3.3	0.3
C ₈	8.8	0.34	C ₂₆	29	3.9	0.3
C ₉	9.9	0.44	C ₂₈	31	4.5	0.4
C ₁₀	11.0	0.54	C ₃₀	33	5.2	0.5
C ₁₁	12.1	0.67	C ₃₅	39	7.2	0.9
C ₁₂	13.2	0.80	C ₄₀	44	9.4	1.3
C ₁₃	14.3	0.94	C ₅₀	55	15	2.6
C ₁₄	15.4	1.1	C ₆₀	66	21	4.6
C ₁₅	16.5	1.3	C ₈₀	110	60	22

Une observation du tableau ci-dessus des contributions isotopiques des carbones et des hydrogènes (Tab. III.A.5a) nous permet d'obtenir le nombre de carbone dans cet ion moléculaire. En effet, dans ce tableau on lie le nombre d'atome de carbone dans l'ion non isotopique à la valeur normalisée de A+1.

Il en est de même pour les éléments suivant (Tab. III.A.5b).

Tab. III.A.5b. Contribution isotopique d'autres atomes (N, O, Si, Cl et Br) si l'abondance isotopique du pic A est normalisée à 100 [74].

Élément	N	O	Si	S	Cl	Br
A+1	0.37	0.04	5.1	0.79		
A+2		0.02	3.4	4.4	32	97.3

Pour notre pic à 1.56 min, A+1=19,23 % de A ; la lecture sur le tableau d'abondance isotopique (Tab. III.A.5a) indique la présence de 17 atomes de carbone dans la molécule. En retranchant l'apport de 17 carbones (1,7) au pic de l'ion A+2 à partir du tableau III.A.4 on aura le résultat suivant.

Masse	Ion	%	normalisation
278	A	70.91	100
279	A+1	13.64	19.23
280	A+2	1.82	2.56-1.7=0.086

Le reste 0.086 pour l'ion A+2 conformément au tableau des contributions isotopiques III. A.3b, correspond à 4 oxygènes ($4 \times 0.02 = 0.08$).

L'ion moléculaire de l'isotope le plus abondant a 17 carbones et 4 oxygènes soit une valeur en masse de 268. En retranchant cette valeur de la masse de l'ion moléculaire (278), il reste 10 ($278 - 268 = 10$) soit l'équivalent de 10 hydrogènes. D'où la formule brute $[C_{17}H_{10}O_4]^+$ pour cet ion. C'est un radical cation d'après Pellegrin [75] car un fragment $C_xH_yN_zO_n$ est soit sous forme de :

- Cation (A^+) si la valeur $x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1$ est demi entier.
- Radical ion ($A^{\cdot+}$) si la valeur $x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1$ est un entier.

Pour $C_{17}H_{10}O_4$ on a $17 - \frac{1}{2} \times 10 + \frac{1}{2} \times 0 + 1 = 13$; c'est un radical cation ($A^{\cdot+}$).

La valeur $x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1$ de Pellegrin détermine aussi le nombre d'insaturation(s)+cycle(s) dans la molécule.

La masse molaire (278), la formule brute $C_{17}H_{10}O_4$ et le nombre d'insaturations+cycles (13) nous indiquent que le pic à 1.56 min correspond

au reste de fluorescamine n'ayant pas réagi avec l'histamine. Ce résultat est confirmé par le spectre de masse de référence de la fluorescamine (Fig. III.A.20) avec lequel nous avons une totale correspondance des pics.

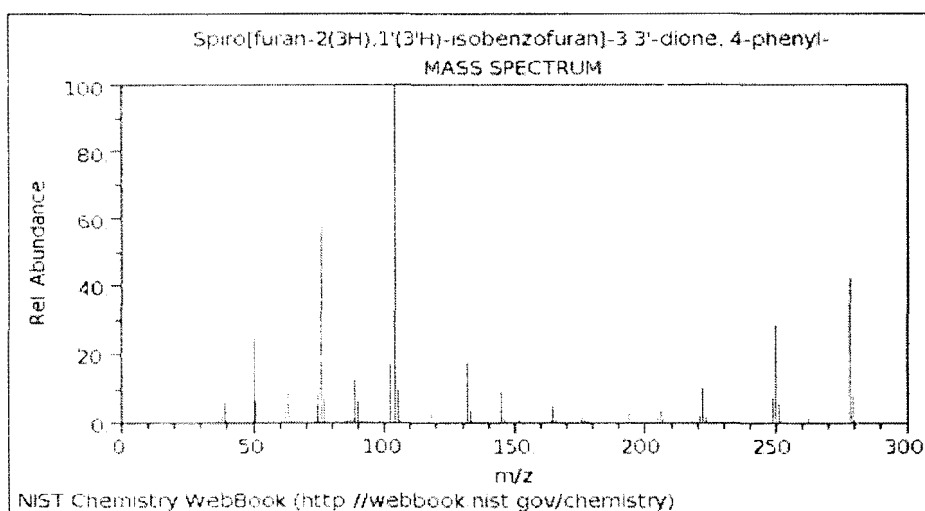


Fig. III.A.20. Spectre de masse de référence de la fluorescamine [71].

III.A.3.6.2. Spectre de masse du pic à 2.125 min

Le pic à 2.125 min donne le spectre suivant (Fig. III.17),

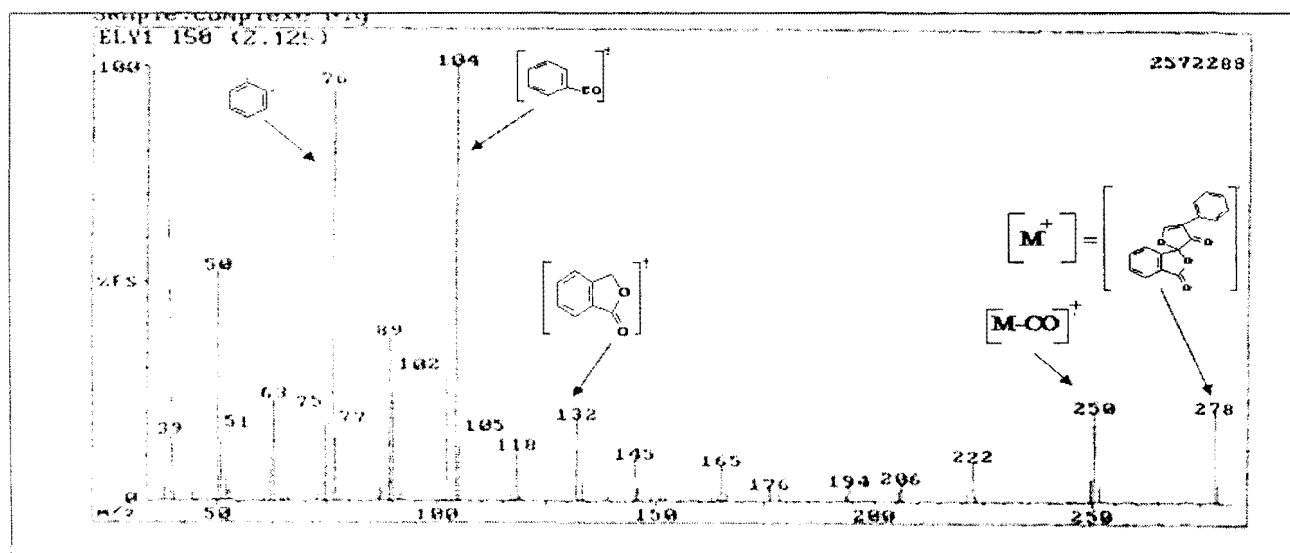


Fig. III.A.21. Spectre de masse du pic à 2,125 min.

Ce spectre a quasiment les mêmes caractéristiques que le spectre du pic précédent (Fig. III.A.19). Il s'agit donc d'un isomère de la fluorescamine. En effet, la molécule a un carbone asymétrique et peut donc se trouver sous les deux formes d'énantiomères R et S. Une note

adressée au service scientifique de Sigma Aldrich (European Technical services, Sigma Aldrich LTD) nous confirme que le produit N°201650 (Fluorescamine) acheté dans cette maison est un mélange racémique d'énantiomères de fluorescamine R et S (Fig. III.A.22). Ce qui explique donc les deux temps de rétention pour la molécule de fluorescamine très proches.

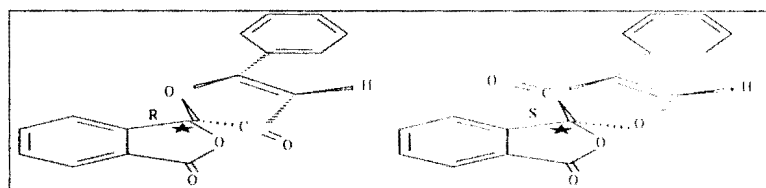


Fig. III.A.22. Fluorescamine énantiomères R et S.

Dans la configuration R le groupement carbonyle C=O et le groupement phényle sont dans le même plan avec pour conséquence un encombrement stérique plus important pour ce groupement phényle par rapport à la configuration S où ce dernier se trouve avec un oxygène dans le même plan. Cela aura probablement pour conséquence une abondance relative importante de l'ion $[C_6H_5]^+$ et $[C_6H_4]^+$ provenant du groupement phényle de la configuration S par rapport à la configuration R. Dans le spectre de masse du pic à 1,56 min du chromatogramme on trouve un ion à $m/z=262$ qui correspond au départ d'un oxygène et un ion à $m/z=76$ correspondant à l'ion le plus abondant. Cet ion abondant provient du groupement phényle le moins encombré. Le pic à 1.56 min correspond à la fluorescamine S. La fluorescamine R se trouve donc au pic à 2.125 min. Cela est confirmé d'une part par la formation juste avant l'ion moléculaire d'un ion à $m/z=250$ correspondant au départ du groupement carbonyle se trouvant dans le même plan que le groupement phényle. D'autre part l'ion le plus abondant n'est pas l'ion $[C_6H_4]^+$ provenant du groupement phényle comme dans le cas de la fluorescamine S; ici sa formation demande plus d'énergie car il est plus encombré.

III.A.3.6.3. Spectre de masse du pic à 3,358 min

Les deux premiers pics du chromatogramme (1,56 et 2,125 min) sont identifiés respectivement comme étant la fluorescamine S et R. Le pic correspondant au temps de rétention le plus long (3.358) correspondra donc au dérivé fluorophore histamine-fluorescamine car l'autre réactif, l'histamine ne doit pas exister sous forme libre dans le milieu réactionnel d'après le rapport de concentration [fluorescamine]/[histamine]=2 employé.

Tab. III. A.6. Spectre de masse du pic à 3.358 min: Abondance relative des autres pics par rapport à l'ion mère $m/z=76$.

m/z	39	50	51	63	75	76	77	89	90	102	104	105	118	132
%	37.27	78.18	29.09	58.18	38.18	100	33.64	71.82	47.27	65.45	97.27	32.73	19.09	63.64
m/z	133	145	165	176	194	206	222	234	249	250	262	278	279	280
%	15.45	33.64	29.09	8.18	10.9	13.23	39.09	2.73	22.73	73.64	2.73	75.45	10.91	1.82
m/z	306	325	353	354										
%	3.64	1.82	8.18	2.06										

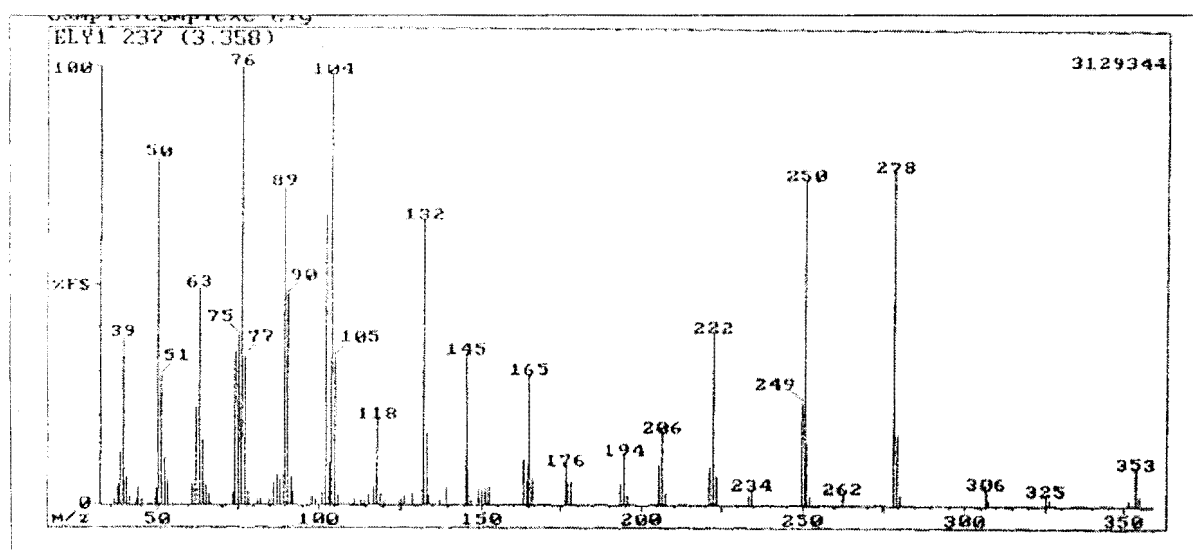


Fig. III.A.23. Spectre de masse du pic à 3.358 min.

Le spectre de masse de ce pic fait apparaître un ion moléculaire de valeur $m/z=353$. Cette valeur impaire d'après la règle de l'azote [74] nous indique, la présence d'un nombre impair d'atome d'azote, très probablement trois (3) apportés par la molécule d'histamine. La formation du complexe est certes prévisible mais la masse molaire de l'ion

moléculaire (M=353) ne correspond pas à celui du dérivé pyrrolinone (M=371 g/mol) attendu (Fig. III.A.24) par substitution de l'oxygène du cycle spiro de la fluorescamine par l'amine primaire de l'histamine. Ce dérivé (pyrrolinone) comme prévu par Udenfriend et Weigele [6-8], a du évoluer pour donner rapidement un autre dérivé fluorophore plus stable et qui par bombardement électronique peut donner un radical cation A⁺ (m/z=353).



Ce nouveau fluorophore est probablement à l'origine de l'émission observée autour de 460 nm ; une valeur qui n'est pas comprise dans le domaine d'émission fixé par Udenfriend et Weigele pour les dérivés de la fluorescamine avec les amines primaires (475-490 nm).

Pour lever cette ambiguïté nous nous sommes intéressés au spectre de masse du pic à 3.358 min (Fig. III.A.23) et au tableau des contributions isotopiques (Tab. III.A.5a et Tab. III.A.5b) afin de déterminer par la méthode d'identification standard de produit inconnu par spectrométrie de masse, la formule du dérivé histamine-fluorescamine mais aussi sa structure probable.

Le tableau III. A.6 nous montre que l'ion moléculaire à m/z=353 est bien le pic correspondant à l'isotope le plus abondant et il conduit à un ion pour m/z=325 par départ d'un groupement carbonyle (C=O).

Comme précédemment, nous considérons ici aussi les ions moléculaires A, A+1 et A+2. Nous normalisons ensuite l'intensité de l'ion moléculaire le plus abondant à 100 puis nous déterminons l'importance relative des autres ions ici A+1 et A+2 par rapport à l'ion A (Tab. III.A.7).

Tab. III.A.7. Abondance relative des ions moléculaires A+1 et A+2 par rapport à l'ion moléculaire A normalisé à 100 du pic à 3.36 min.

Masse	Ion	%	normalisation
353	A	8.18	100
354	A+1	2.06	25.2
355	A+2

Ici nous constatons que le pic en A+2 n'est pas visible, car il a une abondance relative par rapport à l'ion le plus abondant ($m/z=76$) inférieure à 0.2% [74]. Cela signifie aussi qu'il n'existe pas d'autres éléments contribuant à l'isotopie en A+2 en dehors de l'oxygène. Une observation du tableau des contributions isotopiques des carbones et d'hydrogènes (Tab. III.A.5a et Tab. III.5b) nous donnent pour le pic en A+1, 22 carbones (soit 24) et 3 azotes ($0.37 \times 3 = 1.1$) pour la valeur 25.2%. Le nombre d'azote ici trouvé confirme notre hypothèse de 3 atomes d'azotes d'après la règle de l'azote.

D'autre part, il est impossible de déterminer le nombre d'atomes d'oxygène car l'ion A+2 n'est pas visible à cause de son abondance relative faible. Mais il est possible en cherchant le reste en masse $[353 - (22 \times 12 + 14 \times 3)]$ de déduire l'apport en oxygène et en hydrogène. Ce reste est égal à 47 et correspond très probablement à 2 oxygènes + 15 hydrogènes. La formule du pic A est donc $[C_{22}H_{15}N_3O_2]^+$. Cet ion comme nous l'avons dit est un ion provenant de l'isotope le plus abondant et en plus il correspond à l'ion moléculaire $[C_{22}H_{15}N_3O_2]^+$ provenant de la molécule $C_{22}H_{15}N_3O_2$ (Fig. III.A.24).

L'application de l'équation de Pellegrin ($x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1$) à cette molécule $C_{22}H_{15}N_3O_2$ nous donne 17 (insaturations + cycles) ; une valeur qui correspond exactement au nombre réel d'insaturations + cycles obtenus à l'aide de la structure du complexe histamine-fluorescamine que nous obtenons après une étude assistée par le logiciel Chemoffice 2005 du mécanisme de la réaction entre l'histamine et la fluorescamine (Fig. III.A.24).

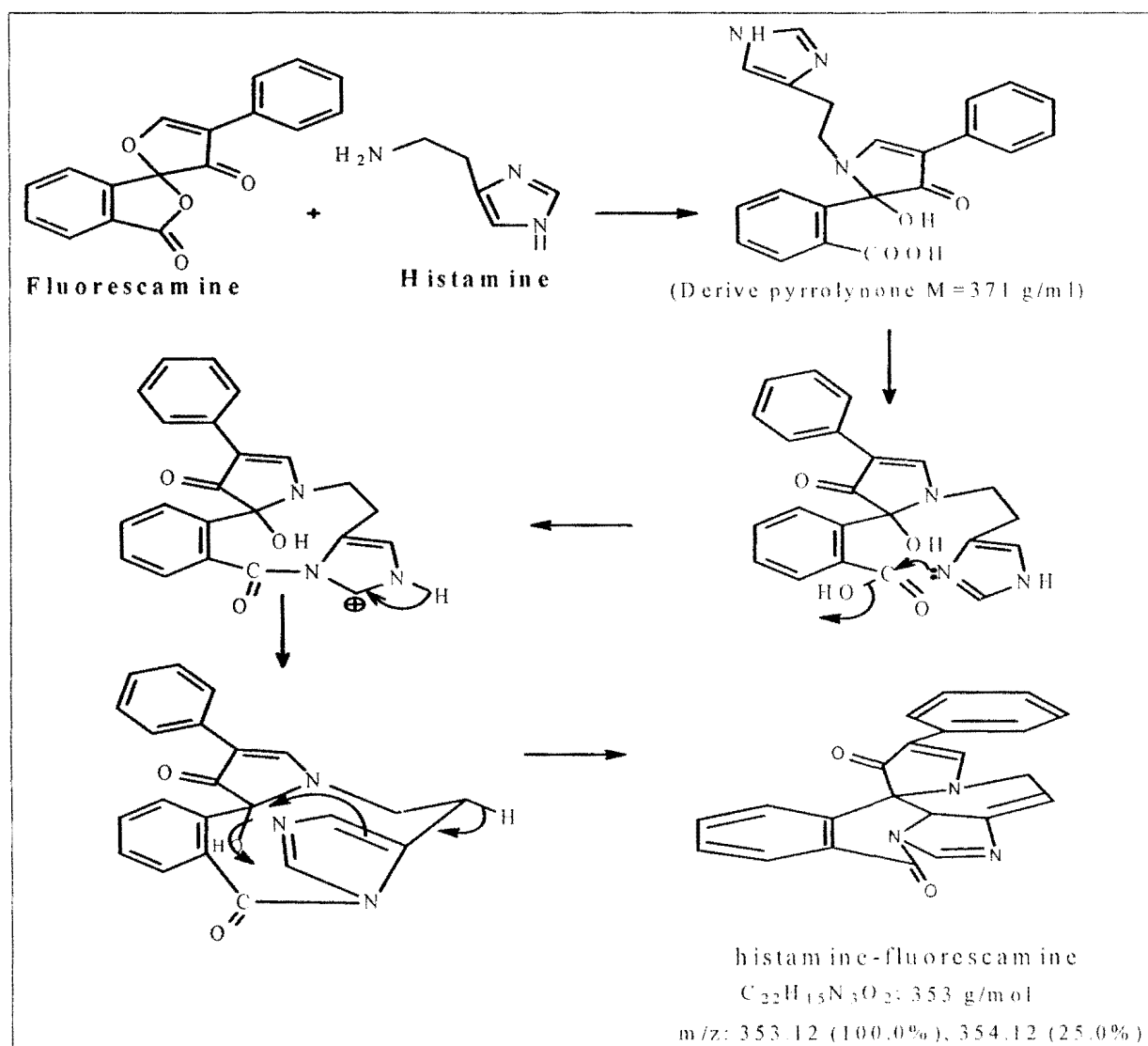


Fig. III.A.24 : Mécanisme de formation du complexe histamine-fluorescamine.

Une simulation avec le logiciel Chemoffice Ultra 2005 du complexe ci-dessus déterminé nous donne 25% pour l'abondance relative de son isotope de masse molaire 354 g. Cette valeur est quasi identique à celle trouvée par l'expérience pour l'isotope à 354 g/mol (25.2 %) du dérivé histamine-fluorescamine.

Chapitre III.B. Effets de solvant

Un solvant est généralement caractérisé par son indice de réfraction n , sa constante diélectrique ϵ et son moment dipolaire μ . Ces trois grandeurs sont en partie responsables de l'effet du solvant sur le signal de fluorescence. L'indice de réfraction (n) renseigne sur l'orientation du moment dipolaire de transition du fluorophore par rapport à sa plus grande dimension ; il donne la nature de la cavité logeant le fluorophore en interaction avec le solvant. La constante diélectrique ϵ renseigne sur les transitions électroniques au sein des molécules du solvant et sur la réorientation de ses molécules autour du fluorophore excité. Le moment dipolaire du solvant μ renseigne sur la polarisation des molécules du solvant et ses interactions avec le fluorophore alors que le moment dipolaire de transition du fluorophore renseigne sur la possibilité de passage d'un état i à un état j (excitation électronique ou émission de fluorescence ou de phosphorescence) au sein de l'analyte.

La compréhension des effets de solvant est donc déterminante dans une étude fluorimétrique car en plus de l'effet général du solvant (effet bathochrome et hypsochrome), le solvant peut exalter ou inhiber (effet hyper ou hypochrome) le signal de fluorescence affectant ainsi la sensibilité du dosage à réaliser [1,38,72,73]. Ainsi, les caractéristiques optiques du solvant (n, ϵ, μ) sont utilisées pour obtenir des renseignements sur la polarité du fluorophore, son environnement mais aussi pour améliorer la sensibilité des méthodes d'analyse.

Dans ce travail nous avons effectué une étude de l'effet général et spécifique des différents types de solvants (protique et aprotique) sur le signal de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine. Ensuite, nous avons réalisé une étude détaillée de l'influence des caractéristiques optiques du solvant (n, ϵ, μ) sur la sensibilité du dosage. Dans le but d'optimiser le milieu réactionnel nous avons étudié les différentes formes d'interactions (sensibilisateur et molécules du solvant, sensibilisateur et radiation incidente, etc.) pouvant interférer dans le dosage de l'histamine.

Enfin, nous avons réalisé une étude de calibration et une application analytique dans les solvants adéquats.

III.B.1. Effet de solvants sur les spectres d'excitation et d'émission

Nous nous proposons d'étudier dans ce paragraphe l'effet de quelques solvants sur les spectres d'excitation et d'émission et sur l'intensité relative du signal de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine. Les résultats obtenus pour les solvants protiques (Tab. III.B.1) et aprotiques (Tab. III.B.2) mènent aux conclusions suivantes :

a) Nous remarquons une relative stabilité du signal du fluorophore dans tous les solvants étudiés à l'exception du cyclohexane (solvant aprotique apolaire dont $\mu=0$) qui inhibe totalement le signal de fluorescence ; puisque nous savons que le fluorophore n'est pas stable dans certains conditions (voir chapitre III.C).

b) L'intensité du signal de fluorescence dans les deux classes de solvant (protique et aprotique) décroît quant la polarité du solvant augmente. Dans tous les solvants prospectés (eau, méthanol, éthanol, butanol, cyclohexane, DMF, DMSO et acétonitrile) l'acétonitrile offre la plus grande sensibilité.

c) Aucun déplacement appréciable des longueurs d'onde analytique maximale d'excitation (λ_{ex}) et d'émission (λ_{em}) n'est observé lorsqu'on passe d'un solvant à un autre, à l'exception du solvant eau. Ces longueurs d'ondes dépendent donc faiblement de l'effet général du solvant (polarité) ; elles dépendent plus des effets spécifiques du solvant (liaisons hydrogène).

Tab. III.B.1. Propriétés spectroscopiques de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine dans les solvants polaires protiques.

Solvant	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	I_F
Eau	380	460	68.6
Méthanol	390	453	84.7
Éthanol	390	453	107.9
Propanol-1	390	452	132.3
Butanol-1	390	452	137.3

Tab. III.B.2. Propriétés spectroscopiques de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine dans les solvants aprotiques polaires et non polaires.

Solvant	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	I_F
Acétonitrile	390	455	160.8
DMSO	390	453	133.4
N,N-DMF	390	452	110
Cyclohexane	390	0	0

III.B.2. Effet solvatochromique et hyperchromique

III.B.2.1. Effet solvatochromique

Nous avons vu (I.A.3) dans la théorie de l'effet général du solvant que les variations du déplacement de Stokes ($\nu_A - \nu_F$) peuvent être décrites par le facteur d'orientation de la polarisabilité Δf du solvant

($\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$). Le premier terme de cette formule est responsable

des déplacements des bandes spectrales d'émission dues à la fois à la réorientation des moments dipolaires des molécules du solvant dans la direction du moment dipolaire du fluorophore excité et à la redistribution des électrons dans les molécules du solvant. Le second terme lui ne décrit que la redistribution des électrons. La différence entre les deux termes contribuera aux déplacements des bandes spectrales dues à la réorientation des molécules du solvant. Ainsi la polarisabilité Δf du solvant

est le résultat de deux phénomènes concomitant : la mobilité des électrons dans le solvant et la réorientation du moment dipolaire des molécules du solvant autour du fluorophore excité.

A partir des résultats obtenus des spectres d'excitation, d'émission et des caractéristiques optiques de chaque solvant (n, ϵ, μ) nous dressons le tableau III.B.3 qui nous permet de tracer le graphe de la figure suivante (Fig. III.B.1).

Tab. III.B.3. Effet du solvant sur le déplacement de Stokes.

Solvant	n	ϵ	μ	ν_A (cm^{-1})	ν_F (cm^{-1})	Δf	$\nu_A - \nu_F$ (cm^{-1})
Eau	1,333	78,40	1.8	26316	21739	0,3199	4577
Méthanol	1,326	33,10	1.76	25641	22075	0,3098	3566
Ethanol	1,361	24,50	1.74	25641	22075	0,2888	3566
Propanol-1	1,385	21,65	1.65	25641	22124	0,2763	3517
Butanol-1	1,399	17,85	1.61	25641	22124	0,2644	3517
Acétonitrile	1,344	37,50	3.45	25641	21978	0,3055	3663
DMSO	1,478	46,70	3.87	25641	22075	0,2635	3566
N,N-DMF	1,431	37,00	4.38	25641	22124	0,2744	3517
Cyclohexane	1,426	2,02	0.00	-----	-----	-0,0016	---

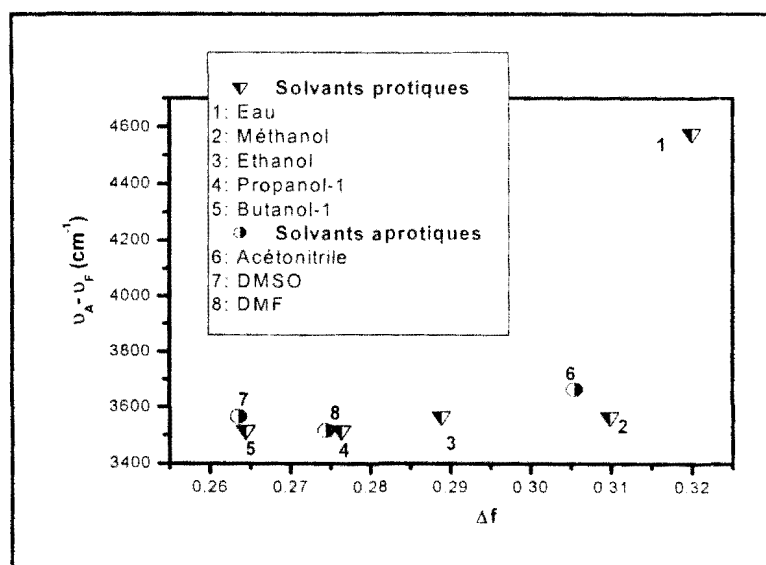


Fig. III.B.1. Effet de la polarité du solvant sur le déplacement de Stokes.

Une linéarité des points est souvent considérée comme une évidence de l'importance dominant de l'effet général du solvant (polarité) sur le déplacement de Stokes. La présence d'effets spécifiques du solvant conduirait à une représentation non linéaire de l'équation de Lippert.

Nos données, bien que limitées à un nombre restreint de solvant montrent que l'effet général du solvant (polarité) gouverne le déplacement de Stokes du fluorophore histamine-fluorescamine dans tous les solvants étudiés à l'exception de l'eau. Dans ce solvant, l'effet spécifique (liaison hydrogène) l'emporte sur la polarité du solvant.

D'autre part, la conservation du même aspect des spectres d'excitation et d'émission dans les différents solvants tant protiques qu'aprotiques écarte toute transformation de structure du fluorophore histamine-fluorescamine à l'état excité.

III.B.2.2. Effet hyper ou hypochromique

Il est clairement démontré que la durée de vie radiative et le rendement quantique de l'émission d'un fluorophore dans le vide

$$\tau_r = \frac{1}{k_r} \quad \text{et} \quad Q_r = \frac{k_r}{k_r + 0} = 1 \quad \text{et} \quad \text{dans} \quad \text{un} \quad \text{solvant} \quad \text{donné}$$

$$\tau_r = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad \text{et} \quad Q_r = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} < 1 \quad \text{sont} \quad \text{différents.} \quad \text{Ces} \quad \text{deux} \quad \text{grandeurs}$$

dépendent certes des propriétés intrinsèques du fluorophore notamment son moment de transition électronique mais aussi des caractéristiques optiques du solvant (n, ϵ, μ). Nous avons vu (I.A.3) que l'impact du solvant sur la sensibilité de l'émission de fluorescence est un effet très important. Cet effet est quantifiable à partir des équations (7) et (8) (I.A.3) qui décrivent la constante de désactivation radiative du fluorophore en fonction des caractéristiques optiques du solvant. D'après l'équation (9), pour une émission spontanée du fluorophore (ce qui est notre cas), la constante de désactivation radiative du fluorophore est $\Gamma = f^2 n \Gamma_0$ avec f une fonction de l'indice de réfraction n . Cette fonction dépend aussi de la

nature de la cavité contenant le fluorophore donc des caractéristiques du solvant.

III.B.2.2.1. Effet de l'indice de réfraction

Dans une description classique de l'interaction de la lumière considérée comme une onde électromagnétique et de la matière considérée comme un dipôle oscillant en se fondant sur les équations de Maxwell dans le solvant considéré comme un diélectrique, on obtient une expression de l'indice de réfraction ($V_{\phi} = \frac{C}{n}$) permettant une interprétation qualitative de ces effets.

Avec C la vitesse de la lumière dans le vide et V_{ϕ} sa vitesse de phase dans un solvant.

L'indice de réfraction agit sur une radiation lumineuse selon le solvant en augmentant ou en diminuant sa vitesse de phase. Les conséquences d'un tel effet sur l'émission de fluorescence seront cherchées dans l'équation (9) qui peut être réécrite en tenant compte du fait que f est une fonction de n. $\Gamma = f^2 n \Gamma_0 = G(n) \Gamma_0 \epsilon_0$ **(11)**.

- Pour une cavité dans un milieu idéal qui est un milieu imaginaire où la molécule et le solvant occupent le même volume, $f=1$.

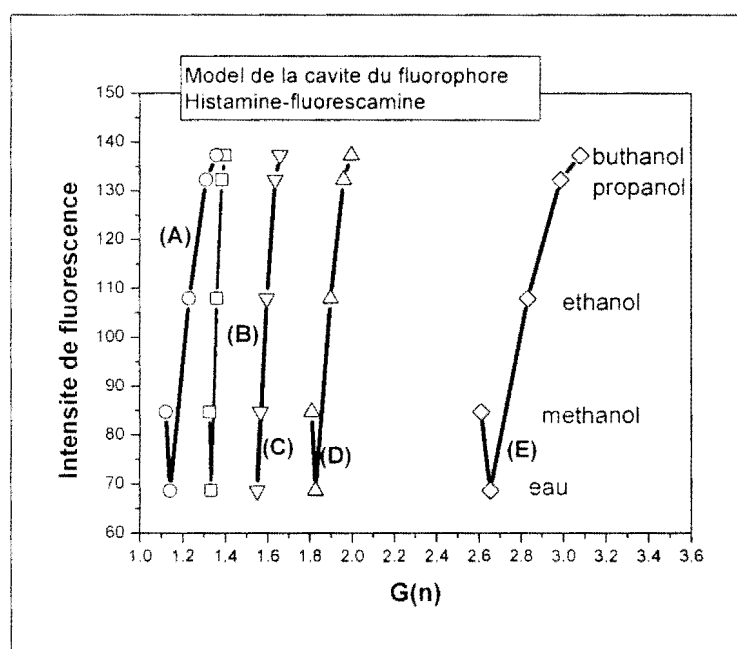
- Pour une cavité virtuelle (Model de Lorentz) où le solvant est à l'intérieur et à l'extérieur de la cavité logeant le fluorophore, $f = \frac{n^2 + 2}{3}$.

- Pour une cavité sphérique vide décrivant le cas réel d'un fluorophore dans un solvant occupant tout le volume du milieu à l'exception de la cavité contenant le fluorophore, $f = \frac{3n^2}{2n^2 + 1}$.

- Pour une cavité ellipsoïdale vide décrivant aussi le cas réel des fluorophores, $f = \frac{n^2}{[(1 - L_{\mu})n^2 + L_{\mu}]}$. Avec $L_{\mu} = L_x, y$ ou z selon que le moment dipolaire de transition du fluorophore soit orienté suivant l'axe des x, y ou z. La grandeur L_{μ} prend des valeurs comprises entre 0 et 1 : Pour une cavité sphérique $L_{\mu} = 1/3$. Si la cavité logeant le fluorophore est ellipsoïdale

et que le moment dipolaire de transition du fluorophore est parallèle à sa longueur, alors $L_{\mu} < 1/3$. Si le moment dipolaire est parallèle à sa largeur, alors $L_{\mu} > 1/3$.

Il apparaît clairement qu'en fonction de la cavité considérée, l'indice de réfraction d'un milieu joue un rôle important sur le processus de désactivation radiative. Ce dernier étant proportionnel à l'intensité relative de fluorescence I_F du fluorophore, une représentation graphique de I_F en fonction de $G(n)$ dans les divers solvants étudiés (Tab. III.B.1, Tab. III.B.2. et Tab. III.B.3) nous renseignera de l'influence de l'indice de réfraction sur la fluorescence du complexe histamine-fluorescamine (Fig. III.B.2).



(A): model imaginaire

(B): model virtuel

(C): model ellipsoïdal avec moment dipolaire de transition orienté suivant le grand axe du fluorophore

(D): model sphérique

(E): model ellipsoïdal avec moment dipolaire de transition orienté suivant le petit axe du fluorophore

Fig. III.B.2. Nature de la cavité logeant le fluorophore histamine fluorescamine.

Le graphe de la figure III.B.2 a été tracé pour 5 différents modèles de cavité. Nous présentons seulement les résultats obtenus avec les solvants protiques étant donné que les solvants aprotiques nous permet pas de tirer une conclusion. Il apparaît clairement que c'est le modèle (C) de la

cavité ellipsoïdale avec $L_{\mu} < 1/3$ ($L_{\mu} = 1/6$) qui décrit bien le comportement du complexe histamine-fluorescamine en solution.

III.B.2.2.2. Effet de la constante diélectrique ϵ sur la fluorescence

La constante diélectrique ϵ du solvant lié à sa polarité peut exercer des effets hyper ou hypochromique sur le signal de fluorescence d'un fluorophore. En effet, une étude des variations de l'intensité de fluorescence relative (I_F) du complexe histamine-fluorescamine dans les solvants étudiés en fonction de ϵ permet de voir une certaine corrélation entre les différents solvants.

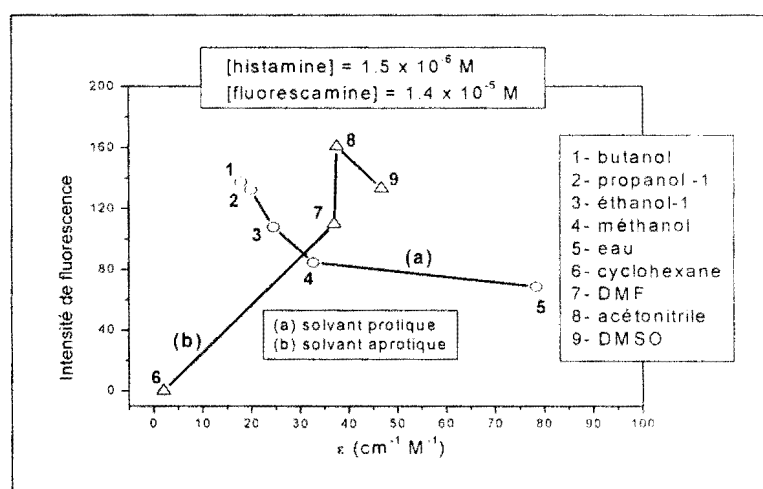


Fig. III.B. 3. Effet de la constante diélectrique ϵ du solvant sur le signal de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine.

Dans les solvants polaires protiques (courbe a, Fig. III.B.3) le signal de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine décroît avec ϵ tandis que dans les solvants aprotiques prospectés (courbe b, Fig. III.B.3) le signal passe par un maximum obtenu dans l'acétonitrile. La constante diélectrique ϵ du solvant peut à la lumière de cette étude, servir d'outil de choix du solvant pour le dosage de l'histamine par la fluorescamine.

III.B.2.2.3. Effet du moment dipolaire sur la fluorescence

Un fluorophore polaire interagit avec les molécules du solvant si elles sont polaires. Cela entraîne dans certains cas des effets secondaires de solvant notamment la formation de complexe avec les molécules du

solvant, la formation de liaison hydrogène, etc. Ces effets ont pour conséquences en plus des déplacements de bandes d'émission, une exaltation ou une inhibition du signal de fluorescence.

Pour ce qui est du complexe histamine-fluorescamine, dans les solvants polaires protiques et aprotiques, l'intensité de fluorescence relative I_F diminue quand le moment dipolaire augmente (Fig. III.B.4). Le moment dipolaire peut donc être un critère de choix du solvant lors du dosage de l'histamine par la fluorescamine.

De tous les solvants protiques et aprotiques utilisés l'acétonitrile offre les meilleures conditions de sensibilité. Dans les solvants protiques la baisse du signal est probablement liée aux liaisons hydrogène entre le fluorophore excité et les molécules du solvant ce qui entraîne des interactions avec cet état et par conséquent l'expose plus longtemps aux autres processus de désactivations non radiatives. Ainsi plus les liaisons hydrogènes sont fortes (butanol, propanol, éthanol, méthanol et l'eau) plus le signal de fluorescence du complexe est inhibé.

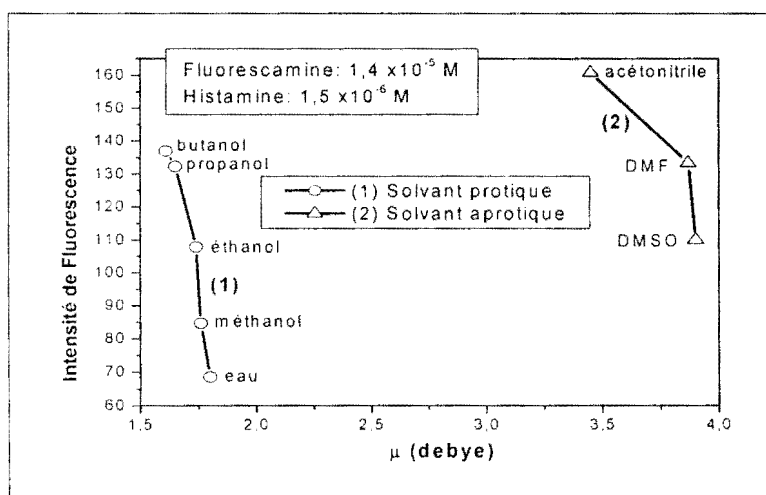


Fig. III.B.4. Effet du moment dipolaire du solvant sur le signal de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine.

III.B.3. Interaction solvant-sensibilisateur

La fluorescamine fraîchement préparée dans l'acétonitrile ne présente pas de signal de fluorescence mais à concentration élevée la fluorescamine est faiblement fluorescente dans l'acétonitrile. Une solution de fluorescamine dans l'acétonitrile évolue aussi avec le temps. Dans d'autres solvants tels que le méthanol et l'éthanol on n'observe pas d'évolution du signal de fluorescence dans le temps (Fig. III.B.5).

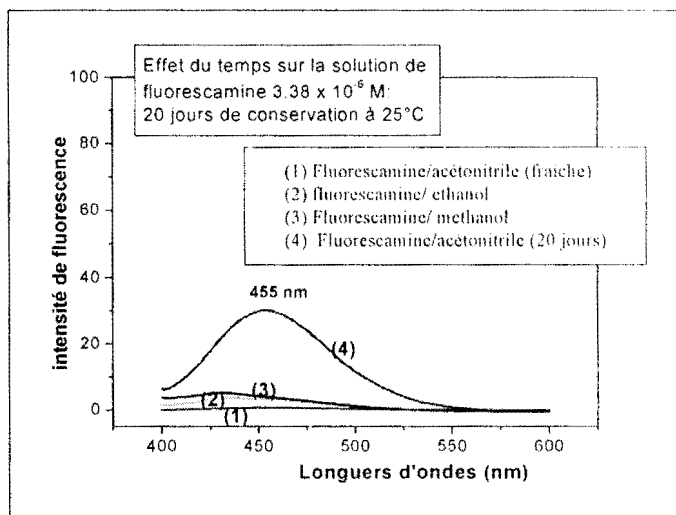


Fig. III.B. 5. Effet du temps sur la fluorescamine préparée dans l'acétonitrile.

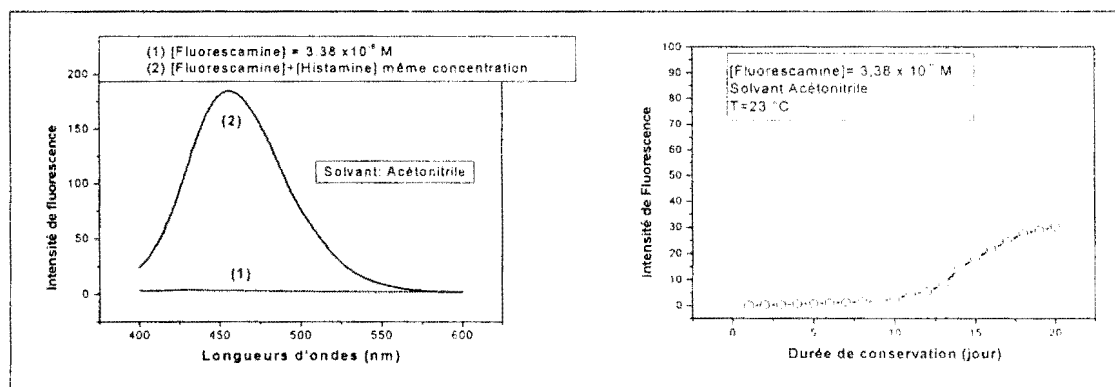


Fig. III.B.6. Emission relative du signal de la fluorescamine dans l'acétonitrile dans l'intervalle $t=0-20$ j

Il est donc souhaitable de travailler avec une solution fraîche (10 jours au maximum) faiblement concentrée en fluorescamine. En effet lorsqu'on utilise des concentrations autour de 10^{-6} M, le signal est quasi nul (courbe 1, fig. III.B.6), mais une conservation de la même solution à la

température ambiante se traduira par l'apparition d'un signal de fluorescence à 450 nm qui augmente avec le temps (Fig. III.B.6).

III.B.4. Effet de l'irradiation de la lampe en Xénon

Dans le cadre d'un dosage spectrofluorimétrique à irradiation continue, il est important de connaître l'effet de l'irradiation sur le complexe fluorophore car dans certains cas, il est possible qu'elle entraîne la dégradation du fluorophore ou sa transformation. Ces phénomènes engendrent dans certains cas d'autres agrégats fluorophores, par suite de l'interaction avec les molécules du milieu réactionnel, pouvant émettre dans la même zone que l'analyte.

Pour éviter tous ces problèmes surtout dans le cadre de l'étude cinétique, qui suppose laisser l'échantillon pendant un temps sous la lampe (10 à 60 min), nous avons soumis à irradiation continue les solutions de fluorescamine dans nos différents solvants les plus utilisés (méthanol, éthanol et acétonitrile) (Fig. III.B.7). Alors que la solution d'éthanol est presque insensible à une irradiation continue, nous notons une légère variation du signal dans le méthanol et l'acétonitrile.

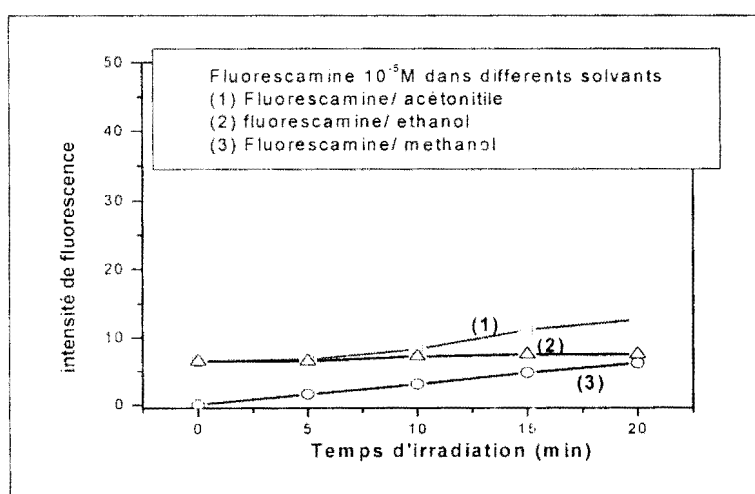


Fig. III.B.7. Effet de l'irradiation continue sur la fluorescamine dans divers solvants.

Une étude comparative dans l'acétonitrile d'une solution acétonitrile-fluorescamine et acétonitrile-fluorophore (Fig. III.B.8) démontre que l'augmentation du signal est liée à une interaction entre le solvant et l'excès du sensibilisateur à 450 nm. Dans ce solvant (acétonitrile) il est souhaitable de ne pas laisser le mélange solvant sensibilisateur sous une longue irradiation sinon déduire la valeur du signal du solvant.

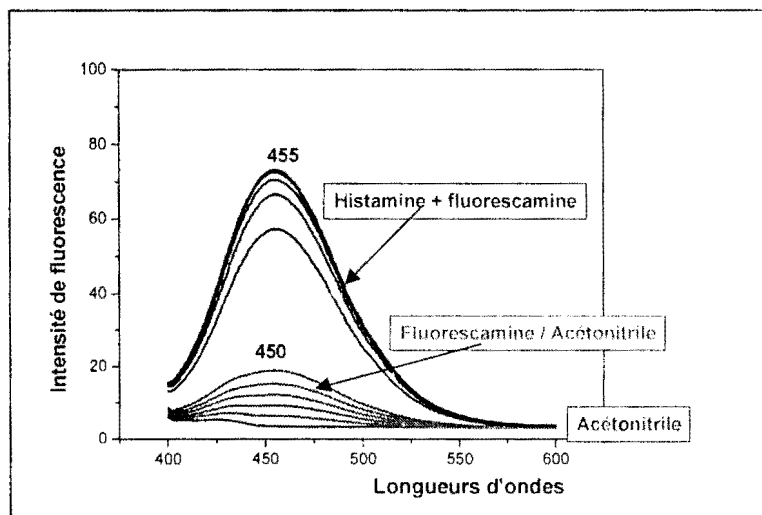


Fig. III.B.8. Spectres d'émission du fluorophore et de la fluorescamine sous irradiations de 10 min chacun.

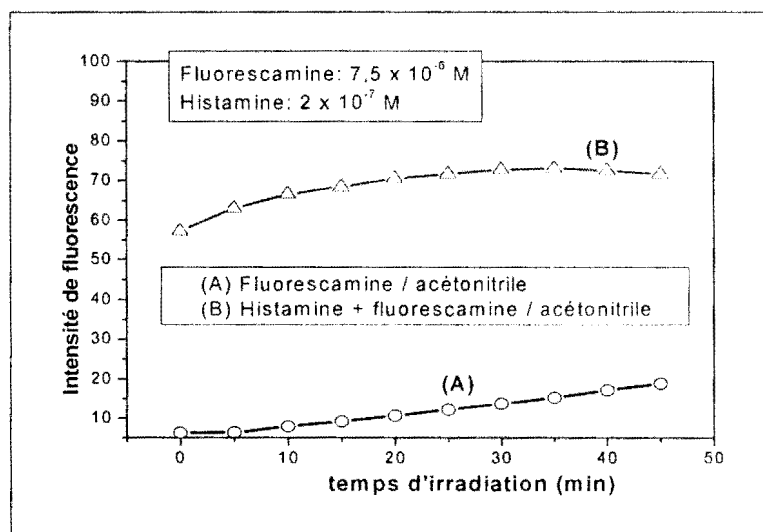


Fig. III.B.9. Effet de l'irradiation sur la fluorescamine seule dans l'acétonitrile (A) et sur le complexe histamine-fluorescamine dans l'acétonitrile (B).

La variation du signal de fluorescence est identique dans les deux cas (A et B, Fig. III.B.9) : à savoir, l'irradiation dans le cas du solvant

(fluorescamine dans l'acétonitrile) et de celui du complexe histamine-fluorescamine dans l'acétonitrile. L'augmentation du signal observé est donc liée à une interaction entre le surplus de fluorescamine et le solvant acétonitrile. Le signal du complexe seul est insensible à une irradiation continue.

III.B.5. Calibration pour le dosage de l'histamine

Trois solvants sont retenus : l'eau pour son coût et le fait que l'échantillon réel soit extrait en solution aqueuse ou semi-aqueuse, l'acétonitrile à cause de la très grande sensibilité du signal de fluorescence dans ce milieu et l'éthanol qui a l'avantage par rapport au méthanol de ne pas interagir avec la fluorescamine.

III.B.5.1. Calibration dans l'eau

La réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine dans l'eau est quasi instantanée ($t_{1/2}=0,1-0,5$ s) ; la procédure de condensation est la suivante : à 0,3 ml d'une solution de fluorescamine ($3,52 \times 10^{-3}$ M) préparée dans l'acétonitrile, nous ajoutons de manière croissante un volume V (μl) [10-200 μl] d'une solution d'histamine 3×10^{-5} M dans l'eau, puis après agitation nous complétons à 5 ml avec de l'eau, avant de mesurer le signal de fluorescence. Une courbe de calibration ($\log I_F = 9,02 + 1,17 \times \log C$) avec un coefficient de corrélation proche de l'unité a été obtenue (fig. III.B.10) par la méthode de dosage répétitive.

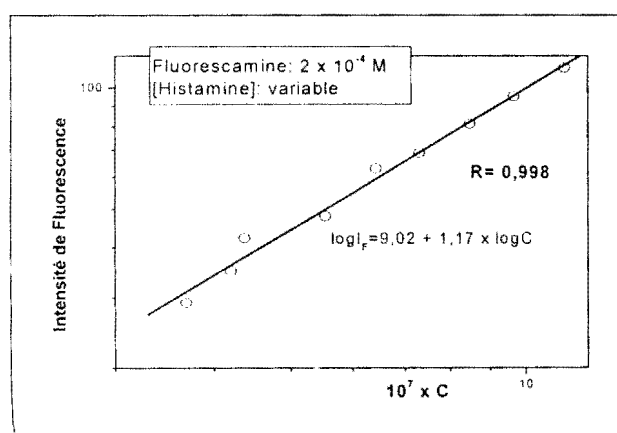


Fig. III.B. 10. Courbe de calibration dans l'eau.

III.B.5.2. Calibration dans l'acétonitrile

La réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine est aussi instantanée dans l'acétonitrile. Ainsi, à 0,3 ml d'une solution de fluorescamine $3,52 \times 10^{-3}$ M préparée dans l'acétonitrile, nous ajoutons de manière croissante un volume V (μl) [10-80 μl] d'une solution d'histamine 3×10^{-5} M préparée dans le mélange acétonitrile-eau 90 :10 (v/v) obtenue à partir d'une solution 3×10^{-2} M d'histamine dans l'eau. Après agitation, nous complétons à 5 ml avec de l'acétonitrile, avant la mesure du signal de fluorescence. Une courbe de calibration ($\log I_F = 10,6 + 1,23 \times \log C$) avec un coefficient de corrélation proche de l'unité a été obtenue (Fig. III.B.11) par la méthode répétitive.

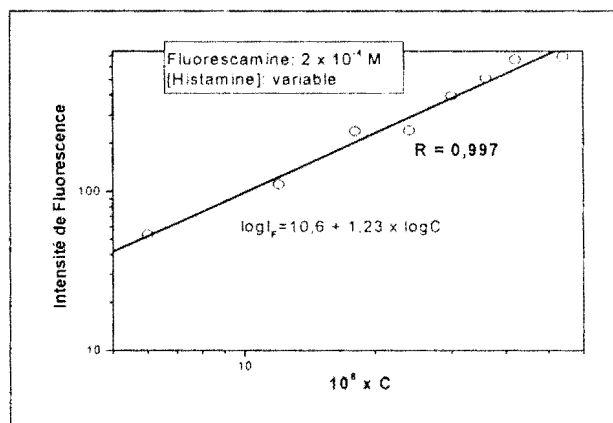


Fig. III.B. 11. Courbe de calibration dans l'acétonitrile.

III.B.5.3. Calibration dans l'éthanol

La réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine n'est pas instantanée dans l'éthanol ; elle évolue lentement et n'est effective que autour de 25 min de réaction. Cela exclut l'utilisation d'un échantillon d'histamine extrait avec l'eau à cause de la réaction d'hydrolyse de la fluorescamine qui, étant très rapide, l'emportera sur la formation du complexe histamine-fluorescamine.

Afin de prospecter ce milieu qui ne présente pas d'interaction avec notre sensibilisateur nous avons fait la dissolution de l'histamine dans le méthanol puis nous avons complété à l'éthanol. Chaque point est obtenu à

partir de 0,3 ml fluorescamine ($5,3 \times 10^{-3}$ M) dans l'éthanol auquel nous avons ajouté V (μ l) [10-100 μ l] d'histamine (3×10^{-5} M) préparée dans le mélange éthanol-méthanol 90 :10 (v/v). Après 25 min d'attente nous complétons à 5 ml par l'éthanol. Comme pour les deux études précédentes une courbe de calibration ($\log I_F = 9,33 + 1,06 \times \log C$) linéaire a été obtenue par la méthode répétitive (Fig. III.B.12).

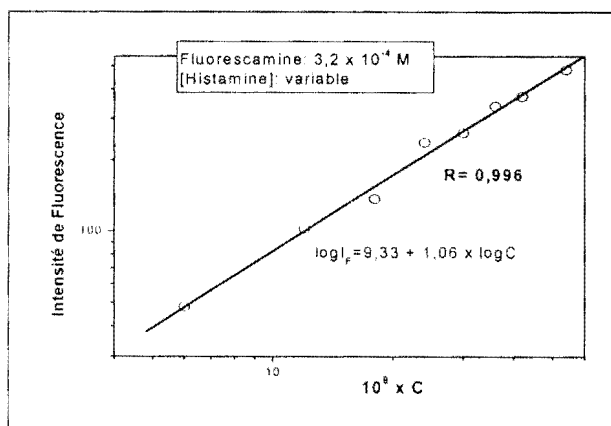


Fig. III.B.12. Courbe de calibration dans l'éthanol.

III.B.6. Analyse d'échantillons réels

Nous avons réalisé une extraction de l'histamine dans du poisson acheté à un marché local (Gueule Tapée, Dakar) selon la méthode d'extraction décrite dans la partie expérimentale.

III.B.6.1. Solvant eau

Après la procédure d'extraction, nous mélangeons 0,6 ml de fluorescamine 10^{-3} M (acétonitrile) avec 1ml d'histamine de poisson (eau+acétonitrile, 25 :75 v/v) puis après agitation, nous ajoutons 0.25 ml d'acétonitrile avant de compléter à l'eau à 5 ml avec de l'eau distillée. Les résultats de 3 essais sont présentés ci-après.

IF	38,9	38,9	38,8
$10^7 \times C_{\text{més}}$	4,46	4,46	4,45

$$C_{\text{hist j poisson}} = (4,46 \pm 0,01) \times 10^{-7} M \quad \text{soit} \quad (23,24 \pm 0,05) \mu g / g \text{ de produit.}$$

III.B.6.2. Solvant acétonitrile

Dans une fiole de 10 ml nous introduisons 1 ml de la solution d'histamine de poisson dans l'eau, puis nous complétons à 10 ml avec l'acétonitrile afin de réduire l'effet de l'eau et d'obtenir une solution finale d'histamine avec 10 % d'eau lors de la réaction de condensation avec la fluorescamine. Par suite, nous mélangeons 0,6 ml de fluorescamine 10^{-3} M (acétonitrile) avec 1 ml histamine de poisson (eau-acétonitrile, 10 :90, v/v), puis après agitation nous complétons à 5 ml avec de l'acétonitrile avant la mesure.

I_F	42,5	44,4	43,5
$10^7 \times C_{\text{mesurée}}$	5,08	5,27	5,18

$$C_{\text{hist / poisson}} = (5,18 \pm 0,1) \times 10^{-7} M \quad \text{soit} \quad (27,56 \pm 0,5) \mu g / g \text{ de produit.}$$

III.B.6.3. Solvant éthanol

Le fait que l'histamine soit extraite en solution purement aqueuse ou semi- aqueuse fait en sorte qu'il est impossible de faire une quantification de l'histamine avec la fluorescamine dans le solvant éthanol. Des essais montrent que le signal est quasi inhibé dans ce milieu.

Dans l'éthanol pur, pour des raisons économiques un test est à écarter à cause surtout de la durée car le dosage d'un échantillon réel prendra plus de 6 heures.

III.B.7. Performance Analytique

Dans ce tableau (Tab. III.B.4) nous présentons les performances analytiques de notre méthode après optimisation du solvant pour le dosage de l'histamine en utilisant la fluorescamine comme sensibilisateur en milieux organique et aqueux.

Tab. III.B.4. Performance analytique du dosage de l'histamine avec la fluorescamine en milieux organique et aqueux.

Solvant	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	r^a	C^b ($\mu\text{g/g}$)	LD^c (ng/ml)	LQ^d (ng/ml)	LAD^e (ng)
Eau	380	460	0,998	23,24 \pm 0,05	34,5	103.5	345
Acétonitrile	390	455	0,997	27,56 \pm 0,5	4,43	13	44
Ethanol	390	453	0,996	0,6	2	6

^a Coefficient de corrélation de la courbe de calibration

^b Concentration d'histamine déterminée dans les poissons du marché local

^{c,d} Limite de détection (LD) et Limite de quantification (LQ), définie comme étant la concentration d'analyte donnant un rapport signal/bruit de fond respectivement égal à 3 et 10.

^e Limite Absolue de détection (LAD), calculé en utilisant un volume de 2.5 ml.

Conclusion

L'optimisation des conditions opératoires (solvant, sensibilisateur, temps d'irradiation) a permis d'obtenir des courbes de corrélation linéaire pour le dosage de l'histamine dans l'eau et l'acétonitrile. Ces solvants sont choisis pour des raisons d'efficacité et de coût. Des limites de détection comprises entre 4,4 et 35 ng/ml sont obtenues.

Une analyse des poissons achetés dans un marché local a permis de déceler des teneurs d'histamine autour de 25,4 \pm 0,3 $\mu\text{g/g}$ de chair. Une valeur qui est en deçà du seuil international de tolérance (100 $\mu\text{g/g}$ de chair) pour les produits halieutiques, mais qui interpelle quand même les commerçants pour une amélioration des conditions de conservation de ces produits.

Chapitre III.C. Dosage en solutions tensioactives

L'un des enjeux principaux des méthodes fluorimétriques concerne l'amélioration de la sensibilité. En effet, de nombreux travaux [76-78] ont été consacrés à l'évaluation des différents moyens instrumentaux par lesquels la sensibilité des méthodes fluorimétrique peut être augmentée. L'usage du détecteur à compteur de photon unique, les sources d'excitations laser et les techniques basées sur le fibre optique apparaissent comme étant plus pratiques, mais nécessitent un appareillage sophistiqué de coût généralement assez élevé pour les pays du sud. Ainsi, il serait plus intéressant de disposer d'une alternative simple et moins onéreuse qui permettrait d'arriver aux mêmes résultats. Ce chapitre traitera essentiellement d'une telle approche basée sur les systèmes micellaires.

A l'origine, l'intérêt suscité par les micelles concernait essentiellement leur utilisation comme modèle de membrane pour l'étude d'une variété de processus biologiques [41]. Initialement, la technique de fluorescence a été utilisée pour étudier la structure, les propriétés de micellisation et la dynamique de tels systèmes [41,77,78] ; plus tard il a été découvert que certaines molécules surfactants, telles que le sulfate dodécyle de sodium (SDS) solubilisent sélectivement par formation d'agrégats de micelles en solution, de nombreux composés luminophores, entraînant ainsi une exaltation de leur signal de fluorescence [41]. Des études ont montré que les micelles assuraient la protection du premier état excité contre divers processus d'inhibition ou de désactivation non radiative. Cela a eu pour conséquence l'exaltation du signal de fluorescence par des facteurs de 2 à 150 ou une amélioration des limites de détection par des facteurs de 1,5 à 100. En dépit de l'importance analytique de ces résultats, il n'existe pas à notre connaissance d'applications analytiques concernant le dosage de l'histamine en milieux micellaires.

Dans ce chapitre, nous étudierons l'effet de trois types de micelles sur le complexe histamine-fluorescamine en milieu aqueux et organique dans le but d'obtenir une voie simple et efficace de dosage de l'histamine dans les produits halieutiques et dérivés. Dans cette étude nous avons utilisé 3 types de micelles (le SDS, anionique ; le CTAC, cationique ; et le Brij-700, neutre).

III.C.1. Dosage en solution micellaire aqueuse

III.C.1.1. Effet du solvant micellaire sur les spectres

Une solution d'histamine 10^{-3} M dans le mélange (eau-méthanol, 25 :75 v/v) et une solution de fluorescamine $3,2 \cdot 10^{-3}$ M dans l'acétonitrile sont préparées. Les solutions micellaires Brij-700 10^{-3} M, SDS 0,1 M et CTAC 0,756 M sont préparées dans l'eau distillée.

A partir de ces solutions, nous mélangeons volume à volume 0,1 ml d'histamine et 0,312 ml de fluorescamine dans une fiole de 10 ml, puis nous complétons à 10 ml par de l'eau distillée. Par suite, 2 ml de cette solution est prélevée dans une fiole de 5 ml auquel nous ajoutons le volume requis pour chacun des 4 solvants (eau et solution aqueuses de Brij-700, SDS et CTAC) permettant d'obtenir une concentration finale micellaire de Brij-700 10^{-4} M, SDS 0,05 M et CTAC 0,4 M, valeurs correspondants aux concentrations optimales.

Mis à part le CTAC pour lequel on note un déplacement des 2 bandes spectrales, tous les autres systèmes de solvant ont les mêmes longueurs d'ondes d'excitations et d'émission (Fig. III.C.1). Les longueurs d'onde suivantes ont été retenues comme longueurs d'onde analytiques : $\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ pour l'eau et les solutions aqueuses de Brij-700 et de SDS. Dans la solution aqueuse de CTAC, $\lambda_{ex} = 385 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 458 \text{ nm}$

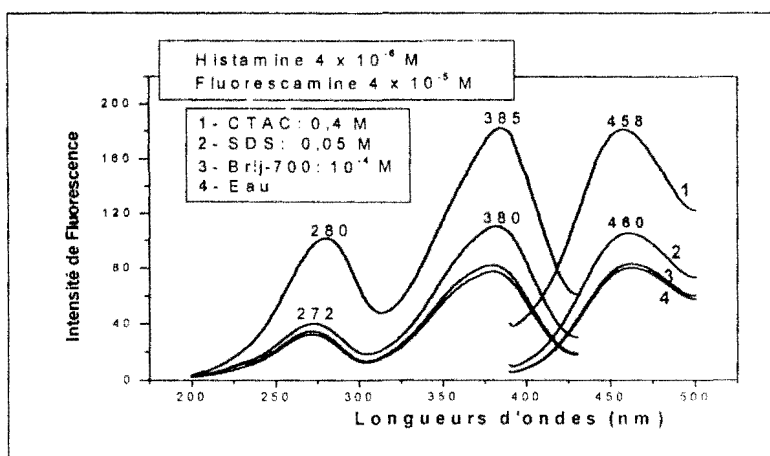


Fig. III.C.1. Spectre d'excitation et d'émission du complexe histamine-fluorescamine dans les différents milieux étudiés.

III.C.1.2. Optimisation des conditions opératoires

III.C.1.2.1. Optimisation du pH en solution micellaire aqueuse

Le pH est un facteur affectant aussi bien l'intensité de fluorescence que la cohésion des micelles. Il est donc important de bien connaître son impact sur l'émission de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine dans les différents solvants étudiés.

Les résultats obtenus dans les différents systèmes de solvant (Fig. III.C.2) montrent que les courbes de variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH ont des allures différentes selon le solvant employé. En effet, les solvants neutres (eau, brij-700) présentent un signal de fluorescence intense pour une gamme de pH assez large, comprise approximativement entre 4 et 11 ; tandis que pour les surfactants ioniques (SDS et CTAC), la courbe $I_F=f(pH)$ est caractérisée par des maxima bien définis obtenus pour des valeurs de pH 1,44 et 1,13 respectivement pour le SDS et le CTAC.

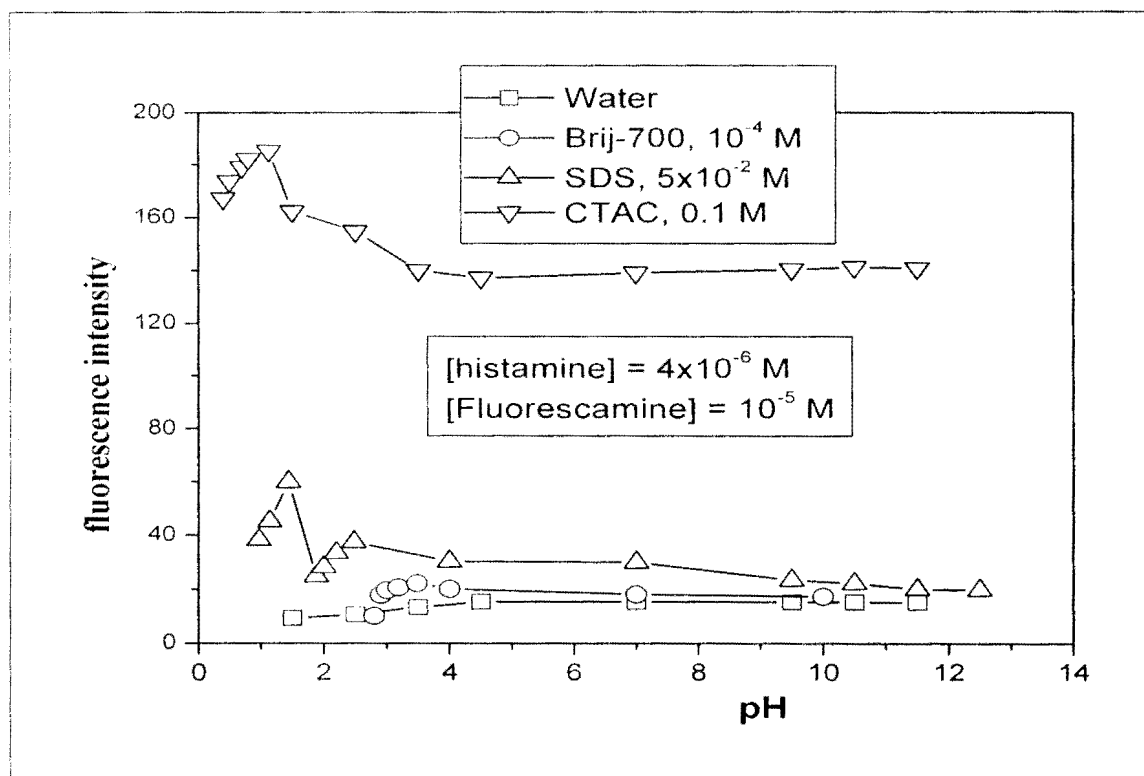


Fig. III.C.2. Effet du pH sur l'émission de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine dans les différents milieux.

Toutefois, pour tous ces systèmes de solvants, l'étude précédente ne révèle pas l'information majeure au sujet de la stabilité relative du complexe formé, puisque ces courbes ont été enregistrées en des temps relativement courts pour chaque valeur de pH. Pour avoir plus d'information sur la stabilité du complexe formé, une étude cinétique a été développée.

III.C.1.2.2. La stabilité du complexe (Etude cinétique)

Les résultats (fig. III.C.3) montrent que le complexe formé est relativement stable dans l'eau et les solutions aqueuses micellaires de brij-700 et de SDS à pH=10 ; tandis que pour le CTAC, une décroissance continu du signal avec le temps est observé.

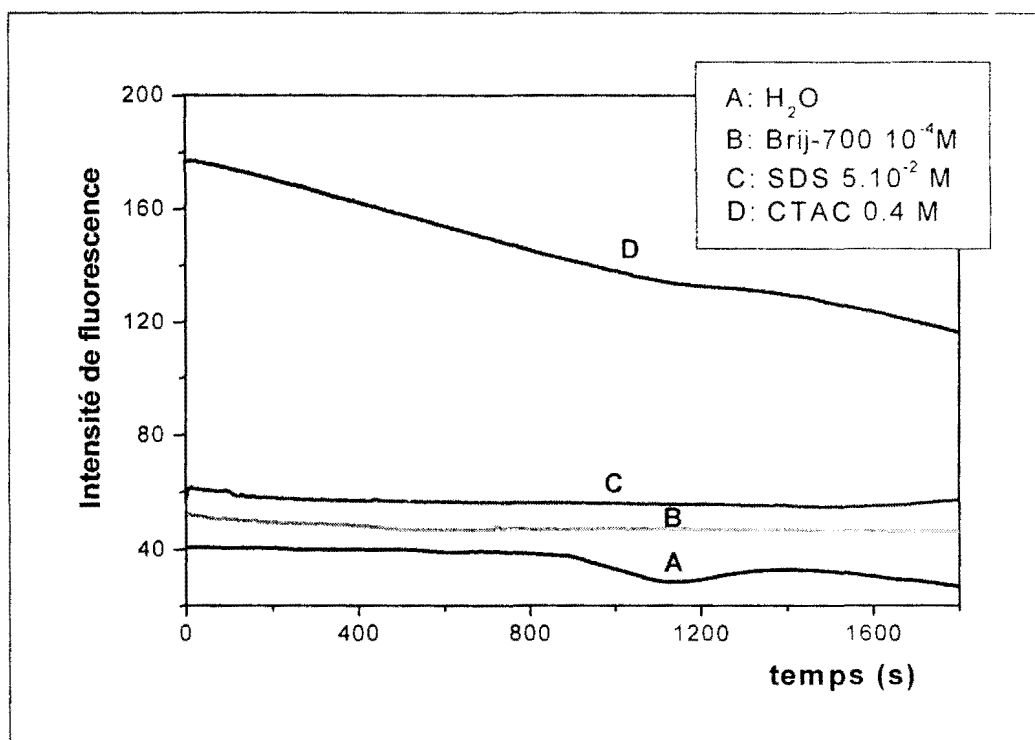


Fig. III.C.3. Cinétique du complexe histamine-fluorescamine en solution micellaire à pH=10.

Cette décroissance nous conduit à étudier l'effet du pH sur la stabilité du complexe en solution aqueuse micellaire de CTAC (Fig. III.C.4). Nous avons ainsi fait la cinétique en solution micellaire CTAC en milieu alcalin (courbe 1, Fig. III.C.4); afin de faire une juste comparaison nous avons maintenu la même solution que nous avons neutralisée afin de faire une cinétique en milieu NaCl neutre (courbe 2, Fig. III.C.4); ensuite nous l'avons acidifiée afin d'étudier la cinétique en milieu acide (courbe 3, Fig. III.C.4).

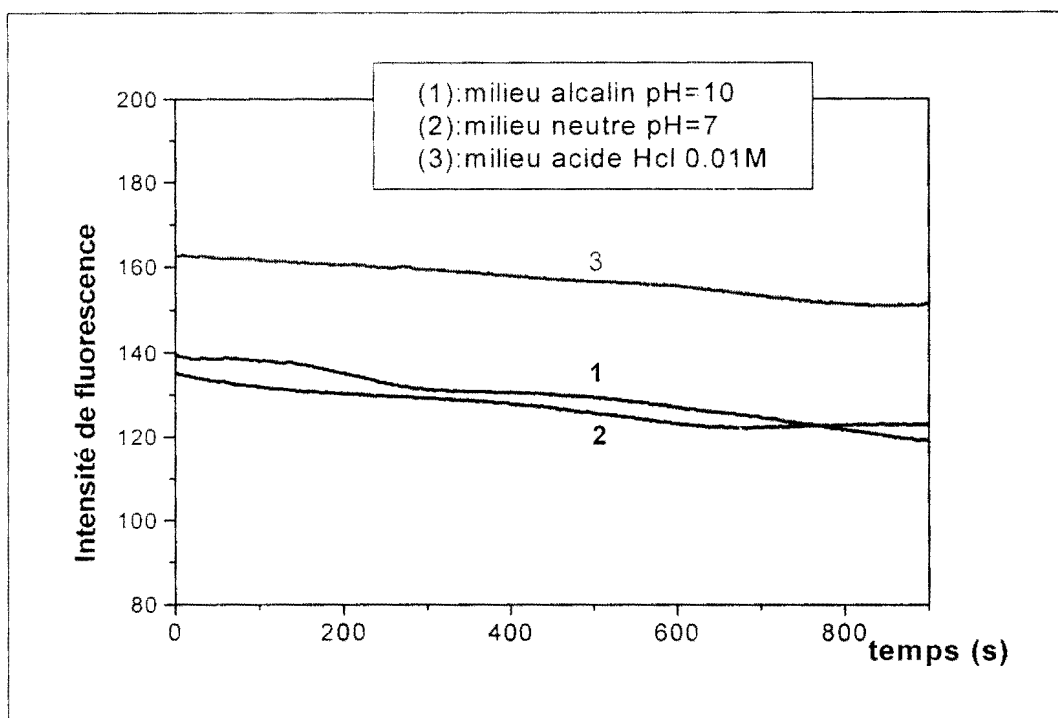


Fig. III.C.4. Effet du pH sur la stabilité du fluorophore en milieu micellaire de CTAC.

Le complexe excité est moins stable dans la solution alcaline que dans la solution neutre NaCl, mais plus stable dans la solution acide HCl qui exalte en plus l'émission de fluorescence. Une étude en solution micellaire de CTAC en milieu acide stabilise donc le complexe excité histamine-fluorescamine. Les conditions optimales analytiques sont résumées dans le Tab. III.C.1.

Tab. III.C.1. Optimisation des conditions analytiques pour le dosage de l’histamine par la fluorescamine.

Solvant ^a		$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm) ^b	pH	Stabilité du Complexe
Milieu aqueux	H ₂ O	380/460	7	jusqu'à 15 min
	brij-700	380/460	10	oui
	SDS	380/460	10	oui
			1.44	faible
	CTAC	387/458	10	faible
			1.13	moyenne
Milieu acetonitrile	CTAC	387/458	neutre	oui
			acide	faible

^a Concentrations micellaire : [Brij-700]= 10^{-4} M, [SDS]=0.05 M, [CTAC]=0.4 M.

^b Longueurs d’onde d’excitation (λ_{ex}) et d’émission (λ_{em}) maximum pour les spectres.

III.C.1.2.3. Effet de la concentration micellaire

En solution aqueuse les micelles sont des micro-environnements capables de solubiliser sélectivement de nombreux solutés hydrophobes, ce qui entraîne souvent une exaltation du signal de fluorescence d’un soluté fluorophore. Des études ont montré qu’une concentration élevée en monomères de tensioactifs accentue l’effet micellaire. Comme l’étude par dosage répétitif est pénible, la recherche d’une nouvelle méthode de dosage moins contraignante comme par exemple la méthode de dilution demande une connaissance préalable de l’effet de la variation de la concentration micellaire qui pourrait être induite par dilution sur les concentrations analytiques optimales à utiliser : Brij-700 (10^{-4} M) SDS ($5 \cdot 10^{-2}$ M) et CTAC (0,4 M).

III.C.1.2.3.1. Effet de la variation de la concentration de Brij-700

Pour une concentration fixe en histamine et fluorescamine (Fig. III.C.5), la variation de la concentration du Brij-700 autour de la concentration d’étude (10^{-4} M) n’affecte pas le signal d’émission du

complexe histamine-fluorescamine. Il sera donc possible d'utiliser la méthode de dilution au cours de laquelle, seule la concentration du complexe formé restera fonction de l'intensité de fluorescence.

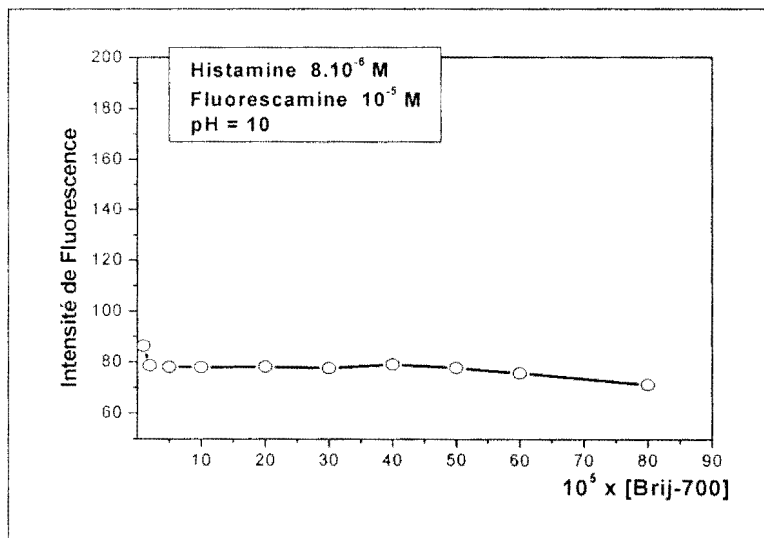


Fig. III.C.5. Influence de la concentration de brij-700 sur la fluorescence du complexe histamine-fluorescamine formé.

III.C.1.2.3.2. Effet de la concentration de SDS

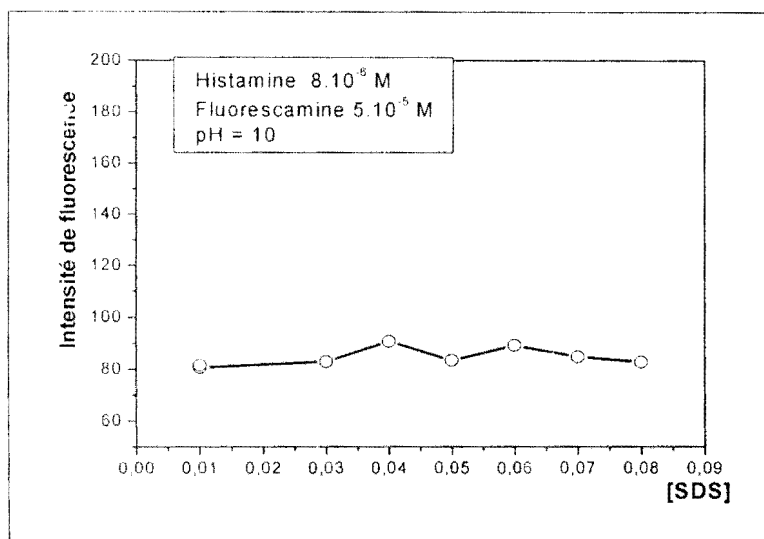


Fig. III.C.6. Influence de la concentration du SDS sur la fluorescence du complexe.

De même, pour des concentrations fixes en histamine et fluorescamine de part et d'autre de la concentration de SDS (5×10^{-2} M) utilisée, l'intensité de fluorescence ne varie presque pas avec la concentration de SDS (Fig. III.C.6). Il sera aussi possible d'employer la

méthode de dilution pour cette micelle sans que cela puisse induire des erreurs notables sur les mesures analytiques.

III.C.1.2.3.3. Effet de la concentration de CTAC

En revanche, ici la courbe donnant la variation de la concentration du CTAC en fonction du signal de fluorescence (Fig.III.C.7), montre que l'intensité de fluorescence est une fonction croissante de la concentration micellaire, ceci nous permettra d'accroître la sensibilité de nos mesures en utilisant des solutions plus concentrées en CTAC. Nous constatons que le signal de fluorescence augmente toujours avec la concentration en CTAC mais toute fois, nous avons choisi la concentration $C_{CTAC} = 0,4$ M pour nos mesures, ce qui correspond à une concentration très importante sur laquelle les faibles dilutions dans la cuve n'ont pratiquement pas d'incidence.

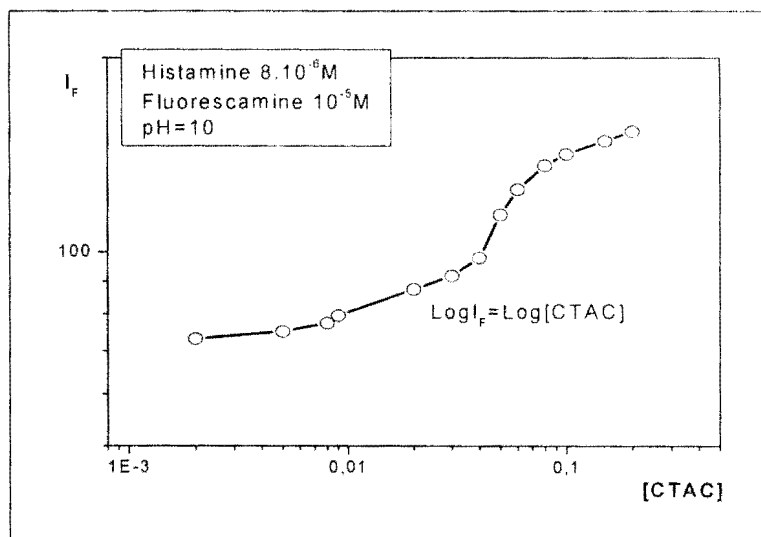


Fig. III.C.7. Influence de la concentration de CTAC sur l'intensité de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine.

III.C.1.2.4. Effet de la concentration de NaCl

Cette étude est justifiée par le fait que l'histamine est généralement extraite des échantillons réels avec de l'acide chlorhydrique (HCl 0,2 M) par la méthode de TCA 10 %. Etant donné que la réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine a lieu en milieu neutre

ou basique, il faut donc nécessairement neutraliser ou alcaliniser le filtrat de HCl, ce qui nous ramène dans un milieu contenant du NaCl. La courbe donnant la variation de l'intensité de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine en fonction de la concentration de NaCl montre que le signal du complexe reste pratiquement inchangé (Fig. III.C.8). D'autre part, l'étude cinétique a révélé que la présence de NaCl n'affecte pas non plus la stabilité du complexe histamine-fluorescamine.

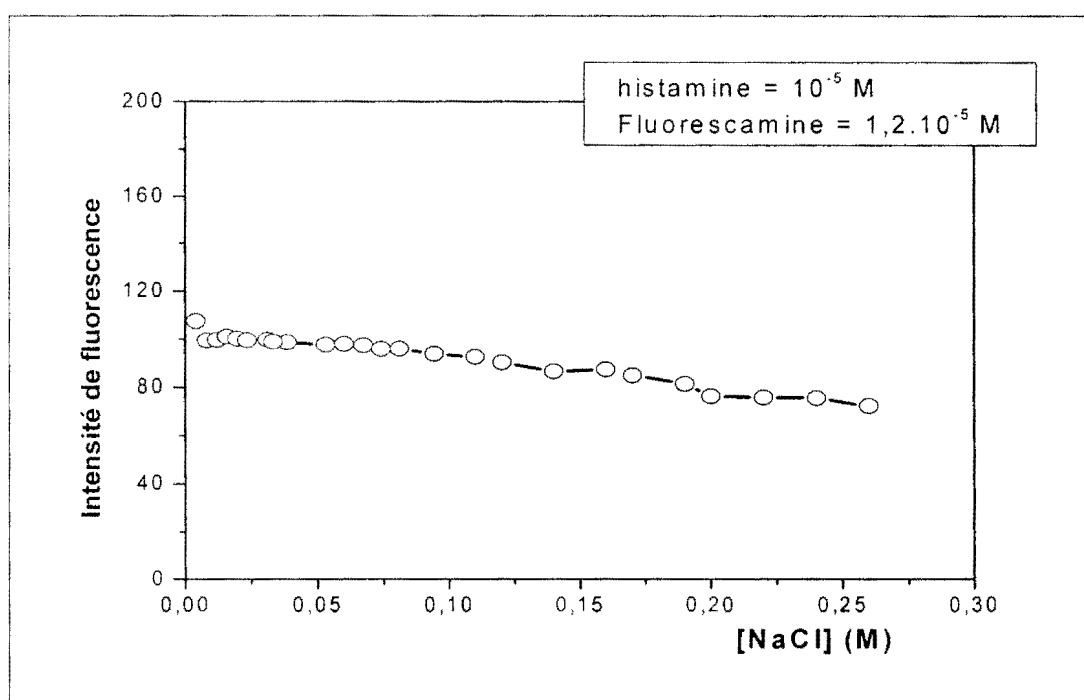


Fig. III.C. 8. Influence de la concentration de NaCl sur l'émission de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine.

III.C.1.3. Courbes de calibration

Afin d'évaluer l'intérêt analytique de la méthode, nous avons établi les droites de calibration dans les différents solvants étudiés et dans les conditions analytiques optimales.

III.C.1.3.1. Calibration dans l'eau

Dans une fiole de 5 ml, nous introduisons 60 μ l d'histamine (1×10^{-5} M) dans une solution aqueuse de NaCl 0,2 M; puis nous ajoutons

successivement 400 μl de fluorescamine (4×10^{-5} M) préparée dans l'acétonitrile et 0,5 ml d'eau distillée pour faciliter la réaction de condensation. Au bout de 1 min, la fiole est complétée à 5 ml avec de l'eau distillée. Par la suite, 2,5 ml de la solution précédente sont introduits dans la cuve pour la mesure analytique. En appliquant la méthode de dilution, la courbe de calibration suivante a été obtenue (Fig. III.C.9).

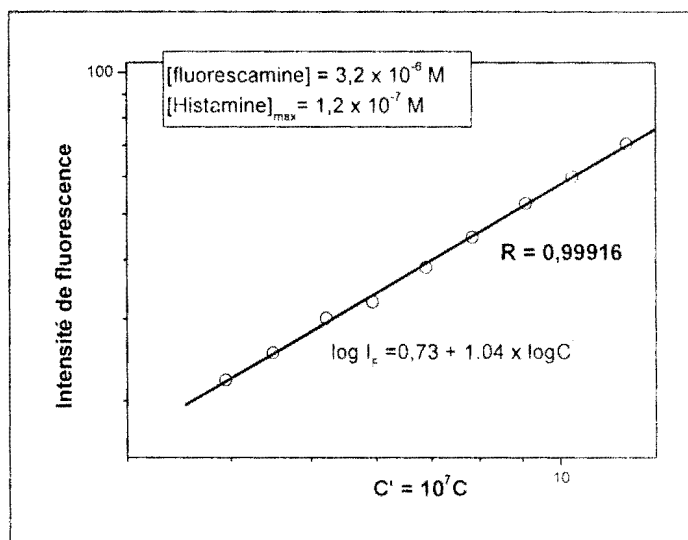


Fig. III.C.9. Droite de calibration de la détermination de l'histamine dans l'eau : $\lambda_{\text{ex}}=380$ nm, $\lambda_{\text{em}}=460$ nm, pH=7.

Comme le montre le graphe, la courbe obtenue est une droite avec un coefficient de corrélation de 0,999, ce qui démontre la précision de la méthode.

III.C.1.3.2. Calibration dans le BRIJ-700

La procédure de préparation de la solution est identique à celle utilisée dans l'eau jusqu'à la condensation. Après la réaction de condensation, nous ajoutons 0,35 ml d'une solution aqueuse de BRIJ-700 (10^{-3} M), nous agitons un peu avant d'ajouter 50 μl de NaOH (0,1 M) afin de stabiliser le complexe formé puis nous agitons une dernière fois avant de compléter à 5 ml avec de l'eau distillée. Par la suite, 2,5 ml de cette solution sont introduits dans la cuve pour la mesure analytique. En appliquant la méthode de dilution, on obtient une courbe de calibration dont la précision est correcte (Fig. III.C.10).

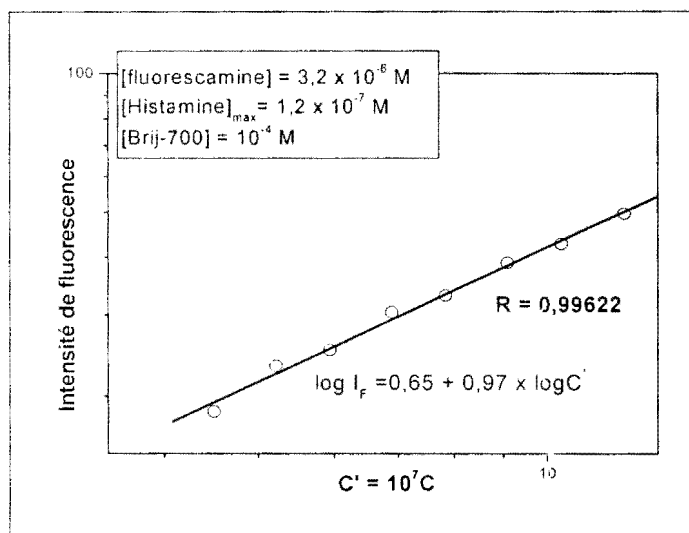


Fig. III.C.10. Droite de calibration de détermination de l'histamine dans le BRIJ-700 10^{-4} M : $\lambda_{\text{ex}}=380$ nm, $\lambda_{\text{em}}=460$ nm, pH=10.

III.C.1.3.3. Calibration dans le SDS

La procédure de préparation de la solution est identique à celle dans l'eau et le brij-700 jusqu'à la condensation. Après la réaction de condensation, nous ajoutons 2,5 ml d'une solution aqueuse de SDS (0,1 M), nous agitons un peu avant d'ajouter de l'eau distillée puis 50 μ l de NaOH (0,1 M) afin de stabiliser le complexe formé et enfin, après agitation, nous complétons à 5 ml avec de l'eau distillée. Par la suite, 2,5 ml sont introduits dans la cuve pour la mesure analytique. En appliquant la méthode de dilution la courbe de calibration précédente a été obtenue (Fig. III.C.11).

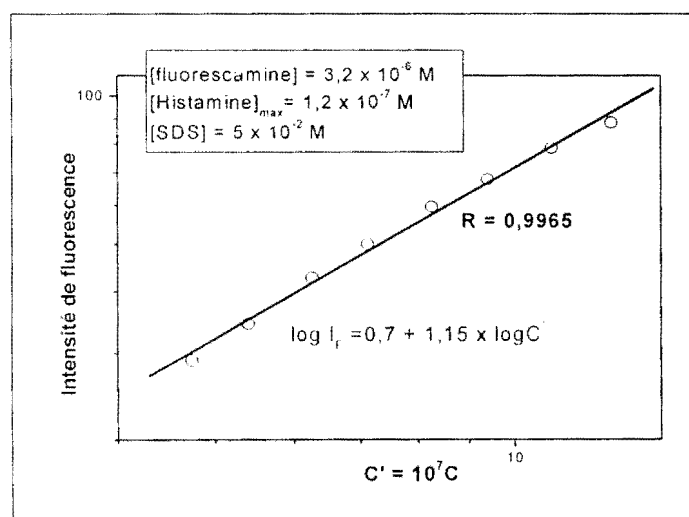


Fig. III.C.11. Droite de calibration de la détermination de l'histamine dans le SDS (0,05 M) : $\lambda_{\text{ex}}=380$ nm, $\lambda_{\text{em}}=460$ nm, pH=10.

III.C.1.3.4. Calibration dans le CTAC

La procédure de préparation de la solution est la même que dans les trois solvants précédents jusqu'à la condensation sauf qu'ici nous avons utilisé 30 μl d'histamine (1×10^{-5} M). Après la réaction de condensation, nous ajoutons 2,7 ml d'une solution aqueuse de CTAC (0,4 M), nous agitons un peu avant d'ajouter de l'eau distillée puis 32 μl de HCl (11,6 M) afin de stabiliser le complexe formé; et enfin, après une agitation, nous complétons à 5 ml avec de l'eau distillée. En fin, 2,5 ml de cette solution sont introduits dans la cuve pour la mesure analytique. En appliquant la méthode de dilution la courbe de calibration suivante (Fig. III.C.12) a été obtenue.

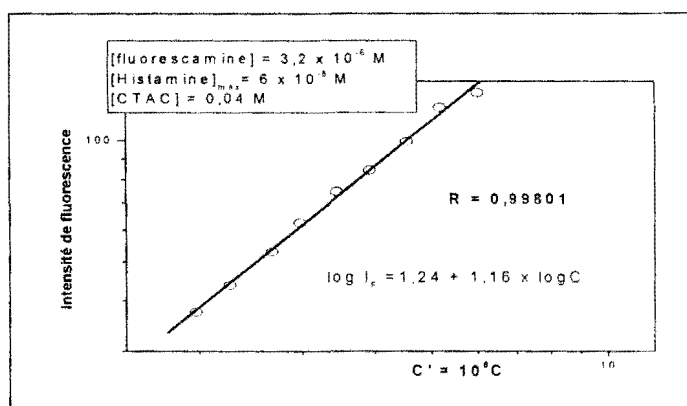


Fig. III.C.12. Droite de calibration de la détermination de l'histamine dans le CTAC 0,4 M $\lambda_{\text{ex}}=387$ nm, $\lambda_{\text{em}}=458$ nm, pH=1,13.

III.C.1.4. Application analytique

III.C.1.4.1. Dosage d'échantillons réels de poissons

Après l'extraction selon la méthode Lerk & Bell sur du poisson fraîchement acheté au marché (Gueule Tapée, Dakar), nous avons fait 3 déterminations dans chacun des 4 solvants : l'eau et les 3 solutions aqueuses micellaires (Brij-700, SDS et CTAC).

Tab. III.C. 2. Teneur d'histamine dans le poisson frais du marché.

Solvant	Eau distillée	Brij-700	SDS	CTAC	Moyenne
C_{mes} (mol/l)	$2,98 \times 10^{-7}$ M	$3,51 \times 10^{-7}$ M	$3,76 \times 10^{-7}$ M	$4,14 \times 10^{-7}$ M	$3,60 \times 10^{-7}$ M
Teneur (T) en $\mu\text{g/g}$ de chair	15,0	17,6	18,8	20,7	18 ± 2

Une deuxième détermination été réalisée après 24h sur le second échantillon de poisson laissé au laboratoire à 25 °C.

Tab. III.C. 3. Teneur d’histamine dans du poisson conservé pendant 24 h à 25° C.

Solvant	Eau distillée	Brij-700	SDS	CTAC	Moyenne
C_{mes} (mol/l)	6×10^{-6} M	$5,44 \times 10^{-6}$ M	$5,24 \times 10^{-6}$ M	$5,3 \times 10^{-6}$ M	5.4950×10^{-6} M
Teneur (T) en $\mu\text{g/g}$ de chair	300	272,1	262,1	265,1	275 ± 15

Ce test montre que le taux d’histamine est passé de 18 $\mu\text{g/g}$ de chair pour le produit frais à 275 $\mu\text{g/g}$ seulement au bout de 24 heures. Cette valeur est largement au dessus du seuil de tolérance en histamine pour les produits halieutiques (évalué à $\sim 100 \mu\text{g/g}$), mais est en parfaite adéquation avec l’état de décomposition du morceau de l’échantillon analysé.

Le 3^{ème} test est réalisé sur un morceau de poisson enroulé dans un papier aluminium et placé dans un réfrigérateur (à 10°C) pendant la même durée.

Tab. III.C. 4. Teneur d’histamine dans du poisson de même échantillon conservée pendant 24h à 10°C.

Solvant	Eau distillée	Brij-700	SDS	CTAC	Moyenne
C_{mes} (mol/l)	$6,88 \times 10^{-7}$ M	$6,63 \times 10^{-7}$ M	$7,13 \times 10^{-7}$ M	$8,28 \times 10^{-7}$ M	$7,22 \times 10^{-7}$ M
Teneur (T) en $\mu\text{g/g}$ de chair	34,4	33,2	35,7	41,4	36 ± 3

Nous constatons que malgré l’utilisation du réfrigérateur à 10 °C, le taux d’histamine a presque doublé passant de $18 \pm 2 \mu\text{g/g}$ à $36 \pm 4 \mu\text{g/g}$ de chair. Cette augmentation n’est pas aussi importante car le produit est toujours consommable. Toutefois elle démontre la nécessité de garder les produits halieutiques à des températures plus basses pour éviter l’augmentation de la teneur en histamine.

III.C.1.4.2. Performance Analytique

Tab. III.C.5. Performances analytiques de la détermination de l'histamine en solution aqueuse micellaire

Solvant ^a	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	pH	Domaine linéarité (ng/ml)	Pente ^b	r^c	LD (ng/ml)	LDA (ng)	LQ (ng/ml)
H ₂ O	380 / 460	7	500-1600	1.04	0,9992	25	63	79
BRIJ-700	380 / 460	10	500-1600	0.97	0,9962	4	10	14
SDS	380 / 460	10	500-1600	1.15	0.9965	6	15	17
CTAC	387 / 458	1,13	200-800	1.16	0.9980	2	5	6

^a Concentration des micelles: [BRIJ-700]= 10^{-4} M, [SDS]=0,05 M, [CTAC]=0,4 M ;

^b Pentés des droites log-log de calibration ;

^c Coefficient de corrélation.

Nous avons rassemblé dans ce tableau l'ensemble de nos paramètres analytiques issus du traitement statistique de nos données. Les LDs obtenues sont relativement basses, variant entre 2 et 25 ng/ml selon les solvants. Les LD absolues (LDA) s'échelonnent entre 5 et 63 ng.

Le dosage de l'histamine en solution micellaire aqueuse est donc plus sensible que dans l'eau pure. En effet, le dosage de l'histamine dans la micelle anionique SDS est 4 à 5 fois plus sensible que dans une solution aqueuse simple. La micelle cationique CTAC est la plus efficace pour le dosage de l'histamine par la fluorescamine : les mesures sont 12 à 13 fois plus sensibles que dans l'eau.

III.C.2. Les tensioactifs en milieu organique

III.C.2.1. Fluorescence en milieux tensioactifs

De tous les solvants organiques étudiés (méthanol, éthanol, propanol-1, butanol-1, DMF, DMSO, acétonitrile, cyclohexane) c'est dans l'acétonitrile que le signal de fluorescence du complexe histamine-

fluorescamine est le plus élevé. C'est la très grande sensibilité observée qui a guidé notre choix pour une étude en présence de molécules tensioactives dans ce solvant.

III.C.2.1.1. Préparation de l'échantillon

Des solutions mères d'histamine (10^{-3} M) dans le mélange eau-acétonitrile 25 :75 v/v de fluorescamine ($3,2 \times 10^{-3}$ M) dans l'acétonitrile et des solutions aqueuses micellaires de Brij-700 10^{-3} M, SDS 0,1 M et CTAC 0,76 M dans l'eau ont été préparées.

A partir de ces solutions nous réalisons la condensation entre l'histamine (25 μ l) et la fluorescamine (250 μ l) dans une fiole de 10 ml afin de former le fluorophore histamine-fluorescamine pour une concentration finale en fluorescamine (8×10^{-5} M) et d'histamine ($2,5 \times 10^{-6}$ M). Après addition de 1ml d'acétonitrile, et après agitation nous complétons à 10 ml avec l'acétonitrile.

De cette solution nous prélevons 200 μ l que nous introduisons dans une fiole de 5 ml puis nous ajoutons le volume V requis de la solution micellaire aqueuse correspondante afin d'obtenir une concentration finale en monomères tensioactifs de Brij-700 (10^{-3} M) de SDS (8×10^{-3} M) et de CTAC (0,06 M).

III.C.2.1.2. Effet de solvant sur les spectres

Nous présentons dans la figure suivante (Fig. III.C.13) les spectres d'excitation et d'émission du complexe histamine-fluorescamine enregistrés dans les différents systèmes de solvants étudiés.

L'aspect général de ces spectres restés inchangés démontre qu'il s'agit bien du même complexe histamine-fluorescamine dans les différents milieux.

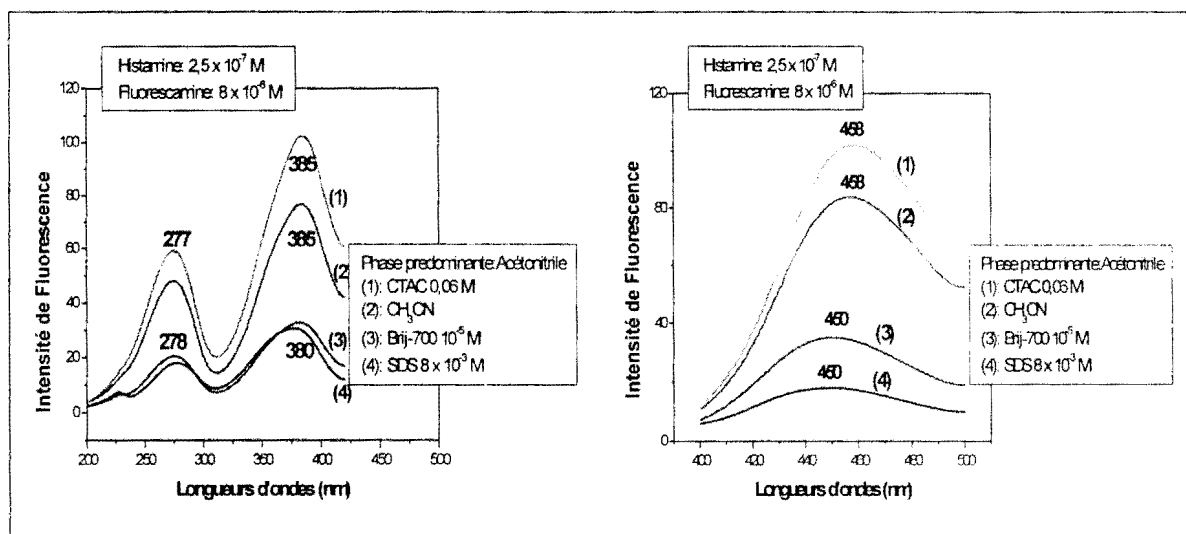


Fig. III.C. 13. Spectre d'excitation et d'émission du complexe histamine fluorescamine en solutions tensioactives d'acétonitrile.

Nous constatons une exaltation du signal de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine en solution tensioactive cationique de CTAC par rapport à l'acétonitrile seule comme solvant, et une inhibition du signal de fluorescence en solution tensioactive neutre de Brij-700 et anionique de SDS avec un déplacement hypsochrome du maximum d'émission à 450 nm. Ceci conduit à choisir comme dans le cas de l'étude précédente la solution tensioactive cationique de CTAC pour une étude de dosage de l'histamine afin d'accroître la sensibilité de notre méthode.

III.C.2.2. Optimisation de la concentration de CTAC

Lorsque la concentration de CTAC varie entre 0 et 0,2 M nous remarquons une augmentation du signal de fluorescence avec la concentration micellaire, suivie peu après d'une décroissance (Fig. III.C.14). Cette baisse est certainement liée à l'augmentation progressive des molécules d'eau (le CTAC est vendu en solution aqueuse), car comme nous l'avons vu, l'eau inhibe le signal de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine (III.A).

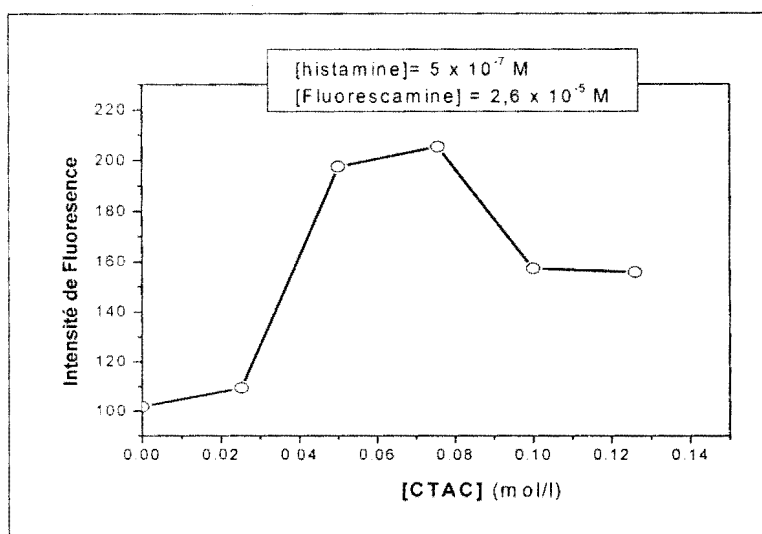


Fig. III.C.14. Effet du CTAC en solution acétonitrile sur le signal de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine.

III.C.2.3. Effet de NaOH et HCl

Une étude des effets de NaOH et de HCl est réalisée sur le signal de fluorescence du complexe histamine-fluorescamine en solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile. La réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine a été réalisée dans une fiole de 5 ml à partir d'une solution finale en histamine $1,25 \cdot 10^{-7}$ M et en fluorescamine $4 \cdot 10^{-6}$ M. Ensuite 0,395 ml de la solution micellaire aqueuse de CTAC 0,76 M a été ajoutée afin d'obtenir une concentration 0,06 M de CTAC dans l'acétonitrile après ajustement à 5 ml avec l'acétonitrile.

2,5 ml de cette solution est placée dans une cuve, la mesure du signal de fluorescence donne le spectre (1) (fig. III.C.15). Lorsque nous ajoutons dans cette solution 40 μ l de NaOH 1N préparée dans l'eau nous obtenons le spectre (2) (fig. III.C.15). L'ajout de 90 μ l d'une solution de HCl 0,5 N dans la même solution afin de neutraliser le NaOH, et d'observer l'effet d'un léger surplus de HCl donne le spectre (3) (fig. III.C. 15). Il en résulte un recouvrement du signal de fluorescence avec en plus une exaltation importante.

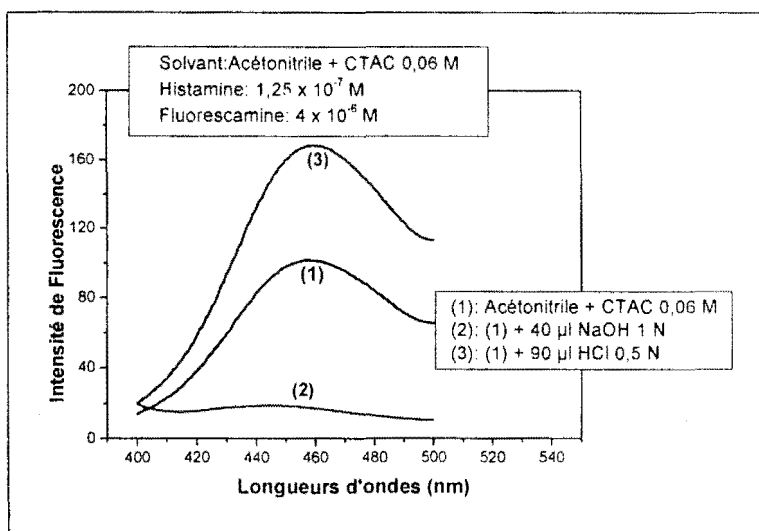


Fig. III.C. 15. Effets de NaOH et HCl sur le signal de Fluorescence du complexe histamine-Fluorescamine en solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile.

Afin de bien cerner l'effet de HCl, des études complémentaires de son rôle sur le signal de fluorescence du complexe dans l'acétonitrile seule (fig. III.C.16a) et dans la solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile (fig. III.C.16b) ont été réalisées. Ces études montrent une exaltation du signal de fluorescence pour des faibles valeurs de concentration de HCl ($< 2 \times 10^{-4}$ M) suivie d'une inhibition progressive au fur et à mesure que cette concentration augmente.

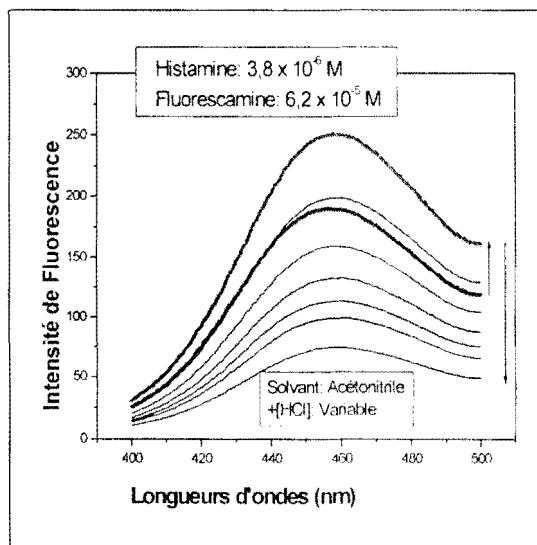
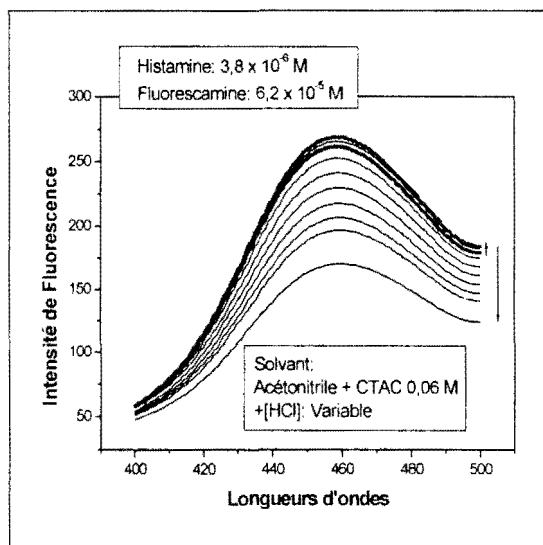


Fig. III.C. 16a. Effet de HCl en solution tensioactive. **Fig. III.C. 16b.** Effet de HCl dans l'acétonitrile.

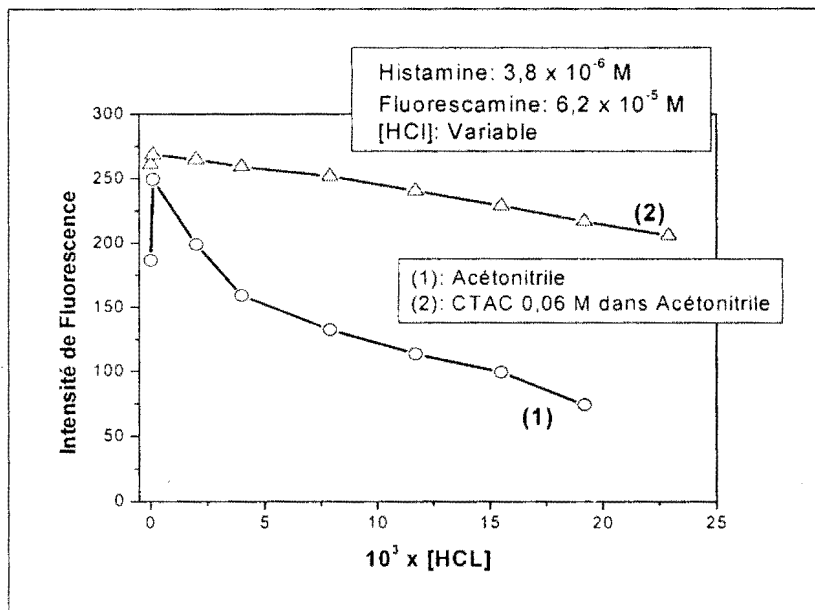


Fig. III.C. 16c. Effet de HCl sur le complexe histamine-fluorescamine dans l'acétonitrile (1) et dans la solution micellaire de CTAC dans l'acétonitrile.

L'inhibition du signal de fluorescence du complexe est plus importante dans la solution d'acétonitrile seule que dans celle en présence de tensioactifs (Fig. III.C.16c).

III.C.2.4. Etude Cinétique

Une étude cinétique du complexe histamine-fluorescamine en solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile (Fig. III.C.17a) a été réalisée pendant 10 minutes. Nous remarquons une grande stabilité du complexe dans ce milieu (courbe 1, Fig. III.17a). Après ces 10 min la même solution a été acidifiée par addition de HCl de manière à avoir une concentration finale 2×10^{-3} M en HCl. Il se produit une exaltation du signal de fluorescence mais à la différence du premier milieu, ici nous observons une baisse rapide du signal du fluorophore (courbe 2, Fig. III.C.17a). Un dosage en milieu acide sera très sensible mais nécessitera une certaine ponctualité sur le temps de mesure après la réaction de condensation et cela sera difficile.

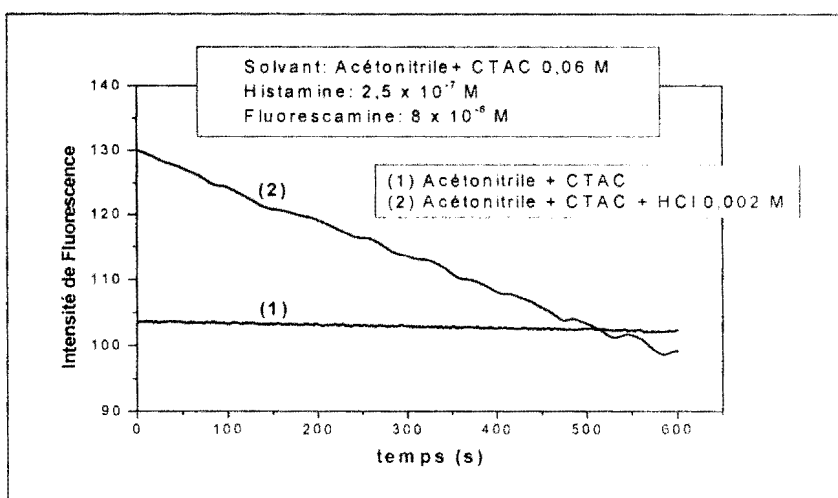


Fig. III.C. 17a. Etude cinétique du complexe histamine –fluorescamine dans l'acétonitrile et dans la solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile.

Pour bien prospecter le milieu acétonitrile+CTAC afin d'avoir des informations plus complètes sur la stabilité du complexe, une étude cinétique pendant un temps plus long a été réalisée. Ainsi, des cinétiques de 30 minutes ont été réalisées avec le même échantillon (Fig. III.C.17b) séparées par des intervalles de temps de 3 heures entre les deux cinétiques. Par ailleurs, une étude de l'évolution du solvant (acétonitrile-CTAC+fluorescamine) dans les mêmes conditions que le complexe (intervalles de 4 heures) a été réalisée (courbes non présentée). Cela a permis de noter une évolution de 18 unités en intensité de fluorescence pour la solution fraîche de solvant qui était de 12 unités au départ.

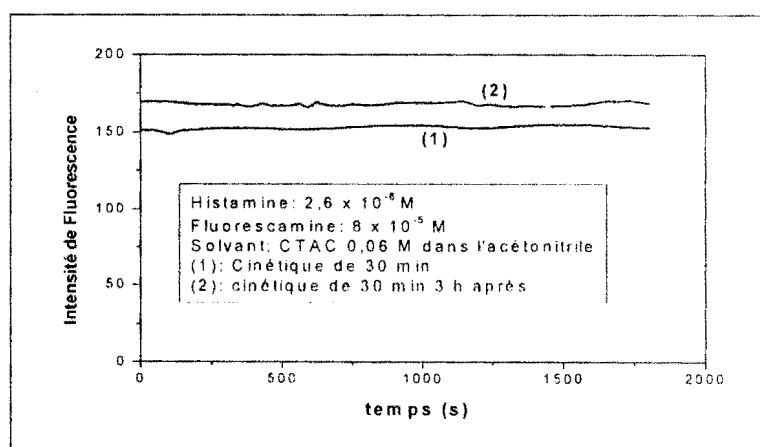


Fig. III.C. 17.b. Etude cinétique du complexe histamine-fluorescamine dans une solution micellaire de CTAC dans l'acétonitrile.

Les spectres d'excitation et d'émission au début de la première cinétique et à la fin de la 2^{ème} cinétique sont identiques (Fig. III.C.17c). Le complexe n'a subi aucune transformation, la légère augmentation du signal de fluorescence de 12 unités est certainement liée à l'évolution du signal du solvant sous l'effet de l'irradiation comme l'atteste l'étude du solvant (III. B.4).

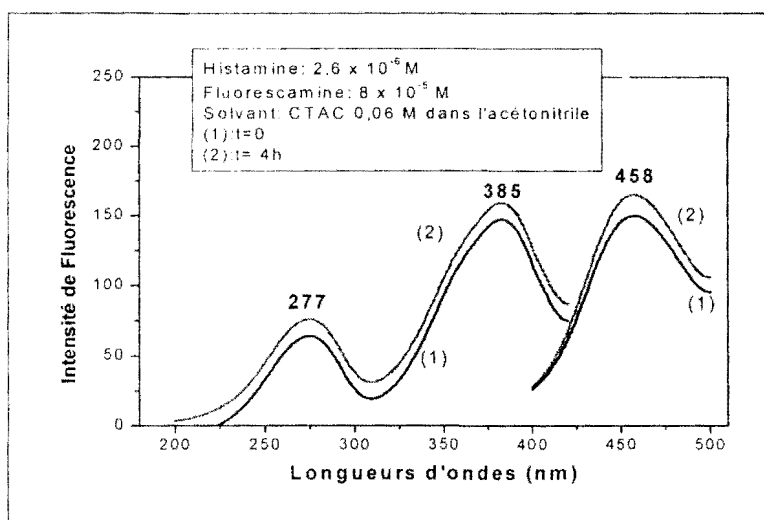


Fig. III.C. 17c. Spectres d'excitation et d'émission du complexe histamine-fluorescamine dans une solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile à t=0 (1) et à 4h après (2).

Nous pouvons affirmer que le complexe histamine-fluorescamine est très stable en solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile.

III.C.2.5. Calibration en solution tensioactive

Une solution A contenant le complexe histamine-fluorescamine est préparée dans une fiole de 10 ml à l'aide de 40 μ l d'une solution d'histamine 10^{-3} M (eau-acétonitrile 25 :75 v/v) et 160 μ l d'une solution de fluorescamine $3,2 \times 10^{-3}$ M (acétonitrile). Nous ajoutons 0.5 ml d'acétonitrile puis nous agitons. Après 3 min nous introduisons 0,79 ml d'une solution aqueuse de CTAC 0,76 M afin d'avoir une concentration finale de 0,06 M en monomères tensioactifs. Ensuite nous ajustons à 10 ml avec l'acétonitrile. Dans une autre fiole nous préparons une solution B de solvant (acétonitrile-CTAC+fluorescamine) ayant les mêmes concentrations que précédemment. Nous prélevons dans une cuve pour

chaque mesure un volume V (μl) [50-1000 μl] de la solution A et nous complétons à 2,5 ml avec la solution B. Après agitation nous mesurons son signal de fluorescence, parallèlement dans une autre cuve une mesure du signal du solvant (solution B) est réalisée. L'intensité du signal de fluorescence considéré pour la courbe de calibration (fig. III.C.18) est la différence entre le signal du complexe dans la solution A et celui du solvant (solution B) au même moment.

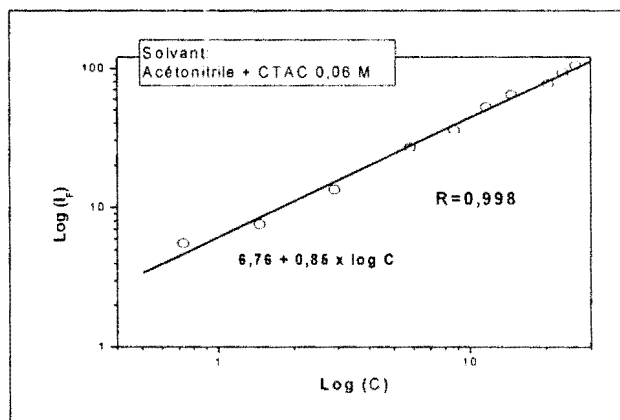


Fig. III.C.18. Courbe de calibration en solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile

Une courbe de calibration linéaire $\text{Log}I_f = 6,76 + 0,85 \log C$ a été obtenue par la méthode du dosage répétitive avec un coefficient de corrélation (0,996) proche de l'unité. La limite de détection $LD = \left(\frac{3 \times \sigma}{10^{\beta}}\right)^{\frac{1}{\alpha}}$ avec σ ($\sigma = 0,1448$) écartype de 11 valeurs du solvant fraîchement préparé, donne une limite de détection de 0,5 ng/ml de solution. Cette LD est 10 fois plus faible qu'en utilisant l'acétonitrile seule ou 70 fois en utilisant l'eau comme solvant.

Conclusion

Les résultats obtenus par notre approche pour l'analyse de l'histamine en solutions tensioactives soit dans l'eau ou en milieu organique mettent en relief quelques avantages analytiques par rapport aux méthodes décrites dans la littérature.

a)- Outre son usage comme membrane pour l'étude d'une variété de processus biologique, nous avons démontré l'avantage évident des micelles en vue d'augmenter la sensibilité des mesures par la protection des états excités vis à vis des autres processus de désactivation non radiative. Ainsi le dosage de l'histamine est 10 à 70 fois plus sensible en solution micellaire de CTAC par rapport à l'eau et les solvants organiques usuels.

b)- Au-delà du dosage direct de l'histamine dans les produits halieutiques et leurs dérivés notre méthode sera très pratique dans le domaine médical: un prélèvement très infime suffira pour la préparation des échantillons, devenant ainsi moins pénible pour les patients. Dans le cadre par exemple d'un test du suc gastrique, de larme, de sang, etc. quelques microlitres suffiront (20-100 μ l).

c)- La très grande sensibilité de la méthode (0,5 ng/ml), l'instantanéité de la réaction de condensation entre la fluorescamine et les composés aminés (0,1-0,5 s), l'exaltation de la fluorescence en solution tensioactive, pourrait faire de cette méthode une alternative valable pour le contrôle de la qualité des poissons et des produits halieutiques en général.

d)- Une application sur des échantillons de poissons capturés puis conservés sous glace pendant 48 heures nous a donné des résultats pour la teneur en histamine de l'ordre de $32,2 \pm 3,2$ μ g/g de chair.

Chapitre III.D. Avantages et inconvénients de notre méthode

III.D.1. Etude comparative

Chaque année de nombreuses méthodes sont proposées pour le dosage de l'histamine dans les produits halieutiques et dérivés. Il s'agit surtout ces dernières années de méthodes, enzymatiques, chromatographiques et fluorimétriques. Les deux dernières sont généralement basées sur une réaction de dérivatisation de l'histamine avec l'orthophthalaldéhyde (OPA). Ainsi, la méthode officielle de l'AOCA internationale (méthode 977.13) [58] qui est la méthode de référence pour l'homologation de toute nouvelle méthode sur le dosage de l'histamine, utilise l'OPA comme sensibilisateur pour former avec l'histamine en milieu alcalin un complexe fluorophore. Après une réaction de condensation qui dure 4 à 5 min, on acidifie le milieu afin de bloquer l'évolution de la réaction. Ensuite on attend 25 min pour que le signal de fluorescence se stabilise avant la mesure de l'intensité. Pour ce qui concerne l'extraction dans cette méthode à la différence de la méthode de Lerk et Bell l'histamine est extraite des produits halieutiques dans un mélange eau-méthanol 25 :75 v/v.

L'inconvénient majeur du dérivé histamine-OPA est que son signal de fluorescence est très instable en milieu alcalin et acide, et cela même dans les conditions de mesures analytiques de la méthode AOAC internationale. Etant donné que la stabilité du signal de fluorescence est très déterminante dans la fiabilité des résultats analytiques, dans ce travail nous avons tout d'abord fait une étude comparative de la stabilité du complexe fluorophore histamine-fluorescamine dans nos conditions optimales d'analyse et de celle du complexe fluorophore histamine-OPA suivant la méthode officielle de l'AOCA internationale. Ensuite nous avons regroupé les performances analytiques de notre étude que nous comparons avec les résultats des autres méthodes commerciales

disponibles sur le marché pour le dosage de l'histamine dans les produits halieutiques et produits dérivés.

III.D.1.1. Sensibilité et stabilité comparative

Le fluorophore histamine-OPA est très fluorescent. Ainsi, à concentration égale en solution aqueuse ou en milieu binaire eau-méthanol (25 :75 v/v) son signal est plus intense que celui du complexe histamine-fluorescamine et cela même après optimisation de notre milieu (milieu tensioactif de CTAC 0,06 M dans l'acétonitrile) (Fig. III.D.1).

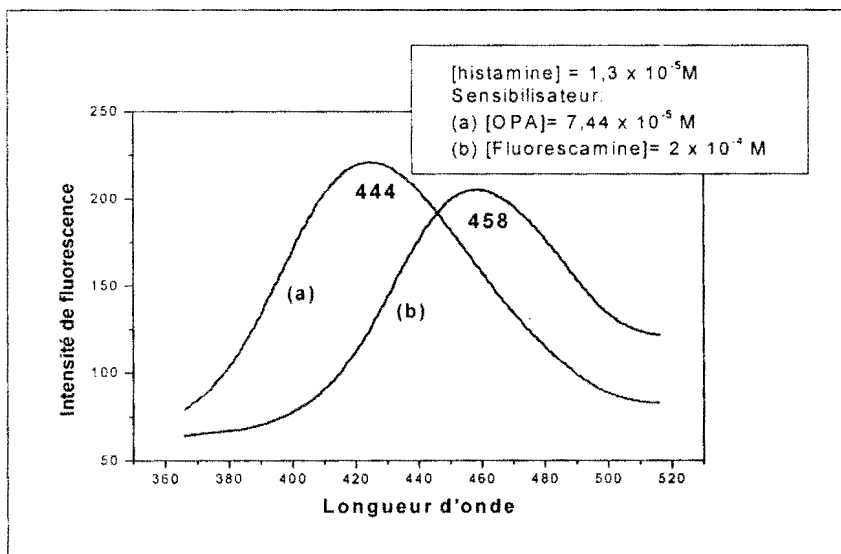


Fig. III.D.1. Emission du complexe histamine-OPA (a) pH=1,1 en milieu eau-méthanol 25 :75 v/v et du complexe histamine-fluorescamine (b) en milieu CTAC 0,06 M+acétonitrile.

Le signal important du complexe histamine-OPA apparaît à priori comme un avantage des méthodes utilisant ce sensibilisateur devant la notre mais à la suite d'une analyse approfondie, nous nous sommes rendu compte que malgré les 25 min d'attente après la phase d'acidification du milieu, le complexe histamine-OPA reste toujours relativement instable. Ainsi, une cinétique pour une même concentration des deux complexes dans les mêmes conditions de voltage (350 V) et de facteur (1,5) et dans les conditions optimales de milieu dans chaque cas (le complexe histamine-OPA est à pH 1,1 dans le solvant eau-méthanol 25 :75 v/v et le complexe

histamine-fluorescamine est dans une solution micellaire de CTAC 0,06 M dans l'acétonitrile) a été réalisée (Fig. III.D.2).

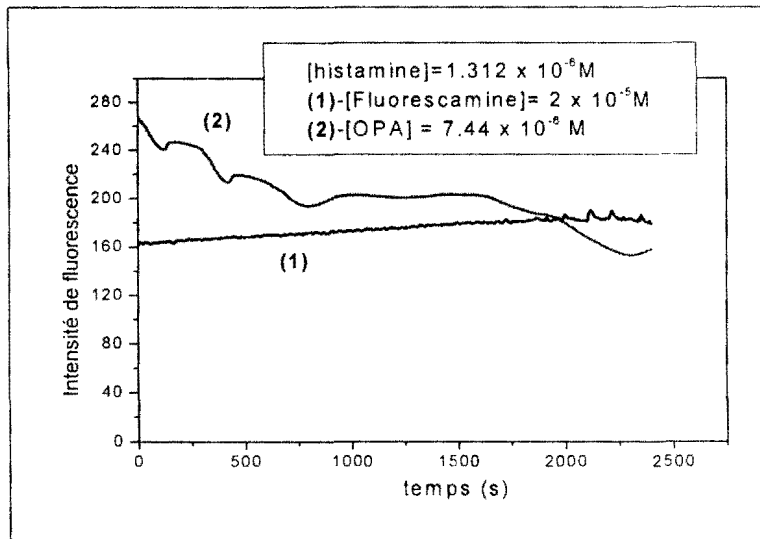


Fig. III.D.2. Cinétique du complexe histamine-fluorescamine (1) milieu CTAC 0,6 M dans l'acétonitrile et du complexe histamine-OPA (2) pH=1,1 dans le mélange eau-méthanol 25 :75 v/v.

Nous constatons une grande instabilité du complexe histamine-OPA malgré la relative stabilité entre 16 et 27 min encadrant le temps de mesure du signal (25 min). Ce signal décroît et passe en dessous de l'intensité du dérivé histamine-fluorescamine qui contrairement au signal du complexe histamine-OPA reste très stable pendant toute la durée de la cinétique. La légère augmentation du signal est liée comme nous l'avons démontré (III.B.4) à une interaction entre le surplus de la fluorescamine et les molécules du solvant (acétonitrile) exposé à une longue irradiation. Par ailleurs, nous avons constaté aussi bien en milieu alcalin qu'en milieu acide que le signal de fluorescence du complexe histamine-OPA est très sensible aux variations de pH. Ainsi, dans les conditions d'analyses en milieu acide une petite variation du pH peut entraîner une exaltation ou une inhibition du signal de fluorescence de presque 2 fois ; ce qui constitue une source importante d'erreur dans le dosage de l'histamine et explique certains résultats aberrants aux quels on est confronté régulièrement en utilisant cette méthode. En effet, il arrive qu'on écarte des résultats parce qu'ils sont aberrants sans arriver à trouver une justification à cela. Ainsi dans l'étude collaborative d'homologation

concernant la méthode AOAC 977.13 [58] sur l'histamine, les résultats de 4 laboratoires sur les 16 ayant testés les mêmes échantillons dans les mêmes conditions analytiques que les autres sont aberrants [58]. Ces résultats sont rejetés des calculs statistiques sans aucune explication sur l'origine de l'erreur.

III.D.1.2. Effet du pH en milieu binaire eau-méthanol

Dans une fiole de 10 ml nous avons ajouté les volumes requis pour avoir une solution d'histamine $1,3 \times 10^{-5}$ M et une solution d'OPA $6,94 \times 10^{-5}$ M, puis le volume de NaOH requis pour avoir un pH=12. Après 5 min, une solution de HCl 3N est ajoutée afin de se retrouver en milieu acide pH=3. Dans cette étude, nous ne nous sommes pas intéressés à l'intervalle de pH 3 et 12 car la plupart des dosages utilisant l'OPA comme sensibilisateur sont faits en milieu acide dans une zone de pH comprise entre 0 et 3. Cela nous a amené à ajouter des volumes de HCl à la solution alcaline de départ afin de couvrir cet intervalle de pH entre 0 et 3. Après acidification du milieu alcalin de départ (pH=12) pour se retrouver en milieu final acide (pH=3), le signal de fluorescence est exalté. Dans l'intervalle de pH=3 et 2 il y a une diminution du signal de fluorescence et à partir de la valeur pH=2, le signal de fluorescence augmente en passant par un maximum pour une valeur de pH=1,1, puis décroît progressivement. Ainsi, en milieu très acide (pH≈0) il y a inhibition quasi totale du signal de fluorescence.

Lors du dosage de l'histamine par l'OPA la solution d'acide chlorhydrique utilisée est très concentrée (1 à 3 N), l'erreur d'une goutte se traduit par des résultats très différents. Ainsi, pour un dosage à pH=1, l'erreur d'une goutte de 10 µl peut faire augmenter ou diminuer la valeur du pH de 0,05 à 0,11 ce qui se traduira par une inhibition très importante du signal. Cela expliquerait vraisemblablement les résultats aberrants qui sont restés sans explication d'où la nécessité d'utiliser un milieu tampon pour le dosage de l'histamine par l'OPA.

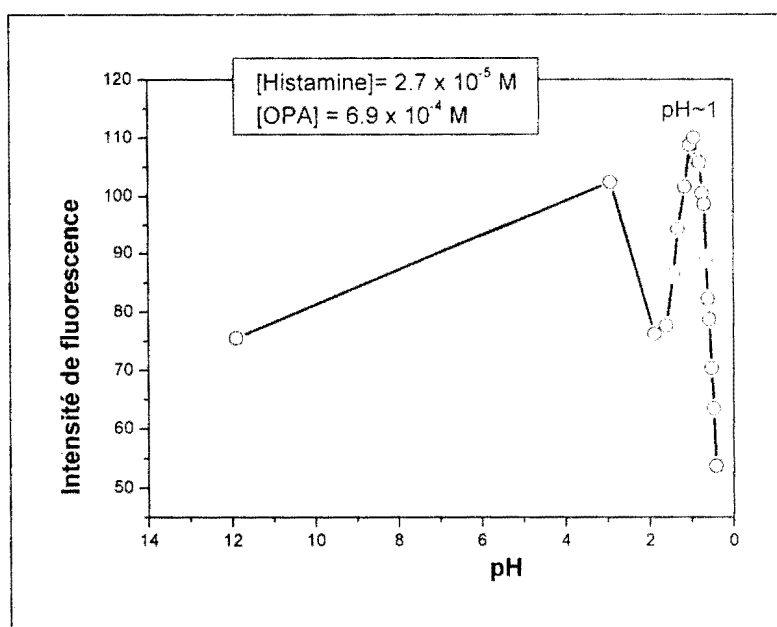


Fig. III.D.3. Effet du pH sur le complexe histamine-OPA dans un mélange eau-méthanol 25 :75 v/v.

III.D.1.3. Comparaison de nos résultats avec les autres méthodes

Dans le tableau suivant nous avons rassemblé les principaux résultats de notre méthode de dosage de l’histamine par la fluorescamine dans divers solvants.

Tab. III.D.1. Résultats analytiques de la méthode de dosage de l’histamine à l’aide de la fluorescamine en solution micellaire.

Solvant		Test d’efficacité de la colonne (%)	r ^a	LD ^b ng/ml	LQ ^c ng/ml	LAD ^d ng
Solution aqueuse	eau	96	0,999	35	104	345
	Brij-700	96	0,998	4	10	14
	SDS	97	0,998	6	15	17
	CTAC	98	0,998	2	5	6
Solution organique	Acétonitrile	97	0,998	5	13	44
	CTAC	98	0,998	0.5	1	2

^a Coefficient de corrélation de la courbe de calibration

^{b,c} Limite de détection (LD) et Limite de quantification (LQ), définie comme la concentration d’analyte donnant un rapport signal/bruit de fond de l’appareil respectivement égal à 3 et 10.

^d Limite Absolue de détection (LAD), calculé en utilisant un volume de 2.5 ml

Ces résultats montrent que, dans la plupart des cas, les concentrations d'histamine susceptibles d'être détectées par notre méthode (1 à 100 ppb) s'avèrent plus basses que celles déterminées par plusieurs tests actuellement commercialisés sous forme de kit [64]. C'est le cas de Neogen Agrimeter II, Neogen ALERT, Neogen Veratox, Immunotech Histamirine, Immuno-diagnostic Reagents (IDR K1-HTM et IDR K3-HTM). Ces kits sont regroupés en deux catégories : les kits qualitatives (Neogen ALERT, IDR K3-HTM) qui indiquent juste par colorimétrie le seuil de tolérance et les kits dites quantitatives (Neogen Veratox, Immunotech Histamirine, IDR K1-HTM, Agrimeter II) qui permettent de déterminer la teneur en histamine dans l'échantillon. La sensibilité respective des six kits se situe autour du ppm. Ce manque de sensibilité s'explique par le fait qu'en dehors du kit Agrimeter II qui est basée sur la chromatographie, les 5 autres utilisent des méthodes enzymatiques, donc bien que dits quantitatifs, ils sont en réalité semi-quantitatifs car ils lient dans certains cas la teneur en histamine à une couleur observée. Malgré ce manque de sensibilité et de précision, ces kits présentent un avantage majeur par rapport à nos méthodes de laboratoire qui sont certes plus précises mais nécessitent une instrumentation plus lourde. Ces kits sont industriels donc commercialisés à grande échelle et toute l'instrumentation tient dans un paquet ce qui permet de faire une utilisation directe sur le terrain. En plus l'utilisation ne demande pas une qualification poussée. D'autre part, certains kits ne nécessitent pas une procédure d'extraction longue de l'histamine de l'échantillon réel. Ainsi, à l'exception des kits IDR qui se font en solution aqueuse acide HCl 0,03 %, dans tous les autres, l'extraction de l'histamine se fait par l'eau. Toutefois, ces méthodes ont nécessairement besoin des méthodes dites de laboratoire comme la notre qui sont plus précises pour la détermination du seuil de tolérance et pour la vérification des résultats d'analyses.

Pour ce qui est des méthodes chromatographiques (CPG, CLHP), comparativement à notre méthode, elles sont caractérisées comme les méthodes enzymatiques par des limites de détection moyennes (autour du

ppm). Ainsi une des études les plus récentes, celle de Bao-Shyung Hwang a une limite de détection de 5 ppm [79].

Pour ce qui concerne les méthodes fluorimétriques ou fluorimétriques couplées à une dérivation pré ou post colonne chromatographique (CLHP ou CPG), elles ont certes comme notre méthode, des limites de détection très basses (autour du nanogramme/ml), mais ni la stabilité du fluorophore formé, ni le milieu réactionnel ne sont étudiés de manière approfondie. C'est le cas de la méthode AOAC 977.13 [58] qui est la méthode de référence de dosage de l'histamine sur le plan mondiale, où il arrive très souvent de sous doser ou sur doser l'histamine présente dans un échantillon réel.

Conclusion

Les performances analytiques de notre méthode de dosage de l'histamine ($LD < 1 \text{ ng/ml}$) font de notre méthode l'une des plus sensibles et plus fiables actuellement pour le dosage de l'histamine dans les produits halieutiques et dérivés.

A la différence des autres méthodes, en plus de la grande sensibilité de notre méthode, nous avons pu réunir les conditions de quasi-stabilité pour le signal du complexe fluorophore histamine-fluorescamine ce qui assure une grande fiabilité de nos résultats d'analyse d'échantillon réel comparativement aux autres méthodes.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons pu atteindre les principaux objectifs que nous avons fixés à ce travail, c'est à dire mettre au point une nouvelle méthode efficace (sensible, sélective et spécifique) qui permet de donner une réponse aux nombreuses insuffisances observées dans les méthodes actuelles (instabilité, interférences, longue durée pour un test et le coût très élevé) utilisées pour le dosage de l'histamine dans les produits halieutiques et dérivés.

Nous avons trouvé une alternative très simple et moins coûteuse au gain de sensibilité qui traditionnellement nécessite une instrumentation sophistiquée et très coûteuse pour nos pays. Ainsi, en jouant sur le solvant nous avons pu atteindre des limites de détection de l'ordre de 0,5 ppb.

Dans ce travail le choix de la fluorescamine qui réagit instantanément avec l'histamine pour donner un dérivé fluorescent comme sensibilisateur nous a permis de gagner du temps sur les autres méthodes fluorimétrique utilisant les autres sensibilisateurs qui sont certes plus maniables mais qui demandent plus de temps pour la condensation avec l'histamine. Nous avons choisi certes la voie la plus rapide mais elle est la plus compliquée car en solution aqueuse la réaction d'hydrolyse de la fluorescamine concurrence celle de formation du fluorophore histamine-fluorescamine. Ainsi, dans un milieu réactionnel contenant 20 et 95 % d'eau le signal relatif de fluorescence du complexe fluorophore passe respectivement de 170 à 6.

Après une optimisation des procédures d'ajout des différents réactifs dans le milieu réactionnel et de mesure du signal de fluorescence, nous avons pu établir que la réaction de condensation entre l'histamine et la fluorescamine (qui est d'ordre 1:1) doit se faire avec un rapport de concentration [fluorescamine]/[histamine] au moins égale à 10 afin de ne pas sous doser l'histamine, et cela en présence d'une petite quantité d'eau. Des études en absorption uv-vis, en IR, en fluorescence, en

chromatographie et en spectrométrie de masse ont permis de montrer qu'après la formation du dérivé pyrrolinone (fluorophore habituel entre la fluorecamine et les amines primaires), la réaction évolue pour donner un autre complexe fluorophore plus fluorescent car plus rigide du point de vue structural.

Dans le but toujours d'optimiser la sensibilité et la stabilité du signal de fluorescence du dérivé fluorophore nous avons réalisé des études dans plusieurs solvants protiques (eau, méthanol, éthanol, propanol et butanol) et aprotiques (DMF, DMSO, acétonitrile et cyclohexane). Nous avons trouvé dans les deux classes de solvant que plus le solvant est polaire plus il inhibe le signal de fluorescence du complexe fluorophore. De tous les solvants polaires étudiés l'eau inhibe le plus le signal de fluorescence et l'acétonitrile l'exalte le plus. Cela constitue un gain pour ce qui concerne l'acétonitrile mais malheureusement l'eau est le solvant le plus abondant, le moins chère et surtout le solvant d'extraction le plus utilisé pour l'histamine. Pour surmonter cette difficulté nous avons utilisé des solutions tensioactives de Brij-700, de SDS et de CTAC. Le milieu micellaire aqueux de Brij-700 a une sensibilité comparable à l'eau mais les solutions micellaires de SDS et de CTAC ont permis d'augmenter la sensibilité respectivement de 5 et 13 fois par rapport à l'eau.

Une Application à des échantillons réels de poissons (sardines) achetés dans des marchés locaux (Gueule Tapée et Tilène/Dakar) a permis de détecter des teneurs entre 15-36 $\mu\text{g/g}$ de chair. Une valeur qui est en deçà du seuil international de tolérance (100 $\mu\text{g/g}$ de chair) pour les produits halieutiques.

Dans tous les milieux prospectés les limites de détections varient entre 2 et 100 ppb avec un test de fiabilité variant entre 95 et 98% suivant le solvant utilisé. Ces valeurs de LD sont certes très basses pour une détection de l'histamine dans les produits halieutiques et dérivés où le seuil de tolérance est fixé à 100 ppm ou chez certains patients (10-100 ppb) mais dans certains cas la teneur en histamine à analyser est autour de 1 ppb. Pour répondre à ce besoin d'une très forte sensibilité

l'optimisation du milieu acétonitrile à l'aide des solutions tensioactives (Brij-700, SDS et CTAC) a permis en solution de CTAC d'obtenir les meilleures conditions de sensibilité. Le dosage de l'histamine dans un tel milieu est 70 fois plus sensible que dans l'eau avec une limite de détection de 0,5 ppb.

Une étude comparative des résultats de notre méthode à ceux des méthodes actuellement commercialisées nous a montré que cette nouvelle méthode est plus sensible que la plupart des méthodes biologiques et chromatographiques largement utilisées pour le dosage de l'histamine. Notre méthode, présente également des avantages (fiabilité) par rapport aux autres méthodes fluorimétriques et chromatographiques (CLHP, CPG) couplées à une détection fluorimétrique pré ou post colonne ou la question de la stabilité du fluorophore histamine-sensibilisateur n'a jamais été traitée.

Par ailleurs, pour des raisons de sensibilité ($LQ < 1$ ng/ml), de fiabilité (95 et 98%) et de coût, cette méthode pourrait être une alternative intéressante aux méthodes actuelles de détermination de l'histamine dans les liquides physiologiques (sang, urine, plasma, larme, etc.). Notre méthode peut également servir de test complémentaire dans la recherche de résidus organiques dans le domaine spatial.

REFERENCES

1. J.R. Lakowicz. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd Ed, Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
2. N.J. Turro. (1991). *Modern molecular photochemistry*. Ed, Sausalito California university sciences books.
3. F. Rouessac, A. Rouessac. (1992). *Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes*. Ed, Masson Paris.
4. A.M. Braun, M.T Maurette, E. Oliveros. (1986). *Technologie photochimique*. Ed, Presse Polytechniques Romandes, Lausanne.
5. R. Lissilour. (2001). *Chimie théorique, Application à la Spectroscopie*. Ed, Dunod Paris.
6. S. De Bernardo, M. Weigele, V. Toome, K. Manhart, W. Leimgruber, P. Bohlen, S. Stein, S. Udenfriend. (1974). *Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines*. Arch. Biochem. Biophys. **163**: 390-399.
7. S. Udenfriend, S. Stein, P. Bohlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele. (1972). *Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range*. Science. **178**: 871-872.
8. M. Weigele, S. De Bernardo, W. Leimgruber. (1973). *Fluorometric assay of secondary amino acids*. Biochem. Biophys. Res Commun. **50**: 352-356.
9. S. Stein, P. Bohlen, S. Udenfriend. (1974). *Studies on the kinetics of reaction and hydrolysis of fluorescamine*. Arch. Biochem. Biophys. **163**:400-403.
10. M.A. Bridges, K.M. McErlane, E. Kwong, S. Katz, D.A. Applegarth. (1986). *Fluorometric determination of nanogram quantities of protein in small samples: application to calcium-transport adenosine triphosphatase*. Clin. Chim. Acta. **157**:73-79.
11. G.M. Funk, C.E. Hunt, D.E. Epps, P.K. Brown. (1986). *Use of a rapid and highly sensitive fluorescamine-based procedure for the assay of plasma lipoproteins*. J. Lipid. Res. **27**:792-795.
12. V.K. Boppana, C. Miller-Stein, J.F. Politowski, G.R. Rhodes. (1991). *High-performance liquid chromatographic determination of peptides in biological fluids by*

- automated pre-column fluorescence derivatization with fluorescamine.* J. Chromatogr. **548**:319-327.
13. L. Hernandez, R. Marquina, J. Escalona. (1990). *Detection and Quantification of Capillary Electrophoresis Zones by Fluorescence Microscopy.* J. Chromatogr. **502**:247.
 14. T. Bantan-Polak, M. Kassai, K.B. Grant. (2001). *A comparison of fluorescamine and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde fluorogenic reagents for microplate-based detection of amino acids.* Anal. Biochem. **297**:128-136.
 15. D.L. Walters. (1994). *A Comparison of Fluorescence Versus Chemiluminescence Detection for Analysis of the Fluorescamine Derivative of Histamine by HPLC.* Biomed. Chromatogr. **8**:207-211.
 16. C.M. Van Haaster, W. Engels, P.J. Lemmens, G. Hornstra, G. van der Vusse. (1993). *Rapid and highly sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of histamine and 3-methylhistamine in biological samples using fluorescamine as the derivatizing agent.* J. Chromatogr. **617**(2):233-240.
 17. H. Fukuda, A. Yamatodani, I. Imamura, K. Maeyama, T. Watanabe, H. Wada. (1991). *High-performance liquid chromatographic determination of histamine N-methyltransferase activity.* J. Chromatogr. **567** (2): 459-464.
 18. H. Nakamura, J. Pisano. (1976). *Fluorescamine derivatives of histidine, histamine, and certain related imidazoles: unique fluorescence after heating in acid.* J. Arch. Biochem. Biophys. **177** (1):334-335.
 19. A. Bettero. (1984). *Histamine assay in tears by fluorescamine derivatization and HPLC.* J. Chromatogr. **310**:390-395.
 20. J.R. Benson, P.E. Hare. (1975). *O-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin.* Proc. Natl Acad Sci U S A. **72**:619- 622.
 21. P. De Montigny, J.F. Stobaugh, R.S. Givens, R.G. Carlson, K. Srinivasachar, L.A. Sternson and T. Higuchi. (1987). *Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde / Cyanide Ion: A Rationally Designed Fluorogenic Reagent for Primary Amines.* Anal. Chem. **59**:1096-1101.

22. G. Turiak, L. Volicer. (1994). *Stability of o-phthalaldehyde-sulfite derivatives of amino acids and their methyl esters: electrochemical and chromatographic properties.* J. Chromatogr. **668**:323-329.
23. M. Kobayashi, E. Ichishima. (1990). *Use of water-soluble 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide for the fluorescent determination of uronic acids and carboxylic acids.* Anal. Biochem. **189**:122-125.
24. P. Leroy, A. Nicolas, C. Gavriloff, M. Matt, P. Netter, B. Bannwarth, B. Hercelin, M. Mazza. (1991). *Determination of 2-mercaptopropionylglycine and its metabolite, 2-mercapto-propionic acid, in plasma by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography with post-column derivatization.* J. Chromatogr. **564**:258-265.
25. G.E. Collins, S.L. Rose-Pehrsson. (1994). *Fluorescent detection of hydrazine, monomethylhydrazine, and 1,1-dimethylhydrazine by derivatization with aromatic dicarboxaldehydes.* Analyst. **119**:1907.
26. S.M. Lunte, T. Mohabbat, O.S. Wong, T. Kuwana. (1989). *Determination of desmosine, isodesmosine, and other amino acids by liquid chromatography with electrochemical detection following precolumn derivatization with naphthalenedialdehyde/cyanide.* Anal. Biochem. **178**:202-207.
27. T. Kawasaki, T. Higuchi, K. Imai, O.S. Wong. (1989). *Determination of dopamine, norepinephrine, and related trace amines by prechromatographic derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde.* Anal. Biochem. **180**:279-285.
28. P.A. Shore, A. Burkhalter, V.H. Cohn, Jr. (1959). J. Pharmacol. Exp. Ther. 127-182.
29. I. Venza, Visali. M, G. Ceci, D. Teti. (2004). *Quantitative determination of histamine in tears during conjunctivitis by a novel HPLC method.* Ophthalmic research 2004; **36**:62-69 (DOI: 1159 / 000076112). Department of experimental pathology and microbiology, university of Messina, Italy.
30. S.E Douabalé, M. Dione, A. Coly, A. Tine. (2003). *Contribution to the determination of histamine rate by measuring out histamine-orthophthalaldehyde complex in the absorption and fluorescence.* Talanta. **60**:581-590.

31. G. Weber. (1952). *Polarization of the Fluorescence of Macromolecules*. J. Biochem. **51**:155.
32. P. Fürst, L. Pollack, T. Graser, H. Godel, P. Stehle. (1990). *Appraisal of four precolumn derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials*. J. Chromatogr. **499**:557-569.
33. P.B. Ghosh, M.W. Whitehouse. (1968). *7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: a new fluorogenic reagent for amino acids and other amines*. J. Biochem. **108**:155-156.
34. D.J. Birkett, N.C. Price, G.K. Radda, A.G. Salmon. (1970). *The Reactivity of SH Groups with a Fluorogenic Reagent*. FEBS Lett. **6(4)**:346-348.
35. K. Imai, Y. Watanabe. (1981). *Fluorimetric Determination of Secondary Amino Acids by 7-Fluoro-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole*. Anal. Chim. Acta. **130**:377.
36. H. Miyano, T. Toyo-Oka, K. Imai. (1985). *Further Studies on the Reaction of Amines and Proteins with 4-Fluoro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole*. Anal. Chim. Acta. **170**:81.
37. S. Lin, W.S. Struve. (1991). *Time-resolved fluorescence of nitrobenzoxadiazole-aminohexanoic acid: effect of intermolecular hydrogen-bonding on non-radiative decay*. Photochem. Photobiol. **54**:361-365.
38. D. Topygin. (2003). *Effects of the solvent refractive index and its dispersion on the radiative decay rate and extinction coefficient of a fluorescent solute*. J. of Fluorescence. **13(3)**:201-219
39. A. Coly, J-J. Aaron. (2003). *Fluorometric analysis of pesticides; Methods recent developments and applications*. Talanta. **46**:875-843.
40. A. Coly. (2001). *Détermination fluorimétrique et fluorimétrique induite photochimiquement de pesticides aromatiques et d'herbicides sulfonyles : effet des milieux organisés, Application analytique à la détermination des traces de pesticides dans l'environnement*. Thèse d'Etat FST- UCAD Sénégal.
41. L.J Cline-Love, M. Grayeski, J. Noroski, R. Weinberger. (1985). *Room-temperature phosphorescence, sensitized phosphorescence and fluorescence of licit and illicit drugs enhanced by organized media*. Anal. chim. Acta. **170**:3-12.

42. S.H Arnold, W.D. Brown. (1978). *Histamine(?) toxicity from fish products*. Adv. Food. Res. **24**:113-154.
43. S.S. Summer, F. Roche, S.L. Taylor. (1990). *Factors controlling histamine production in Swiss cheese inoculated with lactobacillus buchneri*. J. Dairy. Sci. **73**:3050-3058.
44. H.A. Frank, D.H. Yoshinaga. (1984). *Histamine production in Tuna*. Pp. 443-451. in E.P. Ragelis (Ed), *seafood toxins*. ACS symposium series. N°262. American Chem. SOC. Washington, D.C.
45. H.A. Frank. (1985). *Histamine-forming bacteria in tuna and other marine fish*, pp 2-3. in B.S. Pand and D. James, Ed. *Histamine in marine products: production by bacteria. Measurement, and prediction of formation*. FAO Fish. Tech. Pap. 252. 1985a
46. B.A. Bartholomew, P.R. Berry, J.C. Rodhouse, R.J. Gilbert. (1987). *Scombrotoxic fish poisoning in Britain: features of over 250 suspected incidents from 1976 to 1986*. Epidemiol. Infect. **99**:775-782.
47. C. Den Brinker, C. Rainer, M. Kerr. (1996). *Investigation of Biogenic amines in fermented fish and fish products*. Published by the Victorian Government Department of human services, Ed 1, 25102002. WWW. foodsafety.vic.gov.au
48. J.D. Baranowsky, P.A. Brust, H.A. Frank. (1985). *Growth of klebsiella pneumoniae UH-2 and properties of its histamine decarboxylase system in resting cells*. J. Food. Biochem. **9**: 349-360.
49. Center for Food safety and Applied Nutrition Office of Seafood Washington DC, Food and Drug Administration (FDA). (2001). *"Decomposition-related Hazards"*. Ch 8 (In Fish and Fisher Products Hazards and controls Guidance) 3rd Ed, 103-104. (2001b).
50. O.O. Iarosh, S.A. Kanevs'Ka. (1992). *The characteristics of the blood histamine indices and of the pathomorphological changes in the gastric mucosa of patients with multiple sclerosis*. Lik. Sprava. **1**: 75-76.
51. I. Imamura, T. Watanabe, Y. Hase, Y. Sakamoto, Y. Fukuda, H. Yamamoto, T. Tsuruhara, H. Wada. (1984). *Hiatamine metabolism in patients with hitidinemia:*

- determination of urinary levels of histamine, N tau-methylhistamine, imidazole acetic, and its conjugate(s). *J. Biochem.* **96(6)**: 1925-1929.
52. Z. Darvas, E. Sakurai, H.G. Schwelberger, H. hegyesi, H. Rivera, E, H. Ohtsu, T. Watanabe, E. Pallinger, A. Falus. (2003). *Autonomous histamine metabolism in human melanoma cells. Melanoma. Res.* **13 (3)**: 239-246.
53. J.D. Baranowsky, A.H. Frank, A.P. Brust, M. Chongsiriwatana, J.R. Premaratne. (1990). *Decomposition and histamine content in mahimahi (Coryphaena hippurus). J. Food protection.* **53 (3)**:217-222.
54. D.E. Schutz, G.W. Chang, L.F. Bjeldanes. (1976). *Rapid Thin layer chromatographic method for the determination of histamine in fish products. J. AOAC.* **59(6)**:1224-1225.
55. P.A. Lerke, M.N. Porcuna, H.B. Chin. (1983). *Screening test for histamine in fish. J. Food. Sci.* **48**: 155-157.
56. G. Yen, C. Hsieh. (1991). *Simultaneous analysis of biogenic amine in canned fish by HPLC. J. Food.* **56 (1)**:158-160.
57. Method 977.13. (1995). *Histamine in seafood, Fluorimetric method. Sec.35.1.32. in. Official Methods of Analysis of AOAC international, AOAC 16th ed, P.A. Cunniff, Ed, (1995c) 6-17. AOAC International Gaithersburg, MD.*
58. L.P. Rogers, W.F. Staruskiewicz. (1997). *Gas Chromatographic method for putrecine and cadaverine in canned Tuna and mahi mahi and fluorimetric method for histamine (minor modification of AOAC official method 977.13): Collaborative study, J. AOAC international.* **80(3)**: 459-692.
59. G. Farn, G.G. Sims. (1987). *Chemical indices of decomposition in tuna. in: Kramer. D.E. and Liston. J. (Ed). Seafood quality determination. Proceedings of an International Symposium coordinated by the University of Alaska Sea Grant Program, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 175-183.*
60. H.H. Huss. (1999). *La qualité et son évolution dans le poisson frais. FAO document technique sur les pêches N° 348.*
61. H. Relibein, J. Oehlenschlager (1982). *Zur Zusammensetzung der TVB-N fraktion (fluchtige Basen) in saurer Extrakten und alkalischen Destillaten von Seefischfilet. Arch. fir Lebensmittelhyg.* **33**:44-48.

62. J.R. Botta., J.T. Lauder, M.A. Jewer. (1984). *Effect of methodology on total volatile basic nitrogen (TVBN) determination as an index of quality of fresh Atlantic cod (Gadus morhua)*. J. Food. Sci. **49**:734-736, 750.
63. T.A. Gill. (1990). *Objective analysis of seafood quality*. Food Rev. Int. **6**. 681-714.
64. L.P. Rogers, W.F. Staruskiewicz. (2000). *Histamine Test Kit Comparison*. J. Aquatic Food. Product. Technology. **9 (2)**:5-17.
65. S.L. Taylor, L.S. Guthertz, E.R Therwood. (1979). *Histamine production by klebsiella pneumoniae and an incident of scombroid fish poisoning*. J. Applied and environmental. Microbiology. **37(2)**:274-278.
66. J.M. Ryder, D.H. Buisson, N. Scott, G.C. Fletcher. (1984). *Storage of New zeland jack mackerel (trachus novaezelandiae) in ice: chemical morphological and sensory assessment*. J. Food. Sci. **49**:1453-1456.
67. E.R. Lieber, S.L. Taylor. (1978). *Thin-layer chromatographic screening methods for histamine in tuna fish*. J. Chromatogr. **153**:143-152.
68. J.L. Meitz, E. Karmas. (1978). *Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition*. J. AOAC. **61(1)**:139-145.
69. J.Y. Hui, S.L. Taylor. (1983). *High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66**:853-857.
70. W.F. Staruszkiewicz, E.M. Waldron, J.F. Bond. (1977). *Fluorometric determination of histamine in tuna: development of method*. J. AOAC. **60**:1125-1131.
71. Data from National Institute of Standards and Technology (NIST), database 69-march 2003 release NIST chemistry webbook.
72. C.A. Parker. (1986) *photoluminescence of solutions*, (Ed) Elsevier, Amsterdam.
73. N.Kh. Petrov, M.N. Gulakov, M.V. Alfimov, G. Busse, B. Frederichs, S. Techerts. (2004). *Non radiative relaxation of thiocarbocyanine dyes in binary mixtures*, J. of fluorescence. **14**:87-89.
74. F.W. McLafferty, F. Turecek. *Interpretation of mass spectra*. 4^{eme} Ed, University science book, Sausalito, California.
75. V.J. Pellegrin. (1983). J. Chem. Educ. **60** : 626-633
76. E.L. Wehry. (1980). *Molecular fluorescence, and chemiluminescence spectrometry*. Anal. Chem. **52**:75-90.

77. I.M. Warner, L.B. McGown. (1992). *Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence*. Anal. Chem. **64**: 162-175.
78. A.G. Mwalupindi, T.N. Thiliyhali, I.M. Warner. (1992). *Characterisation of select organic analytes in reverse micelles using lanthanide counterions as acceptors*. Anal. Chem. **64**: 1840-1844.
79. B-S. Hwang. (2003). *A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products*. Food. Chemistry. **82(2)**:329-334.

RESUME

L'histamine est une substance très toxique, identifiée comme étant la source de nombreuses allergies (maux de ventre, vomissement, diarrhée, ulcère de l'estomac, collapsus, œdème, céphalée, tachycardie, etc.). Les aliments histamino-producteur sont nombreux, mais la plus grande source d'intoxication à l'histamine est constituée par les produits halieutiques et dérivés.

L'histamine, en plus de son implication dans les problèmes sanitaires présente un enjeu économique énorme. En effet, chaque année à travers le monde les dépenses en test dépassent 1 milliard de dollars US. D'ou la nécessité d'une nouvelle méthode de dosage très efficace et très compétitive car les méthodes actuelles présentent de nombreuses insuffisances (précision et coût).

Dans ce travail nous avons élaboré une nouvelle méthode fluorimétrique pour le dosage de l'histamine dans les produits halieutiques à l'aide de la fluorescamine et dans les solutions tensioactives (SDS, CTAC et Brij-700). L'optimisation du milieu (solvant, volume d'eau de condensation, pH, concentration de fluorescamine, concentration micellaire et temps d'irradiation) nous a permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Cette méthode est très sensible ($LD \approx 0,5-36$ ng/ml selon le solvant) et elle est très rapide car à la différence des autres méthodes fluorimétrique, ici la condensation entre l'histamine et le sensibilisateur (fluorescamine) est quasi instantanée ($t_{1/2} = 0.5$ s). La méthode est efficace car elle présente un taux de fiabilité autour de 95-98% et un domaine de linéarité (LDR) très large. Plusieurs applications à des échantillons réels de poissons ont donné des résultats satisfaisants.

Mots Clefs : histamine, fluorescamine, solvant, fluorescence, dosage, produits halieutiques, solution tensioactive, limite de détection.