

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



## ECOLE DOCTORALE PHYSIQUE, CHIMIE, SCIENCES DE LA TERRE, DE L'UNIVERS ET DE L'INGENIEUR

### FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année 2019-2020

N° d'ordre :

### THESE DE DOCTORAT

**Spécialité** : Chimie Physique Appliquée à l'Energie et à l'Analyse

*Présentée par*

**KHEMESSE KITAL**

*Sur le sujet :*

**Nouvelles méthodes d'analyse de l'agmatine par voies spectrophotométriques d'absorption et de fluorescence: applications sur les crevettes, les raisins et les boissons - Cinétique et étude thermodynamique de la réaction de formation du complexe orthophtalaldéhyde-agmatine**

**Soutenu le 31 août devant le jury composé de :**

Qualité	Nom	Prénoms	Grade	Etablissement
Président	COLY	Atanasse	Professeur	UCAD-SENEGAL
Rapporteurs	DIOP	Abdoulaye	Professeur	UCAD-SENEGAL
	KOUSSEMON	Marina	Professeur	UNA-COTE D'IVOIRE
	GAYE	Mame Diabou Seye	Professeur	UCAD-SENEGAL
Examineurs	CISSE	Lamine	Professeur	UCAD-SENEGAL
Co-directeur	DELATTRE	François	Professeur	ULCO-FRANCE
Directeur de Thèse	TINE	Alphonse	Professeur	UCAD-SENEGAL

## DÉDICACES

*Je dédie ce travail à :*

ma défunte mère *Fatou NDIAYE*,

mon défunt frère *François Malé KITAL*,

mes défunts oncles *Babou NDIAYE* et *Yalla NDIAYE*,

ma défunte tante *Maréme NDIAYE*,

Reposez vous en paix

mon père *Dibor KITAL*,

mon époux *Lamine DIOUF*,

toute ma famille et ma belle famille,

tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenue et réconfortée

Longue vie à vous tous.

## REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au Laboratoire de Photochimie et d'Analyse (LPA) de l'Université Cheikh Anta DIOP (UCAD) de Dakar sous la direction du Professeur Alphonse TINE et au Laboratoire de Synthèse Organique et Environnement (LSOE) de l'Université du Littoral Côte d'Opale sous la direction du Professeur François DELATRE.

Je tiens à remercier du fond du cœur le Professeur **Alphonse TINE** directeur de cette thèse d'avoir suivi avec rigueur le déroulement de ces travaux. Je vous adresse toute ma sympathie, ma reconnaissance et ma gratitude. Ces années d'apprentissage à vos côtés me seront d'un grand apport pour la suite de ma carrière professionnelle. Merci Professeur

Je tiens à remercier vivement le Professeur **François DELATRE**, co-directeur de cette thèse de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant 3 années où j'ai abattu une bonne partie de cette thèse. Je tiens à vous témoigner ma vive reconnaissance et ma profonde gratitude d'avoir suivi avec enthousiasme l'ensemble de mes travaux. Merci Professeur.

Je remercie le Professeur **Atanasse COLY**, président du jury et directeur du LPA, où j'ai effectué une bonne partie de mes travaux de thèse. Vous avez été toujours disponible et m'avez prêté une oreille attentive. Vos remarques et commentaires m'ont permis de clarifier certains points de recherche. Je vous dis merci du fond du cœur d'avoir accepté de présider ce jury.

Professeur **Abdoulaye DIOP**, mes sincères remerciements pour l'honneur que vous me faites d'être rapporteur de cette thèse.

Professeur **Marina KOUSSEMON**, mes sincères remerciements pour l'honneur que vous me faites d'être rapporteur de cette thèse.

Professeur **Mame Diabou GUEYE SEYE**, qui m'a beaucoup soutenu avec son expérience et ses précieux conseils je vous remercie et je vous exprime aussi ma reconnaissance pour l'honneur que vous m'avez fait de participer dans ce jury.

Professeur **Lamine CISSE**, je vous remercie pour votre humilité, votre simplicité dans nos relations professeur-étudiant et votre soutien. Merci d'accepter de juger ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements au professeur **Moussa MBAYE** pour son soutien et ses conseils.

## REMERCIEMENTS

---

Je remercie le professeur **Dominique COURCOT** de m'avoit accueilli à la maison de recherche Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) pendant 3 années et où j'ai abattu une bonne partie de cette thèse.

Je remercie Mesdames **Francine CAZIER, Sophie FOURMENTIN et toute l'équipe de** recherche de l'UCEIV de l'Université du Littoral Côte d'Opale de leurs remarques pertinentes tout le long de mes séjours à Dunkerque.

Je remercie **Steven, Amaury et Pierre**, techniciens à l'Université de Littoral Côte d'Opale de leur soutien pour la réalisation de ce document.

Je voudrais remercier les chercheurs avec qui j'ai travaillé. Je veux citer : **Moussa MBAYE, Diégane SARR, Moumouny TRAORE, Maurice Aly Olivier MBAYE, Pape Aboulaye DIAW, Diène Diégane THIARE, Abdourahmane KHONTE, Clémence MOITESSIER, Isabelle DELSARTE**. J'ai beaucoup appris avec vous aussi bien sur le plan scientifique que relationnel.

J'exprime ma sincère gratitude à tous les doctorants du Laboratoire de Photochimie et d'Analyse (**Ousmane FAYE, Abdoulaye Nikhor FAYE, Jean Pierre BAKHOUM, El Hadj BODIAN, Souleymane SAMBOU, Ibrahima SARR, Coumba GUEYE, Jean Marie BAKHOUM, Adama DIONE, Latyr DIONE ...**) pour leur soutien moral et leurs conseils scientifiques.

Permettez-moi de remercier tous les **enseignants-chercheurs** du département de chimie de la Faculté des Sciences et Techniques pour leur soutien tout le long de ma formation universitaire.

Je présente également mes remerciements aux autorités et au personnel administratif de la **Faculté des Sciences et Techniques, de l'Ecole Doctorale Physique, Chimie, Sciences de la Terre de l'Univers et de l'Ingénieur (ED-SPTUI)** pour m'avoit facilité les conditions d'inscription et de formation.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à la **Coopération Française** pour m'avoit octroyé une bourse de mobilité qui m'a permis de réaliser ce travail.

---

---

## TABLE DES MATIERES

## TABLE DES MATIERES

DÉDICACES .....	I
REMERCIEMENTS .....	II
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	2
PARTIE A: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES AMINES BIOGENES .....	8
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES AMINES BIOGENES .....	9
I.1 Origine des amines biogènes.....	9
I.2 Classification et structures des amines biogènes .....	10
I.3 Présence de quelques amines biogènes dans les denrées alimentaires .....	12
I.3.1 Amines biogènes dans la viande, le lait et les produits halieutiques .....	12
I.3.2 Amines biogènes dans les boissons.....	14
I.3.3 Aliments d'origines végétales.....	16
I.4 Formation des amines biogènes dans les aliments .....	18
I.4.1 Influence des micro-organismes .....	18
I.4.2 Influence des précurseurs .....	22
I.4.3 Facteurs environnementaux.....	23
I.4.3.1 Effet de la température.....	23
I.4.3.2 Effet du pH.....	24
I.4.3.3 Effet de NaCl .....	24
I.4.3.4 Effet des sucres .....	25
I.5 Fonctions des amines biogènes et différents symptômes observés après consommation.....	26
I.5.1 Fonction dans l'organisme .....	26
I.5.2 Fonction dans les végétaux.....	28
I.5.3 Symptômes .....	28
I.6 Régulation et réglementation.....	29
CHAPITRE II : REVUE SUR L'AGMATINE.....	32
II.1 Historique .....	32

IV

## TABLE DES MATIERES

---

II.2 Propriétés de l'agmatine .....	33
II.3 Synthèse et dégradation de l'agmatine .....	34
II.3.1 Synthèse par voie enzymatique .....	34
II.3.2 Synthèse de l'agmatine par voie chimique .....	35
II.3.3 Dégradation de l'agmatine .....	36
II.4 Répartition et transport de l'agmatine dans l'organisme .....	37
II.4.1 Répartition.....	37
II.4.2 Transport .....	39
II.5 Diverses fonctions de l'agmatine .....	40
II.5.1 Fonctions biologiques et physiologiques .....	40
II.5.2 Fonctions pharmacologiques .....	43
II.5.2.1 Effet de l'agmatine dans le traitement de l'information douloureuse.....	43
II.5.2.2 Effet de l'agmatine sur le stress .....	43
II.5.2.3 Agmatine et sport.....	44
II.5.3 Utilisation de l'agmatine dans le traitement de certaines maladies.....	45
II.6 Pathologies liées à l'agmatine .....	45
II.7 Méthodes d'extraction de l'agmatine .....	46
II. 7.1 Efficacité des solvants d'extraction pour l'agmatine .....	46
II.7.2 Extraction de l'agmatine dans les liquides physiologiques .....	47
II.7.2.1 Extraction dans l'urine .....	47
II.7.2.2 Extraction dans le sang.....	47
II.7.3 Extraction dans les aliments et boissons .....	48
II.7.3.1 Extraction dans les poissons.....	48
II.7.3.2 Extraction dans le fromage .....	49
II.7.3.3 Extraction dans le vin.....	50
II.8 Méthodes d'analyse de l'agmatine.....	50
II.8.1 Méthodes chromatographiques.....	51
II.8.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	51
II.8.1.2 Chromatographie en phase liquide de haute performance (CLHP) .....	52

## TABLE DES MATIERES

---

---

II.9.1.3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	54
II.9.2 Méthodes enzymatiques .....	54
II.8.3 Méthode spectrofluorimétrique.....	55
Références .....	57
PARTIE B : EXPERIMENTATION .....	83
CHAPITRE III : PARTIE EXPÉRIMENTALE .....	84
III.1 Produits utilisés .....	84
III.2 Les solvants .....	84
III.3 Instrumentation.....	85
II.4 Procédures expérimentales.....	86
II.4.1 Préparation des solutions.....	86
III.4.2 Détermination de la stœchiométrie du complexe OPA-AGM.....	86
III.4.2.1 Méthode des réactifs limitants .....	86
III.4.2.2 Méthode de JOB .....	87
III.4.2.2.1 Principe de la méthode .....	87
III.4.2.2.2 Démonstration de la méthode de Job pour une stœchiométrie de type (1:m).....	88
III.4.2.3 Méthode de Benesi-Hildebrand .....	90
III.4.2.3.1 Principe de la méthode .....	90
III.4.2.3.2 Démonstration de l'équation de Benesi-Hildebrand modifiée.....	91
III.4.3 Méthode de calcul des limites de détection, des limites de quantification et la déviation relative standard.....	94
III.4.4 Limite de tolérance d'une substance interférente .....	95
III.6 Méthode d'addition standard et calcul du pourcentage de recouvrement .....	98
III.6.1 Principe de la méthode d'addition standard .....	98
III.6.2 Détermination du taux massique .....	98
III.6.3 Détermination du pourcentage de recouvrement.....	99
III.7 Méthode de détermination des paramètres thermodynamiques .....	100
III.8 Méthode générale de détermination d'ordre d'une réaction chimique à deux réactifs.....	101
III.8.1 Détermination de l'ordre global.....	102

## TABLE DES MATIERES

---

II.8.2 Détermination de l'ordre partiel.....	103
Références .....	104
PARTIE C : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	105
CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE .....	106
IV.1 Étude préliminaire sur les spectres d'absorption de l'Orthophtalaldéhyde.....	106
IV.1.1 Etude d'absorption de l'Orthophtalaldéhyde dans différents solvants.....	106
IV.1.2 Effet du pH sur les spectres d'absorption de l'OPA .....	107
IV.2 Étude du complexe OPA-AGM.....	108
IV.2.1 Mise en évidence du complexe OPA-AGM .....	108
IV.2.2 Détermination de la stœchiométrie du complexe entre OPA et AGM.....	109
IV.2.3 Etude de la stabilité du complexe OPA-AGM .....	111
IV.2.4 Effet du pH sur les spectres d'absorption du complexe OPA-AGM.....	112
IV.2.5 Droite de calibration dans différents solvant .....	113
IV.2.6 Détermination des performances analytiques .....	114
IV.2.7 Etude d'interférence .....	115
IV.2.7.1 Avec les amines biogènes .....	115
IV.2.7.2 Interférence avec les sels.....	122
CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE.....	128
V.1 Caractéristiques spectrales du complexe OPA-AGM .....	128
V.2 Détermination des paramètres analytiques optimaux.....	129
V.2.1 Détermination de la stœchiométrie du complexe OPA-Agmatine .....	129
V.2.1.1 Détermination de la stœchiométrie par la méthode des réactifs limitants.....	129
V.2.1.2 Détermination de la stœchiométrie par la méthode de JOB.....	130
V.2.1.3 Détermination de la stœchiométrie par la méthode de Benesi-Hildebrand .....	131
V.2.2 Optimisation du spectre de fluorescence du complexe OPA-AGM .....	132
V.2.2.1 Effet de l'agitation sur la fluorescence du complexe OPA-AGM .....	132
V.2.2.2 Effet du pH sur l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM .....	133

## TABLE DES MATIERES

---

---

V.2.2.3 Effet du chauffage sur la stabilité du complexe OPA-AGM.....	134
V.3 Droite de calibration et Performances analytiques .....	135
V.3.1 Droites de calibrations.....	135
V.3.2 Performances analytiques .....	137
V.4 Étude d'interférence d'espèces étrangères ajoutées.....	139
V.4.1 Interférence avec les amines biogènes .....	139
V.4.2 Interférence avec les sels .....	143
V.5 Applications.....	146
V.5.1 Dosage de l'agmatine dans les crevettes.....	146
V.5.1.1 Choix des crevettes.....	146
V.5.1.2. Mise en évidence de l'agmatine dans les crevettes.....	148
V.5.1.3 Caractéristiques des droites d'étalonnage et d'addition standard dans les différents extraits.....	149
V.5.1.4 Détermination du pourcentage massique (g/Kg).....	151
V.5.1.5 Détermination du pourcentage de recouvrement.....	152
V.5.1.6 Evolution de la teneur d'agmatine pure dans les crevettes en fonction du temps de conservation à différentes températures .....	154
V.5.2 Application sur les raisins.....	159
V.5.2.1 Choix du raisin.....	159
V.5.2.2. Mise en évidence de l'agmatine dans le raisin .....	160
V.5.2.3 Caractéristiques des droites d'étalonnage et d'addition standard .....	160
V.5.2.4 Détermination du pourcentage massique (g/Kg).....	161
V.5.2.5 Détermination du pourcentage de recouvrement.....	162
V.5.3 Application sur les boissons alcoolisées (après fortification).....	162
V.5.3.1 Choix des boissons .....	162
V.5.3.2. Mise en évidence de l'agmatine dans les boissons .....	163
V.5.3.3 Caractéristiques des droites d'étalonnage et d'addition standard .....	164
V.5.3.4 Détermination du pourcentage de récupération d'agmatine dans les vins et la bière.....	165

## TABLE DES MATIERES

---

CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET L'AGMATINE .....	167
VI.1 Etude thermodynamique de la réaction entre OPA et AGM .....	167
VI.1.1 Effets de la température et de l'OPA sur la fluorescence du complexe OPA-AGM.....	167
VI.1.2 Détermination de la constante d'association $K_a$ entre l'OPA et l'AGM à différentes températures .....	168
VI.1.3 Détermination des paramètres thermodynamiques .....	169
VI.2 Etude cinétique de la réaction de formation du complexe OPA-AGM .....	171
VI.2.1 Détermination de l'ordre global de la réaction.....	171
VI.2.2 Détermination des ordres partiels par rapport à l'AGM et l'OPA.....	176
Références .....	182
CONCLUSION GENERALE.....	188
PERSPECTIVES .....	190

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I.1: Classification de quelques amines biogènes et leurs acides aminés précurseurs.....	11
Tableau I.2: Diverses amines biogènes contenues dans quelques produits alimentaires [8].....	13
Tableau I.3: Les amines biogènes contenues dans le vin et la bière.....	16
Tableau I.4: Sources alimentaires et teneur (mg/portion) des polyamines dans les dietists XP [36] .....	17
Tableau I.5: Amines biogènes et bactéries productrices dans différentes matrices alimentaires ..	21
Tableau I.6: Effets de quelques amines biogènes.....	27
Tableau II.1: Distribution de l'agmatine dans les différents organes de rat [163].....	39
Tableau II.2: Résumé des études montrant les effets antidépresseurs de l'agmatine sur les animaux [190] .....	42
Tableau II.3: Teneur d'agmatine détectée par la méthode CLHP dans différentes matrices selon le type de dosage .....	53
Tableau IV.1: Caractéristiques spectrale de l'OPA dans différents solvants .....	107
Tableau IV.2: Propriétés spectrales d'absorption UV-Visible et paramètres d'analyse du complexe OPA-AGM dans différents solvants .....	115
Tableau IV.3: Valeurs des limites de tolérances des amines biogène ajoutées.....	120
Tableau IV.4: Valeurs des limites de tolérances et taux massique par rapport à l'agmatine des sels ajoutées.....	127
Tableau V.1: Caractéristiques des droites de calibration en fonction du solvant .....	136
Tableau V.2: Détermination de l'écart-type des intensités de fluorescence .....	137
Tableau V.3: Paramètres analytiques du complexe dans différents solvants .....	139
Tableau V.4: Valeurs des limites de tolérance des amines biogènes susceptible d'interférées avec l'agmatine .....	141
Tableau V.5: Valeurs des limites de tolérance avec les sels susceptible d'interférées avec l'agmatine .....	145
Tableau V.6: Masse massique et caractéristiques des droites d'étalonnage et d'addition de l'agmatine .....	152
Tableau V.7: Résultats statistiques par la méthode d'addition standard : pourcentage de recouvrement, pourcentage massique et déviation relative standard.....	153

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau V.8: Evaluation du pourcentage de recouvrement par une procédure d'extraction en phase solide (EPS).....	162
Tableau V.9: Pourcentage de récupération de l'AGM dans le vin.....	166
Tableau VI.1: Constante d'association et paramètres thermodynamiques du complexe OPA-AGM .....	170
Tableau VI.2: Variation du coefficient de corrélation en fonction de l'ordre de réaction.....	176
Tableau VI.3: Résultats paramétriques de la cinétique de formation du complexe OPA-AGM .	180

## LISTE DES FIGURES

### LISTE DES FIGURES

Figure III.1: Structure de l'agmatine sulfaté (A) et de l'orthophtalaldéhyde (B) .....	84
Figure III.2 : Procédure d'extraction de l'agmatine .....	97
Figure IV.1 : Spectres d'absorption de l'OPA dans différents les solvants polaires : protiques (A) et aprotiques (B) ([OPA]= $4.10^{-4}$ M) ; Diméthylformamide (DMF) ; Acétonitrile (ACN) Diméthylsulfoxyde (DMSO).....	107
Figure IV.2 : Effet du pH sur les spectres d'absorption (A) et sur l'intensité d'absorbance (B) de l'OPA ([OPA] = $4.10^{-4}$ M) .....	108
Figure IV.3 : Spectres d'absorption de l'AGM (S1) et de l'OPA (S2) dans l'eau déminéralisée	109
Figure IV.4 : Spectres d'absorption du complexe OPA-AGM (a) et (S1+S2) (b) dans l'eau déminéralisée.....	109
Figure IV.5: Evolution de l'absorbance du complexe OPA-AGM en fonction de la concentration de l'AGM ( $\lambda_{Ab} = 328$ nm).....	110
Figure IV.6: Evolution de l'absorbance du complexe OPA-AGM en fonction de la concentration de l'OPA ( $\lambda_A = 328$ nm).....	111
Figure IV.7: Evolution du signal d'absorption du complexe OPA-AGM en fonction du temps.	112
Figure IV.8: Effet du pH sur le spectre d'absorption (A) et sur l'intensité d'absorbance (B) du complexe OPA-AGM.....	113
Figure IV.9: Droites de calibration du complexe OPA-AGM dans différents solvants .....	114
Figure IV.10: Effet des interférants sur les spectres d'absorption du complexe OPA-AGM : Cadavérine (A), Dopamine (B), Histamine (C), Putrescine (D), sérotonine (E), Spermidine (F), Tryptamine (G), Tyramine (H) [OPA]= $10^{-3}$ M ; [AGM]= $12.10^{-5}$ M.....	117
Figure IV.11: Effet des amines biogènes sur l'absorbance du complexe OPA-AGM.....	118
Figure IV. 12: Effet de la sérotonine sur l'absorbance du complexe OPA-AGM .....	119
Figure IV.13: Comparaison de la bande d'absorption du complexe OPA-AGM avec les autres complexes OPA-amine vers 328 nm : (A) OPA-AGM et OPA-HIST ; (B) OPA-AGM et OPA-TYR ; (C) OPA-AGM et OPA-PUT et (D) OPA-AGM et OPA-SERO .....	121
Figure IV.14: Effet de $MgSO_4$ et $Na_3PO_4$ sur l'absorbance du complexe OPA-AGM .....	122
Figure IV.15: Effet de $CaCl_2$ sur l'absorbance du complexe OPA-AGM.....	123
Figure IV.16: Effet de $FeCl_2$ sur l'absorbance du complexe OPA-AGM.....	124

## LISTE DES FIGURES

---

Figure IV.17: Effet de $\text{FeCl}_2$ sur le spectre d'absorption du complexe OPA-AGM.....	125
Figure IV.18: Comparaison des spectres d'absorption a, b et c avec celui du mélange OPA et $\text{FeCl}_2$ .....	125
Figure IV.19: Comparaison du spectre (OPA+ $\text{FeCl}_2$ ) avec la somme (spectre OPA + spectre de $\text{FeCl}_2$ ) .....	126
Figure V.1: Spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM: 3D (A) et 2D (B) .....	128
Figure V.2: Variation de l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM en fonction de la concentration : (A) OPA et (B) AGM.....	130
Figure V.3: Courbe de Job.....	131
Figure V.4: Graphes de la double représentation de Benesi-Hildebrand.....	132
Figure V.5: Cinétiques de formation du complexe OPA-AGM: (1) sans agitation, (2) 5 minutes, (3) 10 minutes, (4) 15 minutes, (5) 20 minutes d'agitation, $[\text{OPA-AGM}] = 10^{-5} \text{ M}$ .....	133
Figure V.6: Effet du pH sur la fluorescence du complexe OPA-AGM : (A) sur les spectres et (B) sur l'intensité.....	134
Figure V.7: Effet de la température sur le spectre (A) et sur l'intensité (B) de fluorescence du complexe OPA-AGM ( $[\text{OPA-AGM}] = 8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ).....	135
Figure V.8: Droites d'étalonnages de l'agmatine dans différents solvants.....	136
Figure V.9: Effet des amines biogènes sur l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM .....	140
Figure V.10: Spectres des complexes OPA-AGMA et OPA-HIST (pH 13 à 25°C).....	142
Figure V.11: Effet des sels sur l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM .....	144
Figure V.12: Photographie des crevettes : Palaemon serratus ou Bouquet (A) .....	148
Figure V.13: Spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM : (a) Palaemon serratus frais; (b) solution standard ; (c) Penaeus monodon frais; (d) Palaemon serratus séché .....	148
Figure V.14: Détermination de $C_0$ à partir des droites de calibration et d'addition standard dans l'extrait de gambas ( $\lambda_{\text{ex}}=333 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}}=473 \text{ nm}$ ).....	149
Figure V.15: Détermination de $C_0$ à partir des courbes de calibration (a) et d'addition standard (b) de l'agmatine dans l'extrait de bouquet : (A) bouquet frais, (B) bouquet séché ( $\lambda_{\text{ex}}=333 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}}=473 \text{ nm}$ ).....	150

## LISTE DES FIGURES

---

Figure V.16: Différents spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM dans les extraits de crevettes en fonction du temps de conservation à -10 °C : (A) bouquet et (B) gambas.....	154
Figure V.17: Evolution du taux d'agmatine en fonction du temps de conservation à -10 °C : (A) bouquet et (B) gambas .....	155
Figure V.18: Différents spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM dans l'extrait de crevettes en fonction du temps de conservation à +4 °C : (A) bouquet et (B) gambas.....	156
Figure V.19: Evolution du taux d'agmatine en fonction du temps de conservation à +4 °C : (A) bouquet et (B) gambas .....	157
Figure V.20: Différents spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM dans les extraits de crevettes en fonction du temps de conservation à 25 °C : (A) bouquet et (B) gambas .....	158
Figure V.21: Photographes du raisin.....	159
Figure V.22: comparaison des spectres d'excitation et d'émission du complexe OPA-AGM dans la solution standard et dans l'extrait de raisin.....	160
Figure V.23: Droites de calibration (A) et d'addition standard (B).....	161
Figure V.24: Photographie des vins et bière .....	163
Figure V.25: Comparaison des spectres d'excitations et d'émissions du complexe OPA-AGM provenant des solutions standards, des vins et de la bière.....	164
Figure V.26: Droites de calibration (a) et d'addition standard (b) dans les boissons : (A) Abbaye Alveringem Bière Blonde, (B) Bonne nouvelle rouge et (C) Lichette .....	165
Figure VI.1: Effet de la température sur le spectre de fluorescence du complexe OPA-AGM (A) ; Variation de $I_F$ en fonction de la concentration d'OPA. ( $[AGM]_0 = 5 \cdot 10^{-6}$ M, $\lambda_{ex}=333$ nm et $\lambda_{em}=473$ nm) .....	168
Figure VI.2: Courbes de Benesi-Hildebrand à partir de la complexation entre l'AGM et l'OPA.....	169
Figure VI.3: Variation de la constante de formation du complexe OPA-AGM en fonction de la température .....	170
Figure VI.4: Variation de l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM en fonction du temps ( $[AGM]=[OPA]= 5 \cdot 10^{-6}$ ) M $\lambda_{ex}=333$ nm, $\lambda_{em}=473$ nm).....	172
Figure VI.5: Vérification des cinétiques : (A) d'ordre 0 ; (B) d'ordre 1 et (C) d'ordre 2 .....	174
Figure VI.6: Vérification de la cinétique d'ordre 1,5 .....	175

## LISTE DES FIGURES

---

Figure VI.7: Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps ( $[AGM]= 510^{-6}$ M, $[OPA]=10^{-3}$ M).....	176
Figure VI.8: Vérification d'ordres de réaction : (A) ordre 0 et (B) ordre 1,5 .....	177
Figure VI.9: Vérification d'ordre 1 .....	178
Figure VI.10: Vérification des différents ordres q entre 0,6 et 1,1 .....	179
Figure VI.11: Variation du coefficient de corrélation en fonction de l'ordre de réaction .....	180

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

<b>[1]</b> : Référence bibliographique	<b>UV</b> : Ultra-Violet
<b>OPA</b> : Orthophtalaldéhyde	$\lambda$ : Longueur d'onde
<b>AB</b> : Amine Biogène	<b>LT</b> : Limite de Tolérance
<b>AGM</b> : Agmatine	<b>Ex</b> : Excitation
<b>CAD</b> : Cadavérine	<b>Em</b> : Emission
<b>DAP</b> : Diaminopropane	<b>2D</b> : Deux dimensions
<b>EA</b> : Ethanolamine	<b>3D</b> : Trois dimensions
<b>HIST</b> : Histamine	$I_F$ : Intensité de Fluorescence
<b>IAA</b> : Isoamylamine	<b>LOD</b> : Limite de détection
<b>IBA</b> : Isobythylamine,	<b>LOQ</b> : Limite de quantification
<b>MA</b> : Méthylamine,	<b>DRS</b> : Déviation Relatives Standards
<b>MEA</b> : Méthyléthylamine,	<b>AMPC</b> : Amicale Médecine Paris Cordeliers
<b>PHA</b> : Phénylamine,	<b>ISRS</b> : Inhibiteur Sélectif de la Recapture de la Sérotonine
<b>PEA</b> : Phényléthylamine,	<b>CLHP</b> : Chromatographie Liquide Haut Performance
<b>PUT</b> : Putrescine	<b>CPG</b> : Chromatographie en Phase Gazeuse
<b>TRYP</b> : Tryptamine	<b>CCM</b> : Chromatographie sur couche mine
<b>TYR</b> : Tyramine	<b>CCMHP</b> : Chromatographie sur couche mince haute performance
<b>SPD</b> : Spermidine	<b>FAO</b> : Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
<b>SPM</b> : Spermine	<b>OMS</b> : Organisation Mondiale de la Santé
<b>SERO</b> : Sérotonine	<b>AOAC</b> : Association of Official Analytical Chemists
<b>AAD</b> : Acide Aminé Décarboxylase	<b>SPE</b> : Solid-Phase Extraction (Extraction en Phase Solide)
<b>Réf</b> : Référence	<b>ELISA</b> : Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (Dosage immuno enzymatique sur support solide)
<b>IAB</b> : Indice d'Amine Biogènes	<b>HFAA</b> : hexafluoroacétylacétone
<b>TyrDC</b> : Tyrosine Décarboxylase	<b>NDA</b> : Naphtalène-2 ,3-dialdéhyde
<b>pH</b> : Potentiel d'Hydrogène	<b>PVP</b> : Polyvinylpolypyrrolidone
<b>MAO</b> : Monoamine Oxydase	<b>CBD</b> : 3,5-dinitrobenzoyl chloride
<b>DAO</b> : Diamine Oxydase	
<b>ADC</b> : Arginine Décarboxylase	
<b>NMDA</b> : N-Méthyl-D-aspartate	
<b>DFMO</b> : Difluométhylornithine	
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : Ion calcium	
<b>CdCl<sub>2</sub></b> : Chlorure de Cadmium	
<b>ELL</b> : Extraction liquide-liquide	
<b>ICN</b> : Ionisation chimique négative	
<b>NBD-F</b> : 7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazole	
<b>DEEMM</b> : Chlorure de benzoyle, le diethyl éthoxyméthylénemalonate	

**INTRODUCTION GÉNÉRALE**

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

La prise de conscience de l'importance d'une alimentation saine a pris une allure considérable ces dernières années. Par conséquent, tout problème lié à la sécurité alimentaire a un impact certain sur le comportement du consommateur. C'est pourquoi, les organisations liées à la sécurité alimentaire comme : l'Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le codex alimentarius ont été créées. En effet, pour mieux protéger le consommateur, ces organisations sont tenues d'alerter le public en cas de danger afin de trouver des solutions liées aux problèmes de l'alimentation.

La plupart des aliments que nous consommons sont riches en vitamines et protéines. Cependant, ils contiennent souvent d'autres substances en plus, qui peuvent être des sources d'intoxication alimentaire. Parmi ces substances on peut citer les amines biogènes telles que l'histamine, la putrescine, la spermidine, la tyramine, la tryptamine, la  $\beta$ -phényléthylamine, la sérotonine, l'agmatine, la spermine, la cadavérine. Ces amines biogènes sont souvent produites par les acides aminés libres présents dans l'aliment à partir des enzymes décarboxylases tissulaires ou microbiennes [1, 2]. La production de ces amines biogènes dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels on peut citer : le temps de maturation, les conditions de conservation (temps et température), le pH, la teneur en sel et la disponibilité du substrat [3, 4]. Egalement, les amines biogènes sont produites à faible dose de façon naturelle dans les produits de pêche, végétaux, céréales, laitiers et les produits alcooliques [5-11]. Cependant, la quantité d'amines biogènes augmente considérablement en fonction du degré croissant d'altération de l'aliment [12]. Ces amines ont des fonctions importantes dans l'organisme. En effet, elles peuvent influencer des processus métaboliques chez les êtres vivants. Parmi ceux-ci on peut citer : la régulation de la température du corps, la transmission synaptique, les réactions allergiques, la division cellulaire, la prolifération de cellules malignes et le contrôle de la pression artérielle [13-18]. Malgré leurs quelques effets bénéfiques, en grande quantité dans les aliments, les amines biogènes deviennent toxiques [19]. Elles sont entre autres responsables de pseudo-allergies alimentaires et seraient la deuxième cause d'intoxication alimentaire en Europe [20]. Dans les aliments, les amines biogènes telles que l'histamine, la tyramine la putrescine et la cadavérine sont les plus indésirables car, elles peuvent provoquer un large spectre de problèmes sanitaires.

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

Les principaux symptômes résultant de la consommation d'aliments à teneur élevée en amines biogènes sont : les maux de tête, la nausée, l'hypotension ou l'hypertension, les palpitations cardiaques et dans des cas plus graves, l'hémorragie intracérébrale [21, 22]. C'est pourquoi, de nombreux pays et organismes en charge de la sécurité alimentaire sont très attentifs aux problèmes sanitaires liés aux amines biogènes. Par exemple en 2007, l'Union Européenne a lancé le projet de recherche « *BiamFood* », afin de proposer des techniques de production permettant d'éviter la présence d'amines biogènes dans les aliments [23, 24].

Parmi les amines biogènes figure l'agmatine qui est une polyamine aliphatique connue pour être synthétisée dans les organismes vivants par décarboxylation de la L-arginine grâce à l'action d'une enzyme appelée arginine décarboxylase [25]. Comme pour la plupart des amines biogènes sa consommation en grande quantité entraîne la diarrhée, la nausée et des maux de tête [26]. Cependant, l'agmatine a des fonctions physiologiques, biologiques et pharmacologiques importantes dans l'organisme [27-29]. Elle est souvent utilisée comme indice de fraîcheur des aliments [30].

Ainsi, pour une meilleure alimentation de la population mondiale, l'évaluation des amines biogènes dans les denrées alimentaires constitue un défi pour le monde de la recherche. C'est ainsi que plusieurs méthodes ont été développées pour les quantifier afin d'évaluer leurs risques d'intoxication dans les aliments. Parmi celles ci, on peut citer : la chromatographie en phase liquide de haute performance (CLHP), la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la méthode électrochimique. Ces diverses méthodes demandent en général un équipement assez lourd et un personnel très qualifié. Il existe également la méthode enzymatique, cependant son temps d'incubation est assez long. Parmi toutes ces méthodes la CLHP couplée avec un détecteur de fluorescence est la plus utilisée. Cependant, les résultats obtenus sont plus ou moins précis à cause des fluctuations éventuelles.

Dans ce présent travail, nous nous sommes fixés comme objectif de développer des nouvelles méthodes d'analyse de l'agmatine par voie spectrophotométrique UV-visible et voie spectrofluorimétrique. Après ceci, nous avons fait une étude thermodynamique sur la réaction de complexation entre l'OPA et l'agmatine tout en étudiant d'une manière exhaustive la cinétique de cette réaction.

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

Ainsi, cette étude nous permettra d'optimiser les paramètres analytiques en spectrophométrie d'absorption et en fluorescence ; de quantifier l'agmatine dans les matrices alimentaires. Elle nous permettra aussi de connaître les valeurs des paramètres thermodynamiques de même que les caractéristiques de la cinétique de la réaction de formation du complexe OPA-AGM.

Ainsi, ce présent travail comprend trois parties.

La première partie (A) porte sur l'étude bibliographique répartie en deux chapitres :

- le chapitre I porte sur une revue générale sur les amines biogènes ;
- le chapitre II concerne une revue exhaustive sur l'agmatine.

La deuxième partie (B), correspondant au chapitre III, est consacrée à la partie expérimentale.

La troisième partie (C) qui comprend trois chapitres (chapitres IV, V et VI) est consacrée aux résultats et discussion :

- le chapitre IV porte sur la nouvelle méthode d'analyse de l'agmatine en absorption UV-visible ;
- le chapitre V est consacré également au développement de la nouvelle méthode d'analyse de l'agmatine par voie spectrofluorimétrique ;
- Enfin le chapitre VI concerne l'étude thermodynamique et cinétique de la réaction de complexation entre l'OPA et l'AGM par voie fluorimétrique.

### Références

- [1] Ladero V., Calles-Enríquez M., Fernández M., Alvarez M.A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6 (2010) 145-156.
- [2] Brink T.B., Damink C., Joosten H. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal Food Microbiology*, 1 (1990) 73-84.
- [3] Linares D.M., Río B.D., Ladero V., Martínez N., Fernández M., Martín M. C., and Álvarez M.A. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Journal of Food Microbiology*, 3 (2012) 1-10.
- [4] Lonvaud-Funel A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology, Letters*, 1999 (2001) 9-13.
- [5] Moret S., Smela D., Populin T., Conte L.S. A survey on free biogenic amines content of fresh and preserved vegetables. *Journal of Food Chemistry*, 89 (2005) 355-361.
- [6] Herbert P., Cabrita M.J., Ratola N., Laureano O., Alves A. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *Journal of Food Engineering*, 66 (2005) 315-322.
- [7] Rodriguez-Naranjo M.I., Ordóñez J.L., Callejón R.M., Cantos-Villar E., Garcia-Parrilla M.C. Melatonin is formed during winemaking at safe levels of biogenic amines. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 57 (2013) 140-146. Doi: 10.1016/j.fct.2013.03.014.
- [8] Kalac P., Savel J., Krizek M., Pelikánová T., Prokopová M. Biogenic amine formation in bottled beer. *Journal of Food Chemistry*, 79 (2002) 431-434.
- [9] Ali M.A., Poortvliet E., Strömberg R., Yngve A. Polyamines in foods: development of a food database. *Food & Nutrition Research*, 55 (2011) 1-15. Doi: 10.3402/fnr.v55i0.5572.
- [10] Novella-Rodriguez S., Veciana-Nogues M.T., Vidal-Carou M.C. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 5117-5123.
- [11] Chytiri S., Paleologos E., Savvaidis I. and Kontominas M.G. Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwater rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored on ice. *Journal of Food Protection*, 67 (2004) 960-965.

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

- [12] Ruiz-Capillas C. and Jiménez-Colmenero F. Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (2004) 489-499. Doi: 10.1080/10408690490489341.
- [13] Khuhawar M.Y., Memon A.A., Jaipal P.D., Bhangar M.I. Capillary gas chromatographic determination of putrescine and cadaverine in serum of cancer patients using trifluoroacetylacetone as derivatizing reagent. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 723 (1999) 17-24.
- [14] Bouchereau A., Guénot P., Larher F. Review Analysis of amines in plant materials. *Journal of Chromatography B*, 747 (2000) 49-67.
- [15] Halász A., Baráth Á. Toxicity of biogenic amines-the present knowledge. *Food Science and Technology*, 6 (2002) 131-141.
- [16] Jansen S.C., Dusseldorf V.M., Botterma K.C., Dubois A.E. A review *Ann. Allergy Asthma Immunol*, 91 (2003) 233-240. Doi: 10.1016/S1081-1206(10)63523-5.
- [17] Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003) *Can. Journal of Microbiology*, 50 (2004) 521-577. Doi: 10.1139/w04-035.
- [18] Önal A., A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in food. *Journal of Food Chemistry*, 103 (2007) 1475-1486.
- [19] Boutin J.P., Puyhardy J.M., Chianea D., Andreu P., Paez S., Fize L., Vauthier J.M., Chapalain J.C., Gripari J.L., Corbe H., Bietrix P. Les intoxications alimentaires histaminiques Histamine food poisoning. *Santé Publique*, 10 (1998) 29-37.
- [20] Jusserand M.B. Etude du métabolisme des amines biogènes chez les bactéries lactiques du vin. Thèse de doctorat soutenue en 2011, 'Université de Bourgogne-France, 12-39.
- [21] Moret S., Bortolomeazzi R., Lercker G. Improvement of extraction procedure for biogenic in foods and their high-performance liquid chromatographic determination. *Journal of chromatography*, 591 (1992) 175-180.
- [22] Stratton J.E., Hutkins R.W., Taylor S.L. Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: A Review. *Journal of Food Protection*, 54:6 (1991) 460-470.
- [23] Bach B. Composés naturels présents dans le vin et les aliments, les amines biogènes peuvent provoquer des allergies et des mauvais goûts. Pour mieux les connaître, le Service

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

technique d'Inter Rhône a participé au programme européen de recherches Biamfood (2011) Bilan Œnologie N° 771.

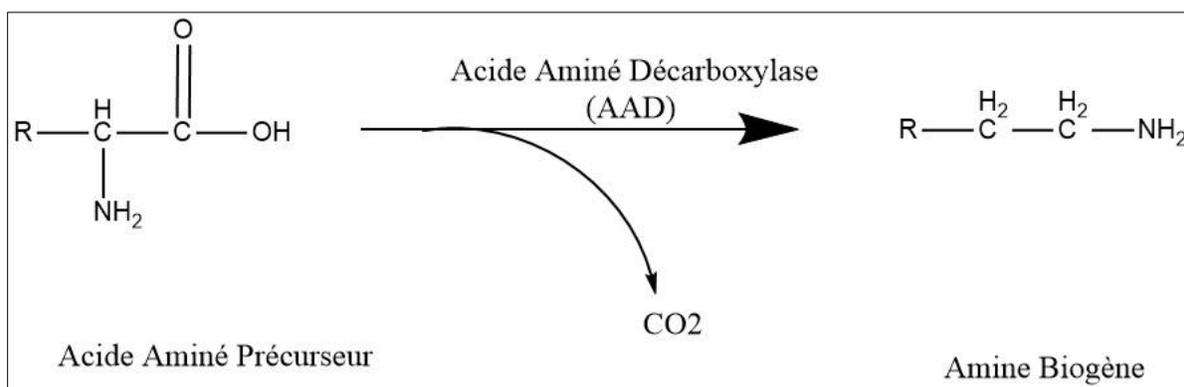
- [24] Renouf V. La fermentation malolactique dans les vins : mécanisme et applications pratiques. Edition Tec et Doc, (2013). Lavoisier: 60.
- [25] Sun X., Song W., Liu L. Enzymatic production of agmatine by recombinant arginine decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (2015) 1-31. Doi: 10.1016/j.molcatb.2015.06.008.
- [26] Keynan O., Mirovsky Y., Dekel S., Gilad V.H., and Gilad G.M. Safety and efficacy of dietary agmatine sulfate in lumbar disc-associated radiculopathy. An open-label, dose-escalating study followed by a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain Medicine*, 11 (2010) 356-368.
- [27] Marx M., Trittenwein G., Aufrich C., Hoeger H., Lubec B. Agmatine and Spermidine reduce collagen accumulation in kidneys of diabetic db/db mice. *Nephron*, 65 (1995) 155-158.
- [28] Halaris A., Plietz J.J. Agmatine metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs*, 21 (2007) 885-900.
- [29] Mohseni G., Ostadhadi S., Imran-Khan M. Norouzi-Javidan A., Zolfaghari S., Haddadi N.-S., Dehpour A.-R. Agmatine enhances the antidepressant-like effect of lithium in mouse forced swimming test through NMDA pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 88 (2017) 931-938.
- [30] Eldeep G.S.S., Mokhtar S.M., Mostafa G.A., Taha R.A., Gaballa A.A. Relationship between Biogenic Amine Content and Hygienic Quality of Raw Meat in Fresh Fermented Sausage. *Journal of Food Nutrition*, 2 (2013) 1-7.

**PARTIE A:**  
**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES AMINES BIOGENES**

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES AMINES BIOGENES

I.1 Origine des amines biogènes

Les amines biogènes (AB) sont des composés organiques azotés de faibles poids moléculaires. Elles sont présentes naturellement dans certains aliments non fermentés tels que les fruits, les légumes, la viande et le lait, généralement avec une teneur très faible [1-3]. Une concentration plus importante constatée serait due au catabolisme des cellules vivantes (animales, végétales et microbiennes). Ainsi, ces amines biogènes sont issues soit de la dégradation enzymatique des acides aminés (Figure I.1), soit de l'amination ou de la transamination des aldéhydes et cétones lors de la détérioration des aliments au cours de la fermentation microbienne contrôlée ou spontanée [4].



**Figure I.1:** Schéma de dégradation enzymatique d'un acide aminé en amine biogène

De même, ces amines biogènes peuvent provenir de la dégradation de denrées riches en protéines (viandes, poissons fromages...) sous l'effet d'enzymes synthétisées par les microorganismes (notamment des bactéries) tels que les *entérocoques*, les *lactocoques*, les *lactobacilles*, les *entérobactéries* et les *pseudomonas* [4, 5].

### I.2 Classification et structures des amines biogènes

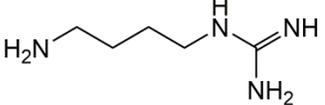
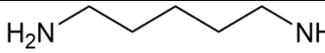
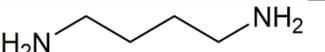
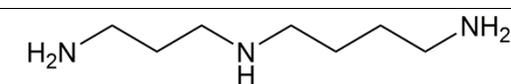
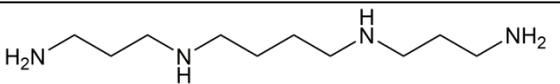
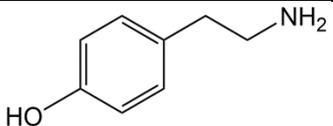
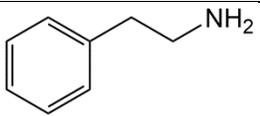
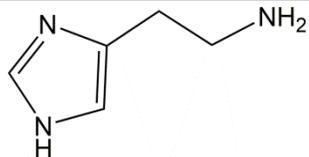
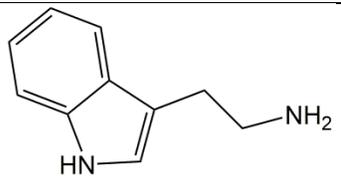
Les structures des amines biogènes sont liées à celles des acides aminés précurseurs d'où elles dérivent. Aussi, ces amines biogènes présentent-elles des structures différentes et elles sont classées en trois catégories: les amines biogènes aliphatiques (putrescine, cadavérine, spermidine et agmatine...), les amines biogènes aromatiques (tyramine et phényléthylamine ...) et les amines biogènes hétérocycliques (histamine et tryptamine,...).

Ces amines biogènes peuvent également être classées suivant le nombre de groupements aminés présents dans leurs structures chimiques. Ainsi, on distingue :

- les monoamines où on note une seule fonction amine sur leurs structures, c'est le cas du 2-phényléthylamine et de la tyramine ;
- les diamines, dans ce cas il y'a deux groupements amines sur leurs structures, c'est la cas pour la putrescine et la cadavérine ;
- les polyamines, c'est le cas où l'amine biogène comprend plus de deux fonctions amines. C'est le cas de l'agmatine, la spermine et la spermidine.

En guise d'exemple, dans le tableau I.1 la structure de quelques amines biogènes et leurs acides aminés précurseurs respectifs sont regroupés.

**Tableau I.1:** Classification de quelques amines biogènes et leurs acides aminés précurseurs.

Classes	Noms et Structures	Acides Aminés Précurseurs
Amines Aliphatiques	Agmatine (AGM) 	Arginine
	Cadaverine (CAD) 	Lysine
	Putrescine (PUT) 	Ornithine
	Spermidine (SPD) 	
	Spermine (SPM) 	
Amines Aromatiques	Tyramine (TYR) 	Tyrosine
	Pényléthylamine (PEA) 	Phénylalanine
Amines Hétérocycliques	Histamine (HIST) 	Histidine
	Tryptamine (TRYP) 	Tryptophane

### I.3 Présence de quelques amines biogènes dans les denrées alimentaires

Les amines biogènes sont présentes dans la plupart des aliments : viande, produits végétaux et boissons fermentées.

#### I.3.1 Amines biogènes dans la viande, le lait et les produits halieutiques

La plupart des aliments sont riches en protéines qui se transforment en acides aminés pour donner des amines biogènes après décarboxylation dans des conditions biologiques favorables.

Les amines biogènes qu'on trouve généralement dans les aliments (viande, produits halieutiques, lait) sont : l'histamine, la putrescine, la cadavérine, la tyramine, la tryptamine, la spermine, la spermidine, l'agmatine et la phényléthylamine. Cependant, la présence des amines biogènes comme la putrescine, la cadavérine et l'agmatine dans l'aliment est en général un indicateur chimique de sa qualité hygiénique [6]. La grande présence d'amines biogènes lors de la fermentation des aliments est due à la décarboxylation microbienne des acides aminés. Ainsi, leur présence dans les aliments fermentés à base de poisson ou de viande renseigne sur le degré d'altération de ces aliments. En effet, la fermentation des aliments est due en grande partie à une croissance microbienne qui est proportionnelle à une augmentation de la quantité d'histamine, amine biogène toxique [6]. Par exemple, dans le saumon salma (poisson) on note une forte présence d'histamine liée à une présence importante de l'histidine qui se transforme en histamine au cours de la fermentation [7].

Le tableau I.2 illustre la présence de quelques amines biogènes contenues dans divers aliments prouvés par différents auteurs.

**Tableau I.2:** Diverses amines biogènes contenues dans quelques produits alimentaires [8]

Produits Alimentaires	Amines Biogènes	Références
Produits laitiers		
lait, yaourt	spermine, spermidine	Novella-Rodriguez et al. 2000
fromage	tyramine, histamine, putrescine, cadavérine, tryptamine, $\beta$ -phényléthylamine	Novella-Rodriguez et al. 2004 Innocente et D'Agostin, 2002 Halasz et al. 1994 Stratton et al. 1991
Produits carnés		
porc frais	tyramine, -phényléthylamine, cadavérine, putrescine, histamine spermine, spermidine	Suzzi et Gardini, 2003 Nadon et al. 2001
saucisson	putrescine, tyramine, tryptamine, histamine, cadavérine, -phényléthylamine, spermine, spermidine	Gonzalez-Fernandez, 2003 Suzzi et Gardini, 2003 Ansorena et al. 2002 Bover-Cid et al. 2001 Pereira et al. 2001 Parente et al. 2001 Rice et Koehler, 1976
bœuf frais ou haché	tyramine, putrescine, histamine, cadavérine, tryptamine	Kaniou et al. 2001 Durlu-Ozkaya, 2001 Edwards et al. 1987
Produits marins		
Poissons : saumon frais et fumé, truite, bar, thon, cabillaud, dorade, Merlu, sardine	histamine, tyramine, putrescine, cadavérine, agmatine, tryptamine, -phényléthylamine, spermidine, spermine, triméthylamine	Chytiri et al. 2004 Paleologos et al. 2004 Tsai et al. 2004 Periago et al. 2003 Hernandez-Herrero et al. 2002 Da Silva et al. 2002 Emborg et al. 2002 Connil et al. 2002c Ruiz-Capillas et Moral, 2001 Jorgensen et al. 2000b Koutsoumanis et al. 1999 Gingerich et al. 1999 Lopez-Sabater et al. 1996
calamar	agmatine, putrescine, cadavérine, tyramine, histamine	Paarup et al. 2002
crevettes	putrescine, cadavérine	Benner et al. 2004

### I.3.2 Amines biogènes dans les boissons

Dans les boissons alcoolisées comme le vin, la bière et le saké une forte présence d'amines biogènes a été notée. On les trouve également dans les boissons non alcoolisées fermentées (shalgam turque). La concentration des amines biogènes dans le vin peut varier de quelques mg/L à 50mg/L. Cependant, la formation des amines dans les boissons dépend de plusieurs facteurs, tels que les processus de vinification, les conditions de stockage, la qualité des matières premières et la contamination microbienne pendant les opérations de cave. Par exemple, pour certaines amines qui sont des constituants normaux du raisin [9], on peut noter une variation sensible de leur teneur selon l'espèce du raisin, son degré de maturation, le type et la composition des sols. C'est pourquoi une caractérisation géographique basée sur le contenu des AB a été proposée comme critère permettant de distinguer plusieurs types de vins en provenance de différents pays ou régions [10, 11]. Là également, les amines biogènes qu'on trouve généralement dans le vin sont : la cadavérine, l'histamine la 2-phényléthylamine, la putrescine, la tyramine, l'agmatine et l'éthanolamine. Parmi toutes ces amines, la putrescine est l'amine la plus abondante dans le vin [12]. Cependant, la teneur en amine est beaucoup plus importante dans le vin rouge que dans le vin blanc [13-15] et leur quantité varie en fonction des régions de culture [16].

Dans la bière, les polyamines sont des constituants naturels, à l'exception de la tyramine, de la cadavérine et de l'histamine dont leur présence indique une contamination microbienne sûre au cours du brassage. Cependant, dans plusieurs bières, l'agmatine est l'amine la plus abondante avec des concentrations allant de 0,5 à 42 mg/L [17, 18]. Il est à noter également que la variété d'orge, la technologie de maltage, de fermentation et les conditions de fabrication peuvent influencer qualitativement et quantitativement sur le contenu des amines biogènes dans la bière. En particulier, lors du traitement du moût, il arrive d'observer simultanément une augmentation significative de l'AGM, et la PUT et en même temps une diminution de la SPD et SPM selon la température et le mode de fermentation [19]. De même, la différence de teneur d'amines biogènes observée dans les boissons peut être expliquée par le mode de production de ces dernières. Par exemple on peut citer la grande teneur d'agmatine observée dans les boissons

alcoolisées comme le vin, la bière et le saké [20] et sa faible teneur dans les boissons non-alcoolisées et fermentées, telles que le Shalgam turque [21]. Tout ceci confirme le rôle des levures sur la présence de l'agmatine dans les boissons.

Dans la bière, si quelques amines telles que l'agmatine, la spermidine et la spermine sont d'origine endogène, la tyramine, la cadavérine, la putrescine, l'histamine, la tryptamine et la phényléthylamine proviennent essentiellement de la voie bactérienne. La plupart d'entre elles présentent des caractères toxiques ; leurs présences influent sur la qualité de la bière. C'est pourquoi, pour s'assurer de la bonne qualité de la bière, Loret et al. [22] ont défini un indice appelé indice d'amines biogènes (IAB) selon l'équation 1 (Eq.1). Dans cette formulation toute valeur de IAB supérieure à 10 correspond à des quantités d'AB supérieures à 10 mg/l ; dans ce cas la boisson est dangereuse pour la santé.

$$IAB = \frac{[TYR]+[PUT]+[CAD]+[HIST]+[PEA]+[TRYP]}{1+[AGM]} \quad \text{Eq.1}$$

Beaucoup d'auteurs ont noté la présence d'amines biogènes dans le vin et la bière. Cependant, selon l'auteur et la nature de l'échantillon étudié la liste d'amines trouvées est très variée (Tableau I.3). Dans tous les cas on remarque la présence de l'histamine et de la tyramine.

**Tableau I.3:** Quelques amines biogènes contenues dans le vin et la bière

Boissons		Amines biogènes	Référence
Vin	Rouge	AGM, CAD, HIST, MEA, PEA, PUT, SPD, SPM, TYR, TRYP et MEA	[23]
		EA, PUT, CAD, HIST et TYR	[24]
		MEA, EA, PUT, CAD, HIST, TYR et EA	[25]
		PUT, HIST, TYR, CAD, SPM, AGM, TRYP, PEA et IAA	[26]
		MEA, ETA, AGM, PHA, PUT, CAD, HIS, SER, TYM, SPD et SPM	[27]
		HIST, AGM, PEA, SPD, TYR, PUT, TRYP, CAD, PHE et IAA	[28]
	Blanc	EA, PUT, CAD, HIST et TYR	[24]
		MEA, ETH, PUT, CAD, HIST, TYR, PEA, TRYP et AGM	[25]
		HIS, AGM, PHA, SPD, TYR, PUT, TRY, CAD, PEA et IAA	[28]
Rose	TRY, HIST, TYP et PEA	[29]	
Bière	EA, PUT, CAD, HIST, TYR, PEA et SPD	[24]	
	MA, DMA, EA, DEA, IAA, PHE, DAP, PUT, CAD, HIST, et TYR	[30]	
	HIST, AGM, PEA, SPD, TYR, PUT, TRYP, CAD, PEA et IAA	[28]	
	HIST, PUT, SPD, TYR et CAD ;	[31]	
	HIST, AGM, EA, TYR, PUT, TRYP, CAD et PEA	[32]	
	HIST, TYR, PUT, TRYP, CAD, PEA et SPD	[29]	

Agmatine (AGM), Cadavérine (CAD), Diaminopropane (DAP), Ethanolamine (EA), Histamine (HIST), Isoamylamine (IAA), Isobythylamine (IBA), Méthylamine (MA), Méthyléthylamine (MEA), Phénylamine (PHA), Phényléthylamine (PEA), Putrescine (PUT), Tryptamine (TRYP), Tyramine (TYR), Spermidine (SPD), Spermine (SPM), Diméthylamine (DMA), Diéthylamine (DEA).

### **I.3.3 Aliments d'origines végétales**

La plupart des aliments d'origine végétale contiennent diverses amines biogènes dont la quantité dépend généralement de la conservation et du temps de maturation. La bibliographie révèle que la putrescine, la spermidine et la spermine sont omniprésentes dans tous les légumes frais jusqu'aux taux de quelques mg/100g de poids. Si les légumes verts sont riches en spermidine, les fruits et les jus de fruits sont particulièrement riches en putrescine [33]. Ainsi, lors de la fermentation des légumes, ce taux peut être dépassé. En effet, une augmentation du taux

d'amines biogène est observée tout au long de ce processus [34]. Par exemple, Lavizzari et al. ont trouvé une forte teneur d'histamine dans les épinards en plus des quatre amines TYR, PUT, SPD et SPM que l'on trouve également dans les bananes, les pommes de terre et les noisettes. Cependant, aucune détection de CAD et d'AGM n'a été constatée dans ces fruits [35]. Le tableau I.4 explicite la présence de quelques amines biogènes dans les aliments d'origine végétale.

**Tableau I.4:** Sources alimentaires et teneur (mg/portion) des polyamines dans les dietists XP [36]

Amines biogènes	Produits alimentaires	Portion en g	Polyamines mg/portion
Putrescine	Jus de pamplemousse frais	200	19,6
	Jus d'orange	200	17
	Choucroute	80	14,6
	Orange	110	14
	Crabe conservé	75	9,2
	Maïs	100	5,1
	Pois vert	100	4,6
	Poire	100	3,0
	Soja cuit	190	1,70
	Pomme de terre cuite	150	1,68
	Paprika vert	30	1,64
	Sauce de soja	18	1,60
Spermidine	Pois vert	140	9,1
	Poire	125	6,6
	Soupe aux lentilles	250	5,5
	Champignon	50	4,4
	Haricots rouges	190	3,7
	Brocoli	100	3,6
	Chou-fleur	100	3,0
	Pommes de terre cuite	150	1,8
Spermine	Pois verts	140	7,3
	Soja cuit	190	7,3
	Poire	125	3,5
	Soupe aux lentilles	250	1,85

Il résulte de ces travaux que le taux de putrescine est beaucoup plus important dans les Choucroutes, les oranges et les crabes conservés. Cependant, dans les choux-fleurs, les haricots rouges et les pois verts, la teneur de spermidine est nettement plus élevée pendant que celle de la spermine est majoritaire dans le pois vert et le soja cuit [36].

### **I.4 Formation des amines biogènes dans les aliments**

La production d'amines biogènes dans les aliments est influencée par la nature des micro-organismes, la présence de substrat, et même par l'environnement (température, salinité, pH).

#### **I.4.1 Influence des micro-organismes**

Beaucoup de micro-organismes sont indispensables à l'Homme (flore intestinale) et à son environnement (conservation des aliments, production de composés thérapeutiques). Egalement, plusieurs auteurs ont montré la présence de micro-organismes dans les aliments et leur capacité de produire des amines biogènes. Cependant, cette production endogène (autolyse par les enzymes tissulaires) de ces amines est moins importante que la production par les enzymes bactériennes [37]. La figure I.2 représente les différentes voies de production des amines biogènes à partir de la protéine, généralement après formation d'acides aminés. Sur ce schéma, on note six voies de formation :

- voie 1, l'histamine via l'histidine ;
- voie 2, la tryptamine via la tryptophane ;
- voie 3, la tyramine et la dopamine via la tyrosine, l'épinephrine via la noradrénaline via la dopamine via la tyrosine ;
- voie 4, l'agmatine via l'arginine, la putrescine via l'arginine + agmatine, la spermidine et la spermine via la putrescine et vice versa ;
- voie 5 l'omithine via glutamine, putrescine via l'omithine, la spermidine et la spermine via la putrescine et vice versa ;
- voie 6 la cadavérine via la lysine.

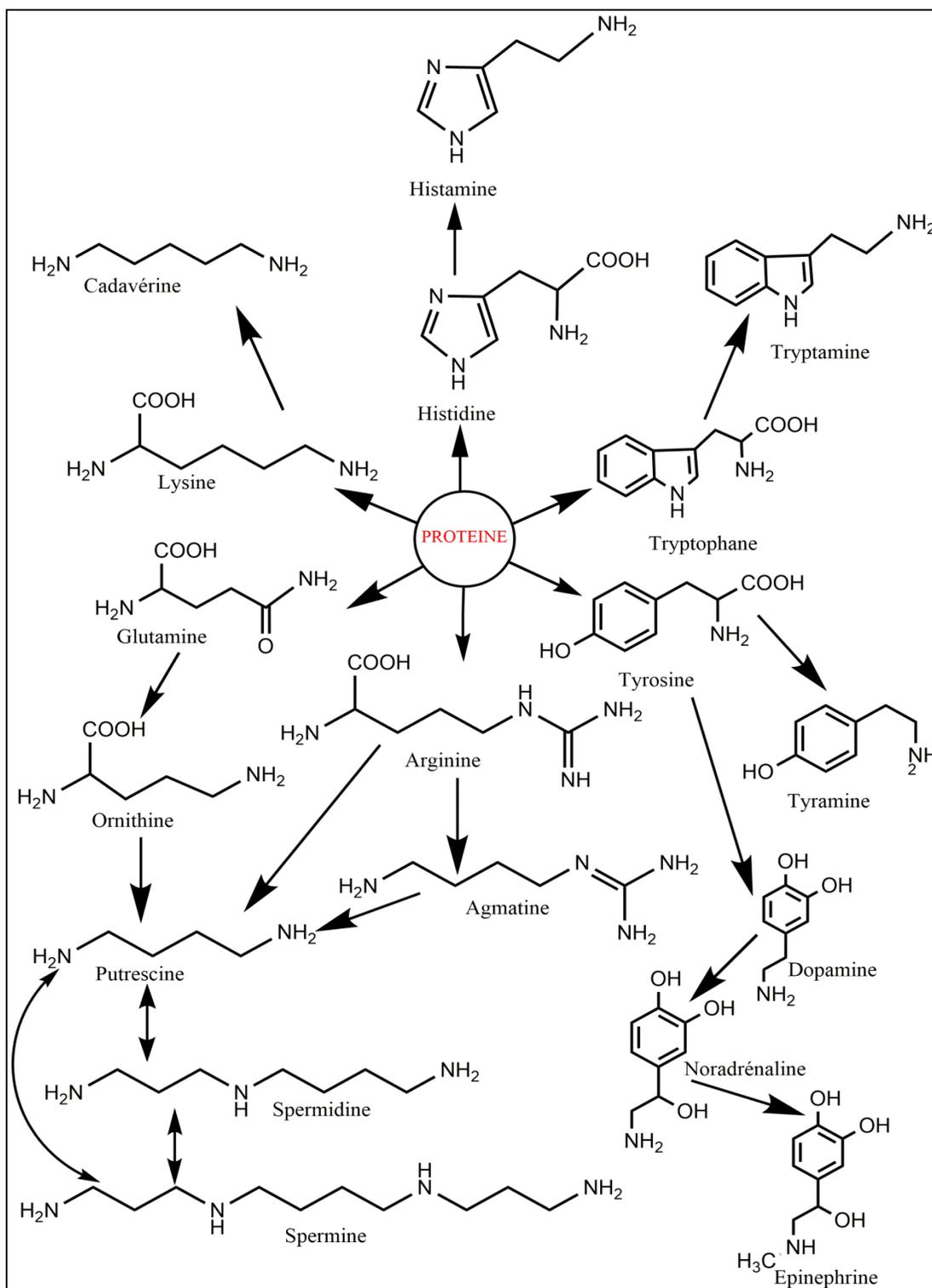


Figure I.2 : Voies de formation des différentes amines biogènes à partir des protéines

Ces différentes transformations peuvent se faire en présence de certaines bactéries. On distingue cependant deux types de bactéries : les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif.

Les bactéries à Gram négatif principalement les *entérobactéries*, et les *Entérocooccus* sont particulièrement présentes dans la viande ou dans les produits à base de viande (sauces fermentées). Ces types de bactéries sont capables de produire des amines biogènes telles que l'histamine, la putrescine, la cadavérine et la tyramine [38]. Cependant dans les fromages, les couches bactériennes comme les *Entérobactéries* dont les genres, *Serratia*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* et l'espèce *Escherichia coli* peuvent produire une quantité importante d'amines biogènes. Parmi ces amines, la cadavérine et la putrescine sont toujours majoritaires avec un taux dépassant 100 ppm. Malgré tout, avec ces bactéries, l'histamine et la tyramine sont toujours présentes, même à de faibles quantités [39].

Les bactéries à Gram positif comme les *lactobacilles* sont responsables également de la production d'amines biogènes dans le lait, les produits laitiers particulièrement les fromages mais aussi dans les boissons fermentées comme le vin et autres boissons cibles [40-43]. Là également, les micro-organismes sont aussi impliqués dans les processus de fermentation des aliments et sont ainsi à l'origine de formation des AB. Ainsi, certains auteurs ont montré la capacité des bactéries à produire des amines biogènes dans les saucisses fermentées [44, 45]. Cependant, ils y ont noté une grande quantité de tyramine quand la fermentation est faite par voie naturelle [46], même si les précédentes souches de bactéries isolées s'avèrent être plus productrices de la tyramine [47].

Dans le moût et le vin, les différentes bactéries comme : *Hilgardii*, *Lactobacilus brevis*, *Lactobacilus buchneri* et *Lactobacilus mali*, sont capables d'y produire différentes AB [48]. Si les *Oenococcus oeni* contribuent de manière significative à la teneur globale de l'histamine et de la putrescine, la tyramine s'avère être l'amine la plus secrétée par les bactéries isolées du vin [49, 50]. En revanche, l'histamine peut être produite en quantité importante dans les fromages par les bactéries *lactobacillus buchneri* [51, 52] et dans le poisson ou les sauces de poisson par la bactérie *Tetragenococcus muriaticus* [53]. Sur le tableau I.5 nous présentons les types d'amines biogènes et les bactéries productrices dans différentes matrices alimentaires.

Tableau I.5: Amines biogènes et bactéries productrices dans différentes matrices alimentaires

Amines biogènes	Bactéries	Source alimentaire, Références
CAD, PUT, HIST, TYR, SPD, PEA, SPM	<b>à Gram négatif</b> <b>Entérobactéries</b> ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>aerogenes Serratia liquefaciens</i> , <i>marcescens</i> , <i>Morganella morgani</i> )	Saucisses sèches, [54] ; Saumon fumé, [55] ; Poisson frais, [56] ; Fromages, [39]
	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Saumon frais, [57]; Fromage, [50]
	<i>Pseudomonas spp.</i>	Viande de volaille, [58]
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Crevette, [59]
TYR, PEA, HIST, TYR, SPM, PUT SPD	<b>à Gram positif</b> <b>Bactéries Lactiques</b> ( <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Oenococcus oeni</i> )	Sauce fermentée, [60] ; Sauce d'uzicka, [61] ; Vin, [62] ; Fromage, [63]
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Vin, [50]
	<i>Tetragenococcus muritaticus</i>	Vin, [48] ; Sauce de poisson, [53]
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Produits carnés fermentés, [64]
HIST, TYR, SPM, SPD		

Il résulte des travaux de ces différents auteurs que la plupart des matrices alimentaires produisent des amines biogènes via les bactéries aussi bien les bactéries à Gram positif que celle à Gram négatif. Il est à noter que les capacités de produire les amines diffèrent d'une bactérie à l'autre. Cependant, on remarque que l'histamine et la spermidine sont généralement produites dans les matrices alimentaires par l'ensemble des bactéries particulièrement *L. brevis*. [61]. En revanche, la tyramine est produite par les bactéries lactiques et les entérobactéries dans le vin et les sauces fermentées à base de viande ou de poisson.

L'implication des microorganismes dans la formation des amines biogènes nécessite l'intervention des précurseurs comme les acides aminés et les protéines.

### I.4.2 Influence des précurseurs

La formation d'amines biogènes provient souvent de la décarboxylation d'acides aminés libres. Ces acides aminés sont présents naturellement dans l'aliment frais (par exemple, les scombridés renfermant généralement plus de 2% d'histidine libre). Ces acides peuvent provenir également de la décarboxylation des protéines (protéolyse). Cependant, la production des amines biogènes à partir des acides aminés dépend des enzymes décarboxylases. Par exemple, en présence de l'enzyme tyrosine décarboxylase (TyrDC), la tyrosine est responsable de la production de la tyramine [65]. De même l'histamine est produite par l'histidine sous l'action de l'enzyme histidine décarboxylase [66].

A cause de leur capacité de produire les amines biogènes, les acides aminés sont souvent introduits dans les milieux de culture cellulaire. Par exemple, le taux de tyramine chez *Lactobacillus brevis* et *L. hilgardii* augmente avec l'ajout de la tyrosine [67]. De même, dans la culture de *L. hilgardii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* ou d'*Enterococcus faecalis*, l'ajout d'agmatine favorise la production de la putrescine [68]. En effet, si la putrescine peut être produite à partir de la décarboxylation de l'ornithine par l'enzyme ornithine décarboxylase, il est possible également de l'avoir à partir de l'arginine via agmatine, amine biogène précurseur des autres polyamines telles que la spermidine et la spermine [69]. Il est important de noter que dans

la culture de *Lactobacillus sp* on n'observe aucune présence d'amine biogène si le milieu n'est pas fortifié avec de l'acide aminé. Cependant, en le fortifiant par l'histidine, la lysine ou l'omithine, on aboutit respectivement à la formation de l'histamine, la cadavérine ou de la putrescine [70, 71]. De même, au cours de la fermentation du vin on note une augmentation significative de l'histamine et de la tyramine [72-74]. Ceci s'explique par la libération progressive du contenu intercellulaire des levures par autolyse qui entraîne une augmentation de la teneur en acides aminés libres, précurseurs potentiels d'amines biogènes obtenues [75]. En fin, les amines biogènes peuvent être produites à partir des protéines. Dans ce cas, les peptides sont hydrolysés dans les milieux extracellulaires par la protéinase. Ils sont ensuite emmenés à l'intérieur de la cellule par un transporteur peptidique, puis hydrolysés par des peptidases intercellulaires en libérant la tyrosine qui, après décarboxylation donne la tyramine [76].

Dans tous les cas, la disponibilité des précurseurs dépend fortement des facteurs environnementaux mais également des autres facteurs comme la quantité des sucres et le volume d'éthanol.

### I.4.3 Facteurs environnementaux

Les paramètres environnementaux qui affectent régulièrement la formation des amines biogènes dans les aliments sont la température, le pH et la salinité.

#### I.4.3.1 Effet de la température

La température est un facteur exogène qui influe sur la production des amines biogènes. La gamme de températures optimales favorables à la production d'amines biogènes est comprise entre 20 °C et 37 °C [77-79]. En dehors de cette gamme, la production d'amines biogènes diminue [80-82]. Ainsi, quand la matrice alimentaire est conservée à des températures < 0 °C, l'activité enzymatique est totalement inhibée, il ne peut donc y exister d'amine biogène [83-85]. Cependant, il est important de préciser que la présence de bactéries psychrophiles peut entraîner

la formation d'amines biogènes même si l'aliment est conservé à des températures très faibles (proches de 0 °C) [86]. En effet, le stockage prolongé à basse température de l'aliment peut entraîner une cumulation d'amines provenant du métabolisme des pseudomonades psychrotrophes [87]. Par exemple, sur une longue durée, la conservation des aliments aux environs de 5 °C peut favoriser la formation de certaines amines biogènes telles que la cadavérine, la tyramine et la putrescine [88]. Ainsi, la température est un facteur important qui influe sur la formation d'amines biogènes dans les aliments. Il est donc recommandé de conserver les aliments à basse température à des durées assez courtes en tenant compte des autres facteurs tels que le pH.

### I.4.3.2 Effet du pH

Le pH influe sur l'activité des microorganismes et des enzymes décarboxylases. Il joue donc un rôle important dans la formation des amines biogènes. Aussi, les faibles valeurs de pH observées dans les matrices constituent-elles un facteur crucial sur l'activité de certaines enzymes décarboxylases et sur la croissance des bactéries [89, 90]. Par exemple, Linares et al. [91] ont montré que la production de la tyramine par les *Entérocoques* est favorisée par de faibles valeurs de pH dans le milieu de culture cellulaire. De même, on note une grande production de spermidine par les *O. oeni T56* à pH 3 [66]. On sait également que les *E. faecium* et les *E. faecalis* peuvent produire plusieurs types d'amines biogènes à des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 6 [92]. Ainsi, la formation d'amines biogènes est généralement favorisée en milieu acide.

### I.4.3.3 Effet de NaCl

En général, le chlorure de sodium est utilisé dans la conservation de beaucoup d'aliments surtout les produits de pêche. Son rôle est d'empêcher le développement des microorganismes pouvant modifier la qualité des aliments. En effet, la présence de NaCl dans les produits alimentaires réduit fortement la formation d'amines biogènes de manière variable. Par exemple, 5% de NaCl dans la matrice alimentaire diminue fortement la production d'amine biogènes [80].

En revanche, Buňková et al. ont constaté une forte production de tyramine dans les souches *Lactococcus lactis* en présence d'un taux de 2% de NaCl [93]. Ces auteurs ont montré également qu'un taux de 2,5% de NaCl diminue fortement la production de l'histamine [77].

### I.4.3.4 Effet des sucres

Les aliments comme les céréales, le riz et les fruits (raisin, mangue, pomme etc) contiennent naturellement des sucres. Ces différents types de sucre affectent le métabolisme des microorganismes et les activités des enzymes décarboxylases ; ce qui influe donc sur la production des amines biogènes. Ceci est confirmé par plusieurs chercheurs :

- les travaux de Latorre et al. ont montré que l'augmentation du sucre (glucose + saccharose) dans le *salame abruzzese* (aliment à base de viande) italien entraîne une réduction considérable de la teneur en cadavérine sans affecter celle de la tyramine [94] ;
- de même, Bover-Cid et al. ont constaté une diminution du taux de tyramine et de cadavérine dans les saucisses formulées avec l'addition du glucose (1g/Kg) et du lactose (20g/Kg) [60] ;
- Gonzaler-Fernandez et al. ont étudié l'effet de combinaison de divers types de sucres tels que le glucose, le lactose et le saccharose sur la formation des amines biogènes dans les chorizos de saucisses. Il s'avère de ces résultats que lorsque la concentration en sucre est supérieure à 1%, et même 0,5% parfois la présence d'amine biogène diminue considérablement [95].

Ces études montrent que les sucres ajoutés influent négativement sur la formation des amines biogènes selon la nature de l'aliment ; ce qui est positif pour la santé si le taux du sucre ajouté ne dépasse pas les normes. C'est pourquoi, la présence d'amines biogènes dans l'organisme et chez les végétaux a suscité beaucoup de travaux de recherche de par leurs fonctions et leurs symptômes dans l'organisme et la plante.

### I.5 Fonctions des amines biogènes et différents symptômes observés après consommation

#### I.5.1 Fonction dans l'organisme

Les amines biogènes sont des substances physiologiquement actives, exerçant des fonctions importantes dans l'organisme. Leurs rôles diffèrent selon le type.

Les **monoamines** (une seule amine primaire) comme la sérotonine, la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline jouent un rôle de neurotransmetteur [96]. Ces types d'amines sont également impliqués dans de nombreuses fonctions vitales comme la régulation de l'apport alimentaire [97, 98] et le stress [99-102]. En effet, leur libération en grande quantité entraîne une inhibition de l'ingestion alimentaire [103]; cette libération peut ainsi augmenter le rythme cardiaque, la tension artérielle et l'expansion rapide de réserves énergétiques lors d'une situation de stress. Parmi ces monoamines, l'histamine est la plus connue à nos jours. Elle a plusieurs fonctions dans l'organisme humain pouvant participer aux réactions de défense. En effet, l'absorption d'un produit altéré entraîne la dégradation des cellules. Chaque fois qu'une cellule est endommagée, il se produit un dégagement d'histamine aboutissant à des vomissements, à des maux de tête suivis d'une diarrhée aiguë. Ces vomissements et diarrhée permettent d'extirper le produit altéré. En plus, ce processus engendre une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins permettant aux cellules de défenses immunitaires de parvenir dans les tissus endommagés afin de pouvoir y combattre une possible infection [104].

Les **polyamines** telles que la putrescine, la spermine et la spermidine sont présentes dans toutes les cellules vivantes. Elles interviennent dans la croissance, le fonctionnement et la prolifération des cellules vivantes [36]. L'importance des polyamines dans la prolifération cellulaire est bien établie [105, 106]. A cause de leur implication dans ce processus, les enzymes impliquées à la biosynthèse des polyamines constituent des cibles potentielles en thérapie anticancéreuse [107-109]. Ces polyamines stimulent également la transcription et la traduction des gènes [110]. De même, grâce à leur caractère polycationique, elles peuvent interagir

fortement avec les phospholipides membranaires et jouer ainsi un rôle important dans la régulation des enzymes liées à la membrane [111]. En plus, ces polyamines sont impliquées dans la signalisation intracellulaire, dans le processus de cicatrisation [112] et le maintien de la fonction intestinale [113]. Les divers effets de ces amines biogènes sont regroupés dans le tableau I.6.

**Tableau I.6:** Effets de quelques amines biogènes sur l'organisme

Amines Biogènes	Effets Biologiques et Physiologiques
Histamine	<u>Neurotransmetteur</u> , <u>participe</u> à la sécrétion de l'acide gastrique, aux réactions allergiques, à la <u>régulation</u> du rythme cardiaque, de la température du corps, de l'appétit, de l'attention, de la mémoire et de la réponse immunitaire.
Tyramine	<u>Neurotransmetteur</u> , <u>participe</u> à l'accélération de la respiration et à l'augmentation du taux de glucose.
Polyamines (putrescine, spermine et spermidine)	<u>Intervient</u> dans la différenciation des cellules immunitaires, à l'effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose, <u>régulateurs</u> dans les processus immunologiques dans l'expression des gènes, dans la formation de l'intestin, dans la croissance et la différenciation des cellules.
Sérotonine	<u>Neurotransmetteur</u> , <u>messager chimique</u> , <u>participe</u> à la modulation de l'anxiété, de l'humeur, du sommeil, de l'appétit et de la sexualité
Dopamine	<u>Neurotransmetteur</u> , <u>influence</u> les mouvements du corps, la motivation et les comportements additifs.
Noradrénaline	<u>Influence</u> le sommeil, la vigilance et le stress.

### I.5.2 Fonction dans les végétaux

Chez les plantes, les polyamines sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires à savoir la division cellulaire, la différenciation, la stabilité de la membrane et le retard de la sénescence. Elles sont utilisées dans la conservation des fruits et légumes [33]. Law et al., dans son brevet, a développé une méthode de conservation des tomates en leurs injectant des volumes de polyamine variant de 50 microlitres à 2 mL. Leurs résultats ont montré que l'injection de polyamine dans les tomates permet de prolonger leur temps de conservation. Ceci indique que les polyamines peuvent être utilisées pour la conservation des tomates [114]. En plus, ces polyamines affectent positivement les processus de floraison. Elles ont été proposées également pour offrir une protection contre une grande variété de stress environnementaux, y compris la salinité et la carence en potassium [115].

En revanche, même si la tyramine et les autres amines aromatiques sont moins répandues dans les végétaux, elles peuvent néanmoins atteindre des concentrations particulièrement élevées dans certaines plantes comme l'acacia.

En effet, ces amines biogènes contenues dans les plantes semblent jouer un rôle défensif contre les insectes et les herbivores [33]. Cependant, ces amines biogènes sont responsables de plusieurs cas d'intoxication alimentaire.

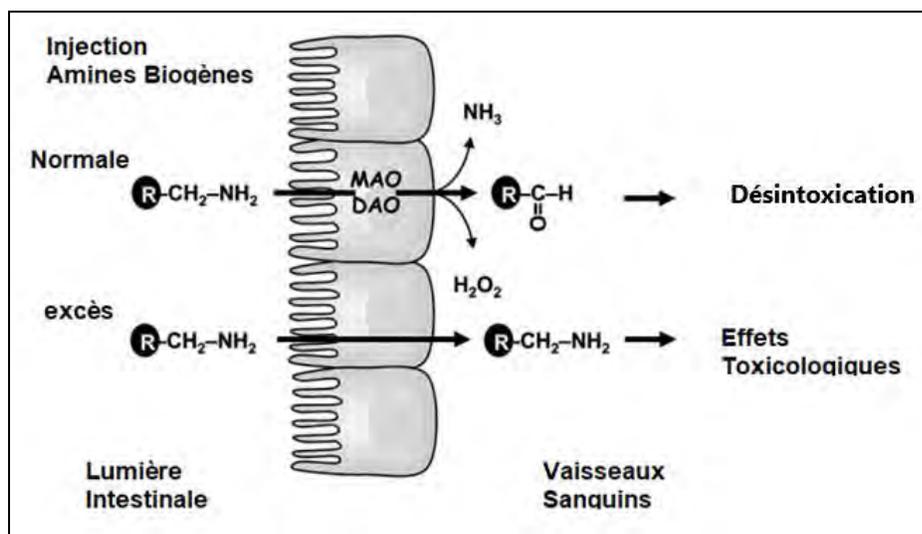
### I.5.3 Symptômes

Le système de désintoxication comprend des enzymes spécifiques telles que la monoamine oxydase (MAO) et la diamine oxydase (DAO) qui permettent de réguler le taux des amines biogènes dans l'organisme. Dans l'impossibilité de réaliser leur métabolisme, les amines s'accumulent avec certains effets négatifs. En effet, les amines biogènes générées continuellement au cours de la décomposition des aliments potentialisent des effets toxiques. Bien que les cas mortels ne soient pas fréquents, la gravité des symptômes peut varier selon l'amine biogène et la sensibilité du sujet [116, 117]. Par exemple, l'histamine peut causer des maux de tête, des rougeurs, de l'hypotension..., tandis que la tyramine induit une hémorragie

cérébrale, une insuffisance cardiaque [118]. De plus, la présence de cadavérine, de putrescine, de tyramine et de l'agmatine dans les aliments peut avoir un effet synergique significatif avec l'augmentation du taux d'histamine, entraînant ainsi une toxicité aiguë [119, 120]. De même, la spermidine et la spermine lorsqu'elles sont présentes en grande quantité dans les aliments, peuvent exercer leur toxicité en se liant simplement à l'information génomique chromatinique de condensation [121]. Elles empêchent ainsi le fonctionnement de la transcription et de la traduction [122], qui à son tour, peut également conduire à l'apoptose. En plus, si les amines biogènes telles que la putrescine, la spermine, la spermidine et la cadavérine n'ont pas un effet trop néfaste sur la santé, elles peuvent réagir avec des nitrites pour former les nitrosamines cancérigènes [123]. Dans ce cas, pour se rétablir, le patient peut toujours utiliser des médicaments. Cependant, la prise de certains médicaments tels que la moclobémide et la brofaromine (utilisée principalement lors du traitement de la dépression) peuvent inhiber l'effet de la monoamine oxydase, enzyme qui dégrade les amines biogènes et de ce fait rendre la toxicité plus aiguë [124]. En plus de ces médicaments antidépresseurs, l'alcool est connu parmi les inhibiteurs les plus actifs contre les effets d'enzymes oxydases. L'alcool augmente donc les risques venant de ces amines biogènes [125].

### I.6 Régulation et réglementation

Les mammifères possèdent un système de désintoxication notamment dans la paroi intestinale qui permet de réguler la quantité d'amines biogènes dans l'organisme. Par exemple, une teneur en amines biogènes trop élevée dans l'organisme peut être diminuée sous l'action de deux enzymes : la monoamine oxydase (MAO) et la diamine oxydase (DAO) [126]. L'action du système d'oxydation des amines biogènes en présence ou en absence d'agents interférents est représentée par la figure I.3. Ce schéma montre qu'en présence d'une quantité d'amines biogènes modérée, il ne peut y avoir un cas de toxicité. En effet dans ce cas, les amines oxydases sont en mesure de les dégrader complètement. En revanche, si le taux d'amines biogènes est trop élevé les MAO et les DAO ne seront plus à mesure de les éliminer totalement ; on aboutit alors à des cas de toxicité aiguë.



**Figure I. 3 :** Représentation schématique de l'action du système d'oxydation d'AB en présence ou en absence d'agents interférents [126]

Il est ainsi important pour la consommation de gérer les conditions de conservation et de traitement des aliments (Température faible et temps de conservation relativement court). Par exemple, le seul moyen efficace de prévention contre l'histamine durant la consommation des produits halieutiques consiste à limiter à la fois la contamination et la prolifération microbienne. Cet exercice nécessite une bonne mise en œuvre de pratiques d'hygiène : éviscération, réfrigération rapide ( $< 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) et respect de la chaîne de froid surtout pour les poissons pêchés dans les mers chaudes comme le thon par exemple [127]. Cette opération est indiquée pour limiter toute production d'amines biogènes dans les denrées alimentaires. Par exemple, pour la maîtrise de la fermentation malolactique, l'ensemencement de vin (Pinot Noir) avec une biomasse bactérienne sélectionnée, permet de limiter la production d'amines biogènes par rapport à la flore indigène [128]. Fort heureusement le taux de ces amines est souvent régulé par l'action de la céruloplasmine ayant une fonction oxydative [129].

A notre connaissance, dans la réglementation européenne, seul le seuil de l'histamine a été fixé [130]. Ainsi, la norme pour les poissons frais appartenant aux différentes familles (Engraulidés, Clupéidés, Scombridés, Coryphénidés, Xiphiidés, Istiophoridés et Pomatoïdés) [131], impose une teneur en histamine inférieure ou égale à  $100\text{ mg/kg}$  en moyenne sur 9 échantillons choisis au hasard selon une réglementation bien précise. Parmi ces échantillons aucune tolérance n'est acceptée pour un taux supérieur à  $200\text{ mg/Kg}$ . Deux échantillons seulement doivent avoir un taux

*compris entre 100 et 200 mg/kg.* Pour les produits de pêche ayant subi un traitement de maturation enzymatique dans la saumure il convient de multiplier les seuils ci-dessus par un facteur 2.

S'il existe des normes concernant certains types d'amines, à notre connaissance, aucune norme n'est connue pour le cas de l'agmatine. En effet la présence d'agmatine dans un échantillon indique en général la fraîcheur de l'aliment.

### CHAPITRE II : REVUE SUR L'AGMATINE

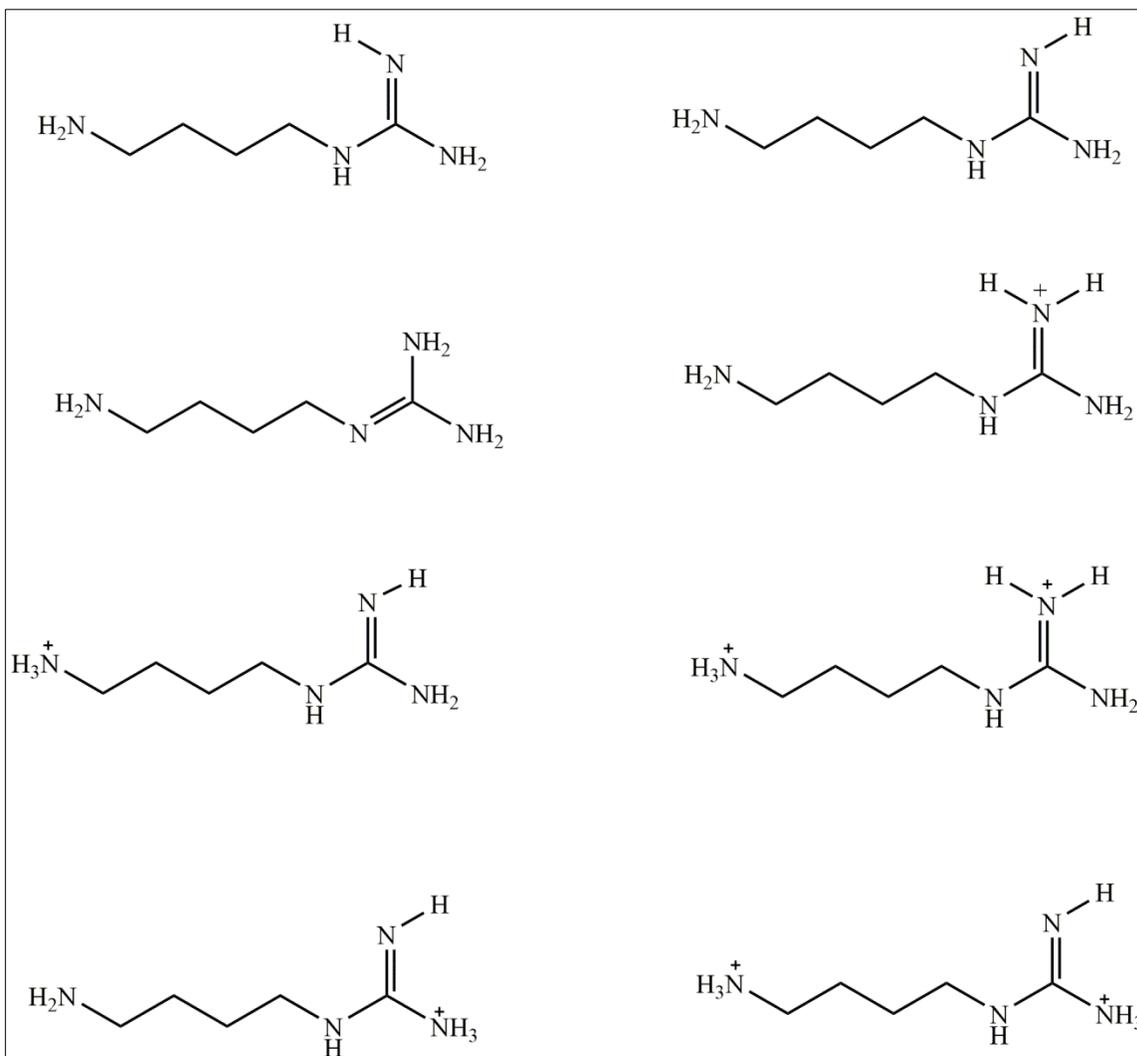
#### II.1 Historique

L'agmatine a été découverte en 1910 par Albrecht Kossel dans le sperme de hareng [132]. Elle est formée dans le cytoplasme des neurones, stockée dans des vésicules synaptiques et secrétée par exocytose dans la fente synaptique. De même, après excitation, elle peut être synthétisée et stockée au niveau des terminaisons nerveuses [133]. Cette amine biogène est un composé endogène, qui peut être produit à partir de la L-arginine sous l'action de l'enzyme arginine décarboxylase (ADC) [134]. C'est pourquoi elle est couramment appelée l'arginine décarboxylée.

Beaucoup d'études ont été faites sur sa distribution et ses fonctions dans l'organisme. Par exemple, Engeland et al. [135] ont rapporté que l'agmatine pouvait induire des contractions à l'utérus du chat. Egalement, elle pouvait augmenter la circulation sanguine chez les lapins. Un an plus tard, Dale et al. [136] ont confirmé ces résultats. Cependant, ils se sont interrogés sur leur pertinence physiologique compte tenu des concentrations élevées requises. Ce problème est résolu un siècle plus tard. Car durant toute la période du XX<sup>e</sup> siècle les chercheurs n'ont rien trouvé de nouveau sur l'agmatine. La raison la plus fréquemment citée par rapport à ce désintérêt était la difficulté de démontrer l'activité de l'ADC chez les mammifères. Ceci a conduit donc de supposer à tort que les mammifères ne synthétisaient pas de l'agmatine, en comparaison aux plantes et aux poissons [137]. Ce n'est que lors de la découverte hasardeuse de l'agmatine dans le cerveau de bovin en 1994 par Li et al., que ce faux dogme s'est érodé [138, 139]. Actuellement, il existe des preuves évidentes chez l'Homme que la biosynthèse de l'agmatine se produit bel et bien via l'enzyme ADC et son gène codant [140]. De nouvelles recherches ont montré que l'agmatine agit comme un neurotransmetteur (neuromodulateur, coéméteur et neuroprotecteur) [141-143]. Cette amine biogène a des effets considérables dans les tissus des mammifères via les sites de reconnaissance de l'imidazoline (ou récepteurs) ou via les récepteurs  $\alpha_2$  -adrénaline [144]. Son implication dans le traitement en médecine a été largement développée [145]. Ces effets sont probablement liés à sa structure qui est polycationique en milieu acide.

### II.2 Propriétés de l'agmatine

L'agmatine est une polyamine de structure aliphatique. C'est une base forte, sa basicité dérive de la présence des fonctions amines et guanidine aux deux extrémités sur sa structure [146]. Ainsi, elle est protonée en milieu aqueux ou gazeux sous formes monoprotinée, et diprotinée (Figure II.1) [147, 148]. Cependant, la forme diprotinée de l'agmatine est la plus acide et la plus stable. Ces caractéristiques lui donnent une propriété d'être très soluble dans l'eau avec une solubilité de 50g/L, bien que celle-ci soit faible dans les solvants organiques.



**Figure II.1:** Différentes structures possibles de l'agmatine [148]

### II.3 Synthèse et dégradation de l'agmatine

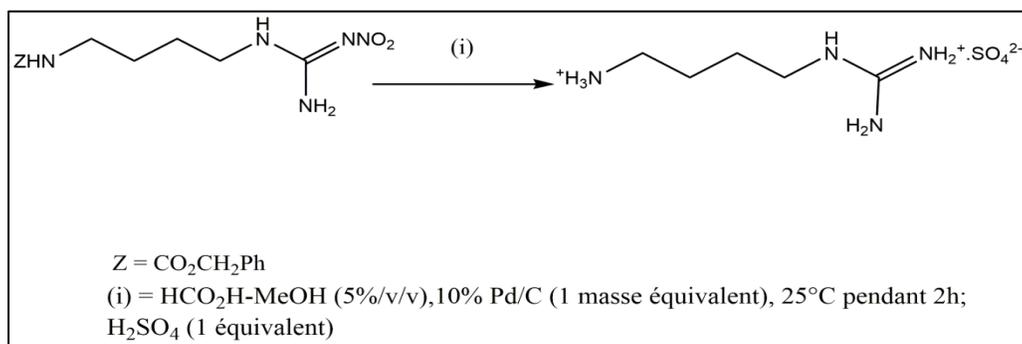
#### II.3.1 Synthèse par voie enzymatique

On rappelle que chez les animaux, les plantes et les bactéries, l'agmatine est produite par la décarboxylation de l'arginine sous l'action de l'enzyme arginine décarboxylase (ADC). Parmi les bactéries pouvant engendrer de l'ADC on peut citer *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Solfataricus* et *Sulfolobus*. Cependant, la capacité de produire de l'ADC dépend du

pH (entre 6,5 et 7,5) et de la température du milieu (entre 37 et 70°C) [149-151]. Cependant, la culture de *Escherichia coli* est la plus utilisée pour la synthèse de l'agmatine. En effet, son utilisation pour la conversion de l'arginine en agmatine donne un rendement de 92,6% [152]. Ceci est confirmé par les travaux de Sun et al. [134] en utilisant la même bactérie *Escherichia Coli*. Leurs résultats expérimentaux ont donné un taux de conversion de 95,6% en allant de l'arginine à l'agmatine. Ce rendement impressionnant indique que leur méthode pourrait être adaptée à la production de l'agmatine par voie enzymatique à grande échelle. En effet, d'autres chercheurs ont utilisé les *Lactobacillus hilgardii X1B* pour la production de l'agmatine à partir de l'arginine. Après 10 jours d'incubation à 30°C, ils n'ont pu obtenir que 0,16 mM d'agmatine [153]. C'est pourquoi on utilise rarement cette dernière voie de synthèse pour l'obtention de l'agmatine car le temps d'incubation est assez long.

### II.3.2 Synthèse de l'agmatine par voie chimique

La production industrielle de l'agmatine augmente d'année en année à cause de son utilisation dans le sport. En médecine, l'agmatine est aussi utilisée dans le traitement de quelques maladies cancérogènes et diabétiques. C'est pourquoi à l'heure actuelle, la voie chimique est mieux favorisée dans la production industrielle de l'agmatine. Par exemple, Golding et al. [154] ont synthétisé l'agmatine à partir de 0,25 g de 1-[4- (benzyloxycarbonylamino) butyl]-2-nitroguanidine mélangé avec de l'acide formique et du méthanol après ajout du palladium. A la fin de la réaction, ils ont abouti à la formation importante de sulfate d'agmatine selon la figure II.2 ci-dessous.



**Figure II.2:** Synthèse de l'agmatine à partir de 1-[4- (benzyloxycarbonylamino) butyl]-2-nitroguanidine

Cependant, cette production industrielle à grande échelle de l'agmatine n'est pas sans difficulté. En effet, cette méthode génère beaucoup d'intermédiaires toxiques pouvant présenter un danger environnemental fatal.

### II.3.3 Dégradation de l'agmatine

La L-arginine en présence de l'arginine décarboxylase peut conduire à la formation de l'agmatine. De même, en présence des enzymes telles que l'agmatinase ou la diamine oxydase, l'agmatine peut se transformer respectivement en putrescine ou en une autre polyamine, le 4-guanidinobutanol [155]. Le processus de transformation de l'agmatine en polyamines comprend trois voies (Figure II.3) :

- première voie : l'agmatine subit une hydrolyse catalysée par l'enzyme agmatinase en donnant de l'urée et de la putrescine [156, 157] ;

- deuxième voie : l'agmatine réagit avec l'agmatine décarboxylase pour donner le N-carbamoylputrescine qui à son tour donne de la putrescine en présence de catalyseurs appropriés [158] ;

- troisième voie : dans l'eau, l'agmatine peut se transformer en 4-guanidinobutanol sous l'action de la diamine oxydase. On peut noter que cette voie peut représenter jusqu'à 50% du métabolisme de l'agmatine dans les hépatocytes de rats [155].

Les réactions d'hydrolyses enzymatiques représentent la plus grande partie des voies de métabolisme de l'agmatine [159]. Cependant, quel que soit le processus de conversion de l'agmatine en putrescine, environ 10% d'agmatine semblent être métabolisés en polyamines [155].

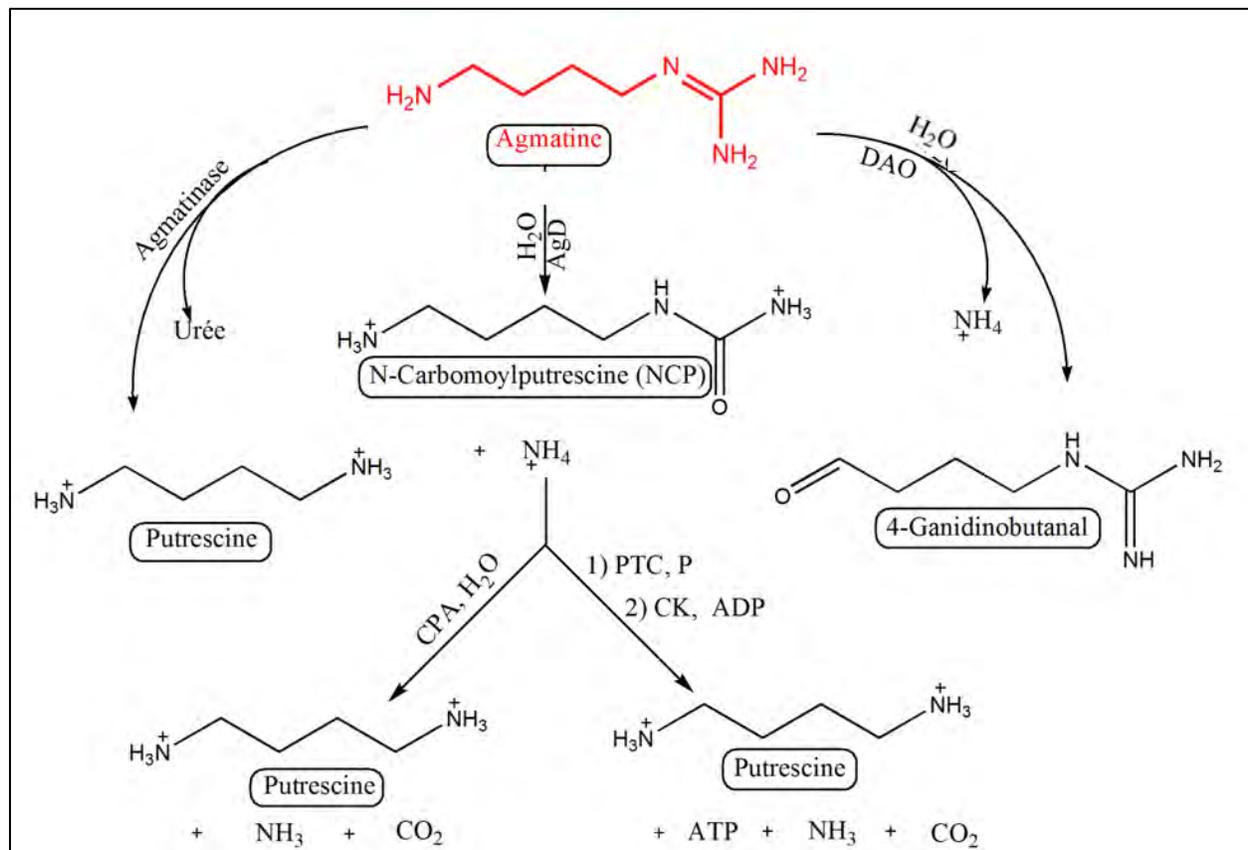


Figure II.3: Schéma de dégradations de l'agmatine

## II.4 Répartition et transport de l'agmatine dans l'organisme

### II.4.1 Répartition

L'agmatine est un composé endogène, omniprésent dans presque tous les tissus de mammifères, le plasma humain, les bactéries et les insectes. Après sa découverte dans le cerveau de rat, d'autres recherches ont montré sa présence dans presque tous ses tissus cellulaires. Elle est également sécrétée et distribuée de manière spécifique d'un organe à l'autre. Cette répartition sera illustrée pour deux cas : l'homme et le rat.

- Chez des volontaires humains normaux, les travaux de Regunathan et al. [160] ont montré que la concentration d'agmatine dans le liquide céphalo-rachidien n'est pas uniforme, elle varie entre 24,3 et 54,0 ng / mL selon le sujet. Cependant, celle d'agmatine plasmatique s'échelonne

entre 8,4 et 65,1 ng / mL. De même, Zhao et al. [161] ont trouvé un taux de recouvrement d'agmatine compris entre 98, 2% et 104,8% dans le sérum humain. Egalement, Raasch et al. [162] ont trouvé un taux de recouvrement variable dans l'urine humaine compris entre 103,6 % et 100,6%.

- Chez le rat, la teneur en agmatine est plus importante dans l'estomac (71ng/g), suivi de l'aorte (55,35ng/g) et le petit intestin (57,41ng/g). Au niveau du cœur, du foie, et des muscles squelettiques elle est seulement présente en petite quantité. Par exemple au niveau du cerveau, on trouve une valeur de 2,40 ng/g, dans les testicules 2,04 ng/g et dans le plasma 0,45 ng/mL (Tableau II.1) [163]. Ainsi, la répartition de l'agmatine chez le rat n'est pas uniforme. En effet, le taux d'agmatine varie en fonction de l'organe ou de la partie considérée.

D'autres études comparatives sur la détermination de l'agmatine ont été faites sur deux rats différents. Les résultats ont montré une différence de taux de recouvrement de l'agmatine dans le cerveau de 4%. En revanche, aucune variation n'a été notée dans l'estomac [162]. Cependant, d'autres auteurs ont noté une réduction progressive du taux d'agmatine durant le vieillissement, dans les organes du rat [164]. En revanche, ils ont noté une augmentation d'agmatine dans l'hippocampe et dans le cortex cérébral lorsque les rats ont été soumis à des conditions de stress [165-167].

**Tableau II.1:** Distribution de l'agmatine dans les différents organes de rat [163]

Tissus	Agmatine (ng/g)	N (nombres d'échantillon)
Estomac	71,00 ± 10,33	5
Aorte	55,35 ± 9,39	5
Petit intestin	57,41 ± 12,74	5
Grand intestine	27,86 ± 6,73	4
Rate	17,38 ± 3,17	4
Poumon	10,23 ± 2,82	5
Deferens de vas	9,45 ± 2,08	4
Glande adrénaie	6,97 ± 3,29	5
Rein	6,45 ± 1,40	5
Cœur	6,03 ± 0,79	5
Foie	5,63 ± 0,87	5
Muscle squelettique	5,30 ± 0,72	5
Cerveau	2,40 ± 0,60	5
Testicules	2,04 ± 0,22	4
Plasma (ng/ml)	0,45 ± 0,05	5

#### II.4.2 Transport

Le mécanisme de diffusion de l'agmatine dans les cellules animales n'est pas simple. Par exemple au pH physiologique (5,6), l'agmatine subit une diprotonation. Elle peut être transportée que par voie cationique [156]. De même, libérée dans la fente synaptique, l'agmatine va agir par l'intermédiaire de cibles post-synaptiques d'où elle subit une attraction électrostatique par un transporteur actif consommateur d'énergie (ATP-dépendant) des cellules neuronales ou de la névroglie [168]. C'est pourquoi, l'absorption de l'agmatine est diminuée par la présence des inhibiteurs sélectifs tels que les canaux  $Ca^{2+}$ ,  $CoCl_2$ ,  $CdCl_2$  et la vérapanil. En revanche, dans une solution tampon en l'absence d'ions  $Ca^{2+}$  l'agmatine est facilement transportable [169]. Ainsi, il est concevable que l'entrée puisse se faire via d'autres canaux  $Ca^{2+}$  à tension ou à ligands tels que les récepteurs NMDA [170]. Il est important de noter que certains médicaments tels que

l'idazone et la phentolamine qui agissent sur le site de la liaison de l'imidazoline sont des inhibiteurs non compétitifs de l'absorption de l'agmatine. Egalement, certains chercheurs ont montré que les ions  $\text{Na}^+$  minimisent le transport de l'agmatine dans le cerveau de rat. En revanche, son transport augmente si les cellules sont cultivées en présence du difluométhylornithine (DFMO) [155].

### II.5 Diverses fonctions de l'agmatine

#### II.5.1 Fonctions biologiques et physiologiques

Il a été signalé que l'agmatine possède un large éventail d'activités liées au système nerveux. Elle intervient dans la modulation des récepteurs post-synaptiques comme la N-méthyl-D-aspartate (NMDA), la nicotine et les récepteurs benzodiazépines antiplaquettaires [171]. En effet, ces activités comprennent des interactions avec des récepteurs membranaires [172]. Plusieurs effets biologiques de l'agmatine ont été découverts. On peut en citer ses rôles de neuroprotecteur, cognitif, anticonvulsivant et antidépresseur [173-179].

Chez les mammifères, l'agmatine joue un rôle de neurotransmetteur et de neuromodulateur [180]. Elle peut également empêcher la réticulation du collagène chez le diabétique [181]. Cependant, elle bloque la prolifération stimulée des cellules musculaires lisses vasculaires [182]. Egalement, elle est capable de réduire la prolifération des lignées cellulaires en appauvrissant les niveaux de polyamines intracellulaires [183]. En effet, l'administration d'agmatine supprime l'activité de l'ornithine décarboxylase dans de nombreuses lignées cellulaires. De tels effets pourraient être critiqués de façon empirique par une réduction massive de la biosynthèse endogène des polyamines et du transport de putrescine à travers la membrane plasmique [184]. Elle réduit la croissance des cellules cancéreuses humaines [185]. En fin, elle stimule la libération de catécholamine dans les cellules chromafines surrénales [139] et de l'insuline dans les cellules d'îlots pancréatiques [186].

## CHAPITRE II : REVUE SUR L'AGMATINE

---

L'expérience faite sur le rat montre que l'agmatine améliore l'analgésie morphine et augmente la pression artérielle lorsqu'elle est injectée intracisternellement [187, 188]. Elle régule également la croissance des cellules épithéliales dans la cicatrisation des plaies [189]. Les études faites pour montrer son rôle antidépresseur chez les animaux sont résumées dans le tableau II.2.

## CHAPITRE II : REVUE SUR L'AGMATINE

**Tableau II.2:** Résumé des études montrant les effets antidépresseurs de l'agmatine sur les animaux [190]

Model expérimental	Sujet	Dose d'agmatine administrée	Effets observés	Référence
Ischémie de la moelle épinière	Rat	100 mg/kg (i.p.)	Rétablissement plus rapide de la fonction motrice. Prévention de la perte de motoneurons dans la moelle épinière.	79
Ischémie/blessure de perfusion	Chat	100 mg/kg (i.v.)	Réduction des cellules tunnel-positives. Diminution des dommages neuronaux	80
Occlusion de l'artère cérébrale moyenne	Rat	100 mg/kg (i.p.)	récupération des déficits moteurs et proprioceptifs accélérée. Prévention de l'infarctus du myocarde, de la gliose, de l'œdème, de l'apoptose et de la neurotoxicité	81
Occlusion de l'artère cérébrale moyenne	Souris	100 mg/kg (i.p.)	Réduction de l'œdème cérébral, du volume de l'infarctus, de la teneur en eau et de la diminution des niveaux d'aquaporine	85
Lésion de la moelle épinière	Souris	100 mg/kg (i.p.)	Amélioration du réflexe de redressement de surface. Réduction de la cicatrisation et du collagène	86
Blessure à la moelle épinière	Souris	100 mg/kg (i.p.)	Inhibition des événements de démyélinisation. Diminution de la perte neuronale et de la cicatrisation gliale autour du site de la lésion.	87
Privation d'oxygène-glucose	Rat (hippocampe)	100 mg/kg (i.p.)	Diminution de la dégénérescence des neurones	82
Culture hypoxique	Rat (rétine)	100 $\mu$ M et 500 $\mu$ M	Diminution des quantités de LDH, JNK phosphorylée et NF-KB.	83
Privation d'oxygène-glucose	Culture primaire des Astrocytes	100 $\mu$ M	Augmentation de la viabilité cellulaire	84
Neurotoxicité induite par le glutamate	Culture des neurones de l'hippocampe	100 $\mu$ M	Prévention de la neurotoxicité glutamatergique. Diminution de la mort neuronale induite par le glutamate	88

**i.p.** : intrapéritonéal; **i.v.** :intraveineux ; **LDH** : lactate déshydrogénase ; **JNK** : kinases N-terminales de c-Jun ; **NF-KB** : facteurs nucléaire KappaB ; **ADC** : arginine décarboxylase.

### II.5.2 Fonctions pharmacologiques

#### II.5.2.1 Effet de l'agmatine dans le traitement de l'information douloureuse

D'après l'AMPC (Amicale Médecine de Paris Cordeliers), la fonction de neurotransmetteur de l'agmatine fait qu'elle est à part entière impliquée dans la modulation et le traitement de l'information douloureuse. Son activité antihyperalgique, qui semble s'exercer dans des conditions de douleur soutenue et non aiguë, est impliquée dans plusieurs mécanismes. Les mêmes études affirment que l'agmatine peut potentialiser un effet analgésique de la morphine sans interagir directement avec les récepteurs neurotransmetteurs. Elle peut également s'opposer au développement de la dépendance et à l'apparition du syndrome de sevrage aux opiacés en modulant la signalisation intracellulaire. De même, d'autres chercheurs ont montré que l'agmatine diminue la douleur induite au cours de l'inflammation, de la neuropathie et des dommages de cordon médullaire [191]. Ceci rejoint les travaux de Paszcuk et al. [192] montrant que l'agmatine inhibe la douleur neuropathique chez les souris. De même, de nombreuses études faites sur les animaux qui avaient des douleurs subaiguës et chroniques convergent vers la démonstration d'une activité antihyperalgique et antiallodymique de l'agmatine [193-201]. Ainsi, la découverte de nouvelles cibles devrait permettre une meilleure compréhension des rôles de l'agmatine avant que ces données expérimentales soient validées chez l'Homme. Ces travaux pourraient donc ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement de la douleur chronique en administrant de l'agmatine seule ou en association avec de faibles doses d'analgésiques opiacés [202].

#### II.5.2.2 Effet de l'agmatine sur le stress

Le stress est un ensemble de réactions physiques et physiologiques de l'organisme, face à une situation particulière, que l'on dit stressante. Très souvent, en situation de stress, on fait face à certains effets pathologiques comme des désordres digestifs, des céphalées, des troubles de sommeil et une élévation de la température corporelle. C'est pourquoi, l'agmatine est libérée en réponse à divers stimuli de stress afin de maintenir l'homéostasie. Ainsi, une étude a été faite

pour évaluer le rôle d'un supplément d'agmatine sur les méfaits de stress chronique. Il s'est avéré que la prise d'agmatine permet d'améliorer la motivation de stress. En effet, sa présence dans l'organisme normalise les niveaux de corticostérone tout en empêchant les modifications de poids de façon comparable à la fluoxétine (inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine : ISRS). Ainsi, les résultats de cette étude ont donc clairement démontré l'effet positif d'un supplément d'agmatine sur la gestion du stress [203]. Par exemple, le traitement avec l'agmatine (20, 40, 80 mg/kg par voie intrapéritonéale) chez les rats affectés de stress courant a inhibé l'hyperthermie induite [204].

Néanmoins, le stress oxydant ou oxydatif est accusé d'être à la base de nombreuses maladies chroniques ; pourtant, il est montré dans ce cas que l'agmatine, même à de faibles concentrations (10 ou 100  $\mu M$ ) peut induire un stress oxydant dans les mitochondries de foie de rat [205].

### II.5.2.3 Agmatine et sport

L'agmatine est un additif capable de fournir d'énormes avantages à tous ceux qui cherchent à améliorer leur performance mentale ou physique. En effet, les utilisateurs d'agmatine pratiquant le sport ont signalé une augmentation significative de leur performance physique. En fait, l'agmatine améliore la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose. Elle agit également comme un anti-inflammatoire et augmente la sécrétion de bêta-endorphine qui est essentiellement un neurotransmetteur [206]. Elle augmente aussi le flux sanguin dans les muscles avec dégagement du monoxyde d'azote. En plus, elle stimule la libération des hormones LH et GH (hormone de croissance) ; ce qui la rend utile avant tout entraînement physique. En fin, elle augmente donc l'endurance des athlètes et améliore leurs performances, tout en diminuant la masse de graisse corporelle [203]. En effet, l'agmatine a la possibilité de convertir la graisse en énergie [207].

### II.5.3 Utilisation de l'agmatine dans le traitement de certaines maladies

Compte-tenu de ses importants effets pharmacologiques, l'agmatine est utilisée comme un alternatif possible dans le traitement du cancer et du diabète, particulièrement chez les animaux [208]. En effet, elle agit directement sur le cycle cellulaire en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses [209, 210]. En fait, le traitement in vitro de lignées cellulaires d'hépatocarcinomes par des doses variables d'agmatine comprises entre 10  $\mu\text{M}$  et à 1mM a conduit à l'arrêt de formation des cellules cancéreuses en phase G2/M du cycle cellulaire, sans toutefois entraîner leur apoptose [211]. Ainsi, cet effet cytoprotecteur de l'agmatine a été confirmé à partir des modèles cellulaires de cancer du côlon [212]. C'est pourquoi, l'agmatine pourrait être utilisée dans le traitement de pathologies liées à l'hyperprolifération cellulaire ou dans le traitement du cancer. Ce traitement s'effectue en administrant par voie orale une dose unitaire variant de 3,7 mg à 370 mg d'agmatine [201]. De même, l'utilisation de l'agmatine pour le cas du diabète pourrait être intéressante pour inhiber la formation avancée de glycation. Cette inhibition atténuerait ainsi les dysfonctionnements systémiques associés au diabète [181]. Cette action de l'agmatine pourrait donc améliorer la régénération des nerfs et réduire la douleur neuropathique du diabétique [199]. En améliorant l'action de la metformine (utilisée lors du traitement du diabète de type 2) [213, 214], l'agmatine augmenterait ainsi le taux de filtration glomérulaire rénale [215]. Aussi, des preuves substantielles soutiennent-elles l'utilisation de l'agmatine dans le traitement adjuvant du diabète [216-219].

### II.6 Pathologies liées à l'agmatine

Malgré ses effets bénéfiques à l'organisme, l'utilisation de l'agmatine est limitée à cause des effets secondaires qu'elle peut engendrer. En effet, au début du traitement par l'agmatine, les patients ne notent aucun effet indésirable. Cependant, après une longue période d'utilisation, le taux d'agmatine s'accumule dans l'organisme en créant ainsi des effets secondaires. Parmi ses effets, on peut citer :

- une détresse gastro-intestinale qui ne s'arrête pas immédiatement, même après la fin du traitement ;

- une légère diarrhée accompagnée de vomissements et des nausées.

Ces effets indésirables sont les plus couramment rencontrés lors de l'administration de l'agmatine [220].

En revanche, certains auteurs comme Gilad et al. [221] sont sceptiques quant à la dangérosité de l'utilisation de l'agmatine. En effet après cinq ans d'expérimentation sur 30 cobayes, ils n'ont noté aucun effet secondaire significatif. C'est pourquoi, de l'avis de ces chercheurs, la quantité indésirable de l'agmatine reste à discuter. Malgré tout, depuis 2016 la vente de l'agmatine comme médicament est interdite au sein de l'union européenne à cause de son innocuité qui reste à démontrer [222].

### II.7 Méthodes d'extraction de l'agmatine

#### II. 7.1 Efficacité des solvants d'extraction pour l'agmatine

L'extraction de l'agmatine dans les matrices nécessite en partie l'optimisation du solvant. Pour le choix du solvant on doit tenir compte des caractéristiques de la matrice à analyser. Les résultats obtenus pour la même matrice peuvent différer d'un solvant à l'autre. Selon le solvant et la méthode d'extraction on n'obtient pas le même pourcentage de recouvrement. La différence de taux de recouvrement peut s'expliquer par la différence des coefficients de partage et de la solubilité de l'agmatine dans ces solvants [223]. Par exemple, les études comparatives de Custódio [223] sur l'extraction de l'agmatine dans le fromage râpé montrent que le solvant tampon borate est le plus efficace avec un taux de recouvrement variant de 105,4% à 106,4% suivi des solutions d'acides HCl et HClO<sub>4</sub>. En revanche, dans les alcools (méthanol et éthanol) les taux de recouvrement obtenus étaient très faibles. De même d'autres chercheurs ont obtenu de bons résultats pour la détermination de l'agmatine dans la viande en utilisant les acides HCl et HClO<sub>4</sub> [224, 225].

Cependant, beaucoup de chercheurs utilisent l'acide trichloroacétique (TCA) comme solvant dans l'extraction des amines biogènes. En effet, le TCA avec sa capacité à précipiter les protéines, représente aussi un bon solvant d'extraction des amines biogènes particulièrement l'agmatine dans la viande, les poissons et les crevettes [226].

Dans la littérature, beaucoup de techniques d'extraction de l'agmatine sont proposées. Ainsi, nous pouvons en citer quelques-unes avec quelques résultats.

### II.7.2 Extraction de l'agmatine dans les liquides physiologiques

#### II.7.2.1 Extraction dans l'urine

Pour extraire l'agmatine de l'urine humaine, on prend un échantillon d'urine que l'on conserve à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse. Puis,  $400\ \mu\text{L}$  de cet échantillon sont prélevés et mis dans un flacon de  $1,5\ \text{mL}$ . Après ajout de  $800\ \mu\text{L}$  d'acétonitrile, le mélange est agité vigoureusement pendant 5 minutes afin de précipiter toutes les protéines. Après centrifugation à  $16\ 000\ \text{g}$  pendant 10 minutes, le liquide surnageant est transféré dans un autre flacon pour le sécher avec un courant d'azote. Le résidu est ensuite dissous dans  $20\ \mu\text{L}$  de solution tampon borate à pH 9,0. Cette dernière solution est agitée par tourbillonnement à la température de  $4^{\circ}\text{C}$ . L'analyse donne un pourcentage de recouvrement compris entre 99% et 103,1% [162]. En revanche, Huisman et al. [227] ont extrait l'agmatine toujours dans la matrice urine en utilisant comme solvant l'acide chlorhydrique et en procédant à une centrifugation de  $8000\text{g}$  pendant 6 minutes à la température de  $-20^{\circ}\text{C}$ . De cette expérience, ils ont obtenu des taux de recouvrements compris entre 80% et 125%.

#### II.7.2.2 Extraction dans le sang

Pour extraire l'agmatine dans le sang,  $700\ \text{mL}$  de plasma ont été déprotonés avec de l'acide hydrochlorique ( $0,1\ \text{M}$ ), puis, le mélange est maintenu dans de la glace pendant 1 heure avant d'être centrifugé à la vitesse de  $1000\ \text{g}$  pendant 15 minutes. Cette solution est passée dans une cartouche C18 lavée au préalable avec un mélange d'eau, de méthanol et d'acétonitrile ( $1\text{v}/1\text{v}/1\text{v}$ ). L'élution est faite ensuite avec un autre mélange de mêmes solvants ( $1\text{v}/3\text{v}/5\text{v}$ ) précieusement ajusté avec l'acide acétique jusqu'à pH 3,5 [55]. Cependant, Esnafoglu et al. [228] ont procédé de la même façon pour l'analyse de l'agmatine dans le plasma sans passer l'extrait dans une cartouche, l'analyse étant faite directement. De même, Zhao et al. [229] ont extrait l'agmatine à partir du sang venant des sujets sains. Avant tout procédé, le sang a été refroidi avec

de la glace pendant 10 minutes puis centrifugés à 5000 g pendant 10 minutes à la température de 4°C. Pour passer à la déprotonation, 0,05 mL d'acide trichloroacétique a été ajouté à 1 mL de ce plasma. Ensuite, le mélange a été placé dans de la glace pendant 1 heure avant d'être centrifugé encore à 6000g pendant 15 minutes à la température de -4°C. Le surnageant a été récupéré et stocké à la température de -80°C jusqu'à l'analyse.

### II.7.3 Extraction dans les aliments et boissons

La procédure d'extraction de l'agmatine est presque la même pour tous les aliments. Dans tous les cas, les échantillons d'aliments sont homogénéisés dans un solvant (aqueux ou organique), centrifugés à 4 °C et filtrés avant de passer à l'analyse. Dans certain cas, le filtrat pourrait passer à une autre extraction liquide-liquide pour éliminer les autres composés susceptibles d'interférer.

#### II.7.3.1 Extraction dans les poissons

Yen et al. [230] ont extrait de l'agmatine dans les poissons conservés dans l'huile tels que le thon, la bonite, les anchois puis dans la saumure et le maquereau. Après avoir retiré l'huile, la chair a été broyée puis 20 g de broyat ont été transférés dans un tube de 250 mL en présence de 50 mL d'acide trihydrochlorhydrique (HCl, 3H<sub>2</sub>O) 6 %. Ce mélange a été ensuite homogénéisé pendant 3 minutes puis centrifugé à la vitesse de 12000 rpm pendant 10 minutes à la température de 4 °C. Ensuite, le surnageant a été filtré par un papier Wattman. Après, ce filtrat a été versé dans une fiole de 100 mL et complété jusqu'au trait de jauge avec de l'acide trihydrochlorhydrique. L'analyse a été faite immédiatement à partir de 2 mL du filtrat après l'avoir dérivé avec du chlorure de benzoyl préparé selon la méthode de Redmond et Tseng.

Beaucoup de chercheurs ont utilisé cette méthode de Yen et al. pour déterminer le taux d'agmatine dans les produits de pêche :

- Chatchawan et al. [231] ont trouvé un taux d'agmatine de 4,2 mg/100g dans les anchois ;
- dans le rouget, Ozyurt et al. [232] ont trouvé un taux d'agmatine de 0,5 mg/100g;

- dans les filets de truites, Paleologos et al. [233] ont trouvé un taux de recouvrement supérieur à 85%;

- de même, Chen et al. [234] ont obtenu un pourcentage de récupération moyen de 66,5% dans les poissons angustirostris.

La méthode Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995) a été aussi utilisée pour la détermination de l'agmatine dans les poissons et dans les produits à base de poisson (sauces). Par cette méthode, les chercheurs ont obtenu des limites de détection inférieures à 1 mg/Kg [235].

### II.7.3.2 Extraction dans le fromage

Plusieurs méthodes ont été développées pour quantifier l'agmatine dans les fromages. Parmi celles-ci on peut citer la méthode de Custódio et al. [223]:

Cette méthode consiste à prendre 1 g de fromage que l'on homogénéise dans 20 mL de solvant organiques (méthanol ou éthanol) puis le tout est centrifugé à 250 rpm pendant 10 minutes. L'homogénat est maintenu à 60°C pendant 15 minutes ou dans un bain d'eau bouillante pendant le même temps (éthanol). Ensuite, l'homogénat est à nouveau centrifugé et le surnageant filtré. Avant l'analyse, l'extrait est dérivé avec de l'orthophtaldéhyde (OPA) en présence de mercaptoéthanol. En effet, les mesures se font par HPLC avec détecteur de fluorescence.

Egalement, la même équipe a réussi à extraire de l'agmatine en utilisant les mêmes procédés avec les solvants aqueux tels que l'acide chlorhydrique (0,1 M), l'acide trichloroacétique (5%), l'acide perchlorique (0,4 M), l'acide acétique (15%), de l'acide sulfosalicylique (12%) et le tampon borate. Cependant, les résultats obtenus séparément dans les solutions acides (tampon borate, acide perchlorique, acide chlorhydrique et acide trichloroacétique) sont de loin meilleurs que ceux dans les solvants organiques (méthanol et éthanol). Toutefois, dans l'acide acétique et l'acide sulfosalicylique les résultats sont peu satisfaisants.

### II.7.3.3 Extraction dans le vin

Pour déterminer l'agmatine dans le vin, Fernanda et al. ont procédé par une extraction liquide-liquide. Dans ce procédé, 100 mL de vin ont été mélangés avec 5 mL de 1,7-diaminoheptane, 200 mL d'une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) saturée et 400 mL d'une solution de chlorure de dansyle (7,5 mg/mL) préparée dans de l'acétone. Le mélange est ensuite agité pendant 2 minutes puis transféré dans un bécher où il a subi une agitation à l'aide d'un agitateur magnétique (195 tours / min) pendant 5 minutes à la température de 60 °C. Le résiduel du chlorure de dansyle est éliminé en y ajoutant 100 mL d'une solution de proline (100 mg/mL). Après avoir protégé ce mélange contre la lumière, il est stocké à 20 °C durant 15 minutes avant d'y ajouter ensuite 500 mL de diéthyl éther. Après agitation, la phase organique est récupérée puis évaporée sous un courant d'azote. Enfin, ce résiduel est solubilisé dans 300 mL d'acétonitrile puis filtré et stocké à -20 °C jusqu'à l'analyse [13].

De même, Galgano et al. [14] ont extrait l'agmatine dans le vin en mélangeant 5 mL de vin avec 3 mL d'acétate d'éthyle. Puis, ce mélange a été centrifugé à 12000 g pendant 15 minutes à 4 °C. La phase organique a été récupérée et la phase aqueuse a ensuite été extraite deux fois avec 2 mL d'acétate d'éthyle. Du sulfate de sodium anhydre y a été ajouté pour éliminer toute trace d'eau. La phase organique a été amenée à la siccité sous pression réduite à 40 °C en utilisant un rotavapeur et l'extrait a été récupéré avec deux aliquotes de 1 mL de méthanol. L'extrait méthanolique a ensuite été filtré à travers un papier filtre puis analysé directement par HPLC.

### II.8 Méthodes d'analyse de l'agmatine

Plusieurs méthodes d'analyses ont été développées pour la détermination qualitative et quantitative de l'agmatine dans les liquides physiologiques, les aliments, et les cellules. Parmi ces méthodes, nous pouvons citer les méthodes chromatographiques, les méthodes électrochimiques et les méthodes enzymatiques. Ainsi, pour le traitement des échantillons à analyser, des procédés par centrifugation, par extraction liquide-liquide (ELL) ou par extraction en phase solide (EPS) sont souvent appliqués.

Dans tous les cas, un procédé est d'autant plus efficace et efficient qu'il arrive à minimiser les effets d'interférences possibles avec les autres espèces susceptibles d'être présents dans la matrice.

### II.8.1 Méthodes chromatographiques

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile. Selon la technique de détection utilisée, on distingue plusieurs méthodes chromatographiques pour la détermination de l'agmatine dans les matrices.

#### II.8.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Le principe de la CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire qui est un adsorbant (gel de silice souvent) fixé sur une plaque en verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Dans le cas de l'analyse des amines biogènes dans un échantillon quelconque, après l'étape d'extraction, les différents composants du fluide vont migrer plus ou moins vite en fonction de leur solubilité dans le solvant et de leur affinité avec le gel de silice. Les tâches de migration apparaissent grâce à des marqueurs adéquats. La lecture des résultats se fait soit à l'aide d'un densitomètre, soit en comparant les fronts de migration des échantillons ( $R_f$ ) par rapport au standard. Par cette méthode, beaucoup de travaux ont signalé la présence de l'agmatine après la culture cellulaire. Parmi ces recherches on peut citer les travaux de Burnat et al. [236] sur les filaments de type sauvage *Anabaena* cultivés dans un milieu BG110  $\text{NH}_4^+$  puis, incubés dans un milieu nitraté pendant 24 heures.

Cette méthode sur le gel de silice peut s'appliquer aussi en remplaçant le gel par un papier (papier Whatman par exemple). Cette méthode consiste à établir des chromatogrammes sur du papier, imprégné ou non au préalable dans une solution de soude 0,2 N. La révélation des taches est opérée par la réaction dite de Sakaguchi, caractéristique des guanidines monosubstituées. Ce

procédé s'est révélé plus efficace que la chromatographie bidimensionnelle. En effet, il a permis de repérer avec précision des produits non encore identifiés, en dehors de ceux déjà connus (agmatine, arcaine, arginine, glycoeyamine, méthylguanidine, octopine). C'est pourquoi, cette technique a été appliquée aux invertébrés pour la détermination de l'agmatine dans les extraits tissulaires. Par exemple, Thoai et al. [237] ont utilisé cette méthode pour montrer la présence de l'agmatine dans les crustacés et dans les hépatopancreas des mollusques (*Sepia officinalis linnaeus*). Par cette méthode, Roche et al. [238] ont montré également la présence de l'agmatine dans quelques fruits de mer, par exemple les *Arca noae linnaeus*. Cette méthode a été également utilisée par d'autres chercheurs tels que Larher et al. [239] pour séparer et identifier l'agmatine de ses dérivés.

Ainsi, l'avantage de la méthode CCM est d'avoir des résultats facilement interprétables sans beaucoup de matériels lourds. Le seul inconvénient est d'avoir des résultats souvent non reproductibles, en plus certains réactifs utilisés sont toxiques.

### II.8.1.2 Chromatographie en phase liquide de haute performance (CLHP)

La CLHP est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimique. Elle permet d'identifier, de séparer et de doser les composés chimiques avec précision. L'appareil chromatographique se distingue du système de détection : par absorption ou par fluorescence. Cependant, les limites de détections obtenues pour la CLHP à détection de fluorescence sont beaucoup plus faibles que celles obtenues en absorption. C'est pourquoi la CLHP à détection de fluorescence est de plus en plus utilisée surtout pour le dosage de l'agmatine dans les liquides physiologiques [161, 162], les aliments [232] et les boissons [240-245]. Compte tenu des effets d'interférence possibles, la CLHP est souvent couplée à d'autres appareils de mesure. Par exemple, pour déterminer le taux d'agmatine dans le cerveau du bovin, Feng et al. [246] ont utilisé la CLHP couplée au spectromètre de masse par une interface de type électrophorèse. Par cette méthode, ils ont pu obtenir un taux d'agmatine compris entre 0,2  $\mu\text{g/g}$  et 0,4  $\mu\text{g/g}$ .

De même, en utilisant la CLHP à détecteur de fluorescence Esnafoglu et al. [228] ont pu déterminer une concentration d'agmatine de 6,48 ng/mL dans le plasma humain.

## CHAPITRE II : REVUE SUR L'AGMATINE

Cependant, ces diverses méthodes à détection de fluorescence sont très problématiques à cause de l'instabilité des complexes AGM avec les marqueurs fluorogéniques. En plus, l'équipement est très coûteux. Le tableau II.3 résume un grand nombre de travaux sur la détection d'agmatine par voie CLHP dans différents échantillons.

**Tableau II.3:** Teneur de l'agmatine détectée par la méthode CLHP dans différentes matrices selon le type de dosage

Matrices	Extraction	Solvants d'extraction	Marqueurs /détection/ $\lambda$	Teneur détectée	Référence
Vin (rouge)	ELL	Ether diéthylique	CID/UV	9.92 mg/L	
Vin (blanc)	Centrifugation	Acétate d'éthyle	CID /UV, 283 nm	2.46 mg/L	[13, 14, 28]
Vin (rouge) Vin (blanc)	Centrifugation	Acétate d'éthyle	DEEMM /Photodiodes	0-1,07 mg/L 0,4-1,07mg/L	
Bière	Centrifugation	HCl (0,1 M), TDPA (0,2%)	DEEMM/UV, 280 nm	0 -12,5mg/L	[32]
Viande de porc	Centrifugation	TCA	OPA/Fluorescence $\lambda_{ex}$ 330 nm, $\lambda_{em}$ 465 nm	19,98 mg/kg	[125]
Plasma-ASD Plasma-non-ASD	Centrifugation	HCL-HClO	OPA- ME/Fluorescence $\lambda_{ex}$ 350 nm, $\lambda_{em}$ 450 nm	6.48 mg/mL 15.27 mg/mL	[139]
Poisson	Centrifugation	HCl (0,1 M)	CID/photodiode	0-30,6 mg/kg	[224]
Pate de soja fermentée	Centrifugation	1,7-Diaminoheptane / HClO <sub>4</sub> (0,4 N)	CID /UV, 254 nm	47.32 mg/100	[247]
Fromage râpé Fromage	Centrifugation	Méthanol ASS (12%) HClO	OPA/Fluorescence $\lambda_{ex}$ 340 nm, $\lambda_{em}$ 445 nm	0.21 mg/100g 0.29 mg/100g 4,02 mg/kg	[223, 225]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Isolement	-	NBDF/MS/MS		[248]
Lait	Centrifugation	HClO (70%)	OPA/Fluorescence $\lambda_{ex}$ 340nm $\lambda_{em}$ 445 nm	0-0,18 mg/kg	[224]

Diéthyl éthoxyméthylénemalonate (DEEMM), 3,30-Thiodipropionic acid (TDPA), sulfosalicylic acid (ASS)

### II.9.1.3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Dans un appareil de CPG on distingue deux phases : une phase stationnaire représentée par une colonne placée dans une enceinte à température régulée et une phase mobile qui est un gaz porteur. Le système de détection de la CPG peut être représenté par un détecteur d'ionisation à flamme, considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques tels que les amines biogènes. La CPG peut être aussi couplée à un spectromètre de masse. On l'utilise souvent pour la détermination de l'agmatine dans des tissus cérébraux post mortem. Ainsi, la quantité d'agmatine détectée peut être de l'ordre de 12,47 ng/mL quand la CPG est couplée à un spectromètre de masse d'ionisation chimique négative (ICN) [238]. D'autres chercheurs ont trouvé avec cette méthode un taux d'agmatine de 0,1 ng/mg dans les tissus cérébraux humain [249]. Egalement, avec la même méthode, Zhongli et al. [250] ont pu quantifier un taux de récupération de l'agmatine compris entre 92,3 % et 109,3 % dans le plasma de rat.

Ainsi, la méthode CPG est très précise, reproductible, sensible et rapide. Cependant, elle nécessite un équipement lourd et sophistiqué avec un personnel spécifiquement qualifié. C'est pourquoi, la méthode CPG-ICN qui est également très sensible, spécifique est souvent utilisée à la place pour la détermination de l'agmatine dans le liquide plasmatique.

### II.9.2 Méthodes enzymatiques

Comme leur nom l'indique, les méthodes enzymatiques de détection de l'agmatine font appel à l'action d'enzymes et d'anticorps.

Le procédé est le suivant : une première enzyme, la diamine oxydase (DAO) va agir sur l'amine biogène en entraînant une production de peroxyde d'hydrogène. Puis, l'addition d'une deuxième enzyme, la peroxydase en présence du peroxyde d'hydrogène et d'un leuco-cristal violet (incolore) va faciliter l'oxydation du leuco-cristal en cristal violet (composé coloré). L'intensité de la coloration violette est donc proportionnelle à la quantité d'amines biogènes contenue dans l'échantillon. Le résultat peut être lu directement par spectrophotométrie ou par l'utilisation d'une courbe standard [250].

Plusieurs kits exploitant les techniques immuno-enzymatiques sont disponibles auprès de divers fabricants. Par exemple, la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) développée en 1971 par Perlman P. et al. est l'une des techniques immuno-enzymatiques de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps. Cette détection se fait grâce à une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme sur un substrat préalablement fixée à l'anticorps. Ainsi, pour quantifier l'agmatine, cette méthode a été utilisée et les résultats obtenus donnent des limites de détections supérieures à 39 pg/mL [251]. Cette technique semi-quantitative a été aussi appliquée à la détermination de l'agmatine dans l'urine [227]. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés par la méthode fluorimétrique l'AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) permettant d'analyser simultanément plusieurs échantillons [252]. Son inconvénient est que l'enzyme (DAO) réagit avec les autres amines présentes en grande quantité. Cette méthode n'est donc pas sélective et tendrait à surestimer la quantité d'une amine biogène spécifique même dans des proportions inférieures à 10 mg/kg. En plus, certains réactifs nécessitent d'être stockés entre 0 °C et 4 °C, parfois à -20 °C [250].

### II.8.3 Méthode spectrofluorimétrique

L'agmatine a une fluorescence très faible voir même inexistante. Pour sa détection en fluorescence, il est nécessaire de procéder par dérivation en utilisant des marqueurs fluorogéniques tels que l'orthophthalaldéhyde (OPA), le chlorure de dansyle (CDS), le 7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazole (NBD-F), le chlorure de benzoyle, le diethyl éthoxyméthylénemalonate (DEEMM), le 3,5-dinitrobenzoyl chloride (CBD), l'hexafluoroacétylacétone (HFAA), le naphthalène-2 ,3-dialdéhyde (NDA) [253, 254]. Parmi ces marqueurs, l'OPA est le plus utilisé dans les analyses en fluorescence [255-257].

Cependant, l'analyse de ces dérivés mérite une attention particulière. Par exemple, l'OPA le plus couramment utilisé se déshydrate en milieu aqueux [258] et réagit avec l'agmatine en quelques minutes pour former un dérivé fluorescent qui se stabilise au bout de 20 minutes au moins après agitation [259]. En revanche, le chlorure de dansyle est un réactif qui n'est pas toujours spécifique car il réagit également avec les phénols, les alcools et les sucres. Il a en plus une affinité aussi bien avec les amines primaires que secondaires [260]. C'est pourquoi, après

utilisation du chlorure de dansyle, des traitements supplémentaires sont nécessaires afin d'éliminer les composés secondaires. Par exemple, pour éliminer les composés phénoliques les échantillons doivent être purifiés sur colonne C18 après dérivation [261], à moins qu'un traitement antérieur au PVP (polyvinylpolypyrrolidone) soit fait lors de la préparation des échantillons [262]. Avec le NBD-F, la réaction de dérivation se fait à haute température (60 °C) pour obtenir un dérivé très stable [229]. C'est pourquoi, beaucoup de chercheurs ont utilisé l'OPA comme marqueur dans le dosage de l'agmatine. Parmi les différents travaux on peut citer :

- les travaux de Cohn et al. sur la recherche de l'agmatine dans les protéines [263] où ils ont trouvé un taux de 85 % d'agmatine ;
- les travaux de Nedeljko et al. [264] où ils ont obtenu un taux de récupération satisfaisant compris entre 96,37 % et 100,44 % dans des suppléments diététiques;
- les travaux de Nishikawa et al. [265] qui ont déterminé la quantité d'agmatine dans la sardine, où ils ont obtenu une concentration de 0,14 mM.

Ces résultats peuvent être améliorés en stabilisant le complexe OPA-AGM avant toute mesure.

### Références

- [1] Piasta A.M., Jastrzebska A., Krzeminski M.P., Muzioł T.M., Szłyk E. New procedure of selected biogenic amines determination in wine samples by HPLC. *Analytica Chimica Acta*, 834 (2014) 58-66.
- [2] Jeromel A., Ganić K.K., Herjavec S., Mihaljević M., Jagatić korenika A.M., Rendulić I., Čolić M. Concentration of Biogenic Amines in „Pinot Noir“ Wines Produced in Croatia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 77:1 (2012) 37-40.
- [3] Suzzi G., Gardini F. Biogenic amines in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2003) 41-54.
- [4] [www.memoironline / putréfaction14.html](http://www.memoironline/putrefaction14.html) (consulté, le 10/09/2014).
- [5] Pintado A.I.E., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O., Pintado M.M.E., Gomes A.M.P., Malcata F.X. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal*, 18 (2008) 631-640. Doi: 10.1016/j.idairyj.2007.11.021.
- [6] Eldeep G.S.S., Mokhtar S.M., Mostafa G.A., Taha R.A., Gaballa A.A. Relationship between Biogenic Amine Content and Hygienic Quality of Raw Meat in Fresh Fermented Sausage. *Journal of Food & Nutritional Disorders*, 2:3 (2013) 1-7. Doi: 10.4172/2324-9323.1000114.
- [7] Chytiri S., Paleologos E., Savvaidis I., Kontominas M.G. Relation of Biogenic Amines with Microbial and Sensory Changes of Whole and Filleted Freshwater Rainbow Trout (*Onchorynchus mykiss*) Stored on Ice. *Journal of Food Protection*, 67 (2004) 960-965.
- [8] Brillat A. Sélection et caractérisation de souches de *Carnobacterium* pour la biopréservation du saumon fume. Thèse de doctorant, Université de Nantes, (2005).
- [9] Agudelo-Romero P., Bortolotti C., Pais M.S., Tiburcio A.F., Fortes A.M. Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67 (2013) 105-119. Doi: 10.1016/j.plaphy.2013.02.024.
- [10] O'Byrne P. *Red Wine and Health*. Nova Science Publishers, New York (2009) 173-203.
- [11] Galgano F., Caruso M., Perretti G., Favati F. Authentication of Italian red wines on the basis of the polyphenols and biogenic amines. *European Food Research Technology*, 232 (2011) 889-897. Doi: 10.1007/s00217-011-1457-1.

## Références partie A

---

- [12] Alberto M.R., Arena M.E., de Nadra M.C. M. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. *Food Control*, 18 (2007) 898-903. Doi: 10.1016/j.foodcont.2006.05.006.
- [13] Galgano F., Caruso M., Favati F., Romano P., Caruso M. HPLC determination of agmatine and other amines in wine. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 37:4 (2003) 237-242.
- [14] Pena-Gallego A., Hernandez-Orte P., Cacho J., Ferreira V. High-performanceliquid chromatography analysis of amines in must and wine: a review. *Food Reviews International*, 28 (2012) 71-96.
- [15] Leitao M.C., Marques A.P., San Romao M.V. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*, 16 (2005) 199-204. Doi: 10.1016/j.foodcont.2004.01.012.
- [16] Anli R.E., Vural N.F., Yılmaz S., Vural Y.H. The Determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (2004) 53-62.
- [17] Kvasnicka F., Voldrich M. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1103 (2006) 145-149. Doi: 10.1016/j.chroma.2005.11.005.
- [18] De Borba B.M., Rohrer J.S. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1155 (2007) 22-30. Doi:10.1016/j.chroma.2007.01.114.
- [19] Halász A., Baráth Á., Holzapfel W.H. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 208 (1999) 434-438.
- [20] Okamoto A., Sugita E., Koizumi Y., Yanagida F., Uda S. Polyamine Content of Ordinary Foodstuffs and Various Fermented Foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61:9 (1997) 1582-1584.
- [21] Özdestan Ö., Üren A. Biogenic Amine Content of Shalgam (S-algam): A Traditional Lactic Acid Fermented Turkish Beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 2602-2608. Doi: 10.1021/jf903775z.

## Références partie A

---

- [22] Loret S., Deloyer P., Dandrifosse G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Journal of Food Chemistry*, 89 (2005) 519-525. Doi: 10.1016/j.foodchem.2004.03.010.
- [23] Rodriguez-Naranjo M.I., Ordóñez J.L., Callejón R.M., Cantos-Villar E., Garcia-Parrilla M.C. Melatonin is formed during winemaking at safe levels of biogenic amines. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, 57 (2013) 140-146. Di: 10.1016/j.fct.2013.03.014.
- [24] Martuscelli M., Arfelli G., Manetta A.C., Suzzi G. Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). *Journal of Food Chemistry*, 140 (2013) 590-597. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.008.
- [25] Özdestan Ö., Üren A. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta*, 78 (2009) 1321-1326. Doi: 10.1016/j.talanta.2009.02.001.
- [26] Canas P.M.I., Romero E.G., Alonso S.G., Gonzalez M.F., Herreros M.L.L.P. Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (2008) 731-735. Doi: 10.1016/j.jfca.2007.11.002.
- [27] Preti R., Antonelli M.L., Bernacchia R., Vinci G. Fast determination of biogenic amines in beverages by a core-shell particle column. *Journal of Food Chemistry*, 187 (2015) 555-562. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.075.
- [28] Gómez-Alonso S., Hermosín-Gutiérrez I., Garcí-Romero E. Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 608-613.
- [29] Jastrzebska A., Piasta A., Krzeminski M., Szlyk E. Application of 3,5-bis-(trifluoromethyl) phenyl isothiocyanate for the determination of selected biogenic amines by LC-tandem mass spectrometry and <sup>19</sup>F NMR. *Jour of Food Chemistry*, 239 (2018) 225-233. Doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.100.
- [30] Almeida C., Fernandes J.O., Cunha S.C. A novel dispersive liquidliquid microextraction (DLLME) gas chromatographymass spectrometry (GCeMS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*, 25 (2012) 380-388. Doi: 10.1016/j.foodcont.2011.10.052.

## Références partie A

---

- [31] Kalac P., Savel J., Krizek M., Pelikánová T., Prokopová M. Biogenic amine formation in bottled beer. *Journal of Food Chemistry*, 79 (2002) 431-434.
- [32] Redruello B., Ladero V., Del Rio B., Fernández M., Martín M.C., Miguel A. A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. *Journal of Food Chemistry*, 217 (2017) 117-124. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.040.
- [33] Moret S., Smela D., Populin T., Conte L.S. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Journal of Food Chemistry*, 89 (2005) 355-361. Doi: 10.1016/j.foodchem.2004.02.050.
- [34] Peñas E., Frias J., Sidro B., Vidal-Valverde C. Impact of fermentation conditions and refrigerated storage on microbial quality and biogenic amine content of sauerkraut. *Journal of Food Chemistry*, 123 (2010) 143-150. Doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.021.
- [35] Lavizzari T., Veciana-Nogúes M.T., Bover-Cid S., Mariné-Font A., Vidal-Carou M.C. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1129 (2006) 67-72. Doi: 10.1016/j.chroma.2006.06.090.
- [36] Ali M.A., Poortvliet E., Strömberg R., Yngve A. Polyamines in foods: development of a food database. *Food & Nutrition Research*, 55:5572 (2011) 1-15. Doi: 10.3402/fnr.v55i0.5572.
- [37] Wendakoon C.N., Sakaguchi M. Effect of spices on growth and biogenic amines formation by bacteria in fish muscle. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 30:5 (1993) 305-313.
- [38] Pircher A., Bauer F., Paulsen P. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research Technology*, 226 (2007) 225-231. Doi: 10.1007/s00217-006-0530-7.
- [39] Marino M., Maifreni M., Moret S., Rondinini G. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 31 (2000) 169-173.
- [40] Flasarova R., Pachlova V., Bunkova L., Menšíkova A., Georgova N., Drab V., Bunka F. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis subsp. Cremoris strains* in the model system of Dutch-type cheese. *Journal of Food Chemistry*, 194 (2016) 68-75.

## Références partie A

---

- [41] Martín R., MSc, Olivares M., PhD, Marín M.L., PhD, Fernández L., PhD, Xaus J., PhD, Rodríguez J. M., PhD. Probiotic Potential of 3 *Lactobacilli* Strains Isolated From Breast Milk. *Journal of Human Lactation*, 21:1 (2005) 8-17.
- [42] Linares D.M., Fernández M., Del-Río B., Ladero V., Martín M.C., Alvarez A.M. The tyrosyl-tRNA synthetase like gene located in the tyramine biosynthesis cluster of *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by tyrosine concentration and extracellular pH. *BMC Microbiology*, 12:23 (2012) 1-12.
- [43] Martín R., Olivares M., Marín M.L., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M. Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 104 (2005) 267-277. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.007.
- [44] Bover-Cid S., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C. Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology* 65 (2001) 113-123.
- [45] Bover-Cid S., Hugas M., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology* 66 (2001) 185-189.
- [46] Bover-Cid S., Holzapfel W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53 (1999) 33-41.
- [47] Bhardwaj A., Gupta H., Iyer R., Kumar N., Malik R.K. Tyramine-producing enterococci are equally detected on tyramine production medium, by quantification of tyramine by HPLC, or by *tdc* gene-targeted PCR. *Dairy Science of Technology*, 89 (2009) 601-611. Doi: 10.1051/dst/2009040.
- [48] Arena M.P., Romano A., Capozzi V., Beneduce L., Ghariani M., Grieco F., Lucas P. Spano G. Expression of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 tyrosine decarboxylase and agmatine deiminase genes in wine correlates with substrate availability. *Letters in Applied Microbiology*, 53 (2011) 395-402. Doi: 10.1111/j.1472 765X.2011.03120.x.
- [49] Košmerl T., Šučur S., Prosen H. Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape and wine. *Acta agriculturae Slovenica*, 101:2 (2013) 249-261.

## Références partie A

---

- [50] Lonvaud-Funel A. MiniReview. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199 (2001) 9-13.
- [51] Stratton J.E., Hutkins R.W., Taylor S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54 (1991) 460-470.
- [52] Sumner S.S., Speckhard M.W., Somers E.B., Taylor, S.L. Isolation of histamine producing *Lactobacillus buchneri* from cheese implicated in a food poisoning outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (1985) 1094-1096.
- [53] Kimura B., Konagaya Y. Fujii T. Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. *International Journal of Food Microbiology*, 70(2001) 71-77.
- [54] Parente E., Martuscelli M., Gardini F., Grieco S., Crudele M.A., Suzzi G. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 6 (2001) 882-891. Doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01322.x.
- [55] Jorgensen L.V., Huss H.H., Dalgaard P. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 89 (2000) 920-934.
- [56] Gingerich T.M., Lorca T., Flick G.J., Pierson M.D., Mcnairh. M. Biogenic Amine Survey and Organoleptic Changes in Fresh, Stored, and Temperature-Abused Bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Journal of Food Protection*, 62: 9 (1999) 1033-1037. Doi: 10.4315/0362-028x-62.9.1033.
- [57] Emborg J., Laursen B.G., Dalgaard P. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 8C-effect of vacuum and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 101 (2005) 263-279
- [58] Geornaras I., Dykes G.A., Holy A. Biogenic amine formation by poultry-associated spoilage and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 21:3 (1995) 164-166. Doi: 10.1111/j.1472-765x.1995.tb01032.x.
- [59] Benner R.A., JR., Staruszkiewicz W.F., Otwell W.S. Putrescine, Cadaverine, and Indole Production by Bacteria Isolated from Wild and Aquacultured Penaeid Shrimp Stored at 0, 12, 24, and 368 C. *Journal of Food Protection*, 67: 1 (2004) 124-133.

## Références partie A

---

- [60] Bover-Cid S., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C. Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science*, 57 (2001) 215-221.
- [61] Moracanin S. V., Stefanovic S., Radicevic T., Borovic B., Djukic D. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from Uzicka sausages. *Procedia Food Science*, 5 (2015) 308-311.
- [62] Arena M.E., Landete J.M., De Nadra M.C., Pardo I., Ferrer S. Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X1B isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (2008) 158-165. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03725.x
- [63] Martuscelli M., Gardini F., Torriani S., Mastrocola D., Serio A., Chaves-Lo'pez C., Schirone M., Suzzi G. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 15 (2005) 571-578.
- [64] Martuscelli M., Crudele M.A., Gardini F., Suzzi G. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 31 (2000) 228-232.
- [65] Lucas P., Landete J., Coton M., Coton E., Lonvaud-Funel A. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229 (2003) 65-71.
- [66] Dahani S., Bouchriti N., Lhor Y. Analyse du modèle de corégulation de la sécurité sanitaire des produits de la pêche au Maroc à travers l'exemple des dangers « histamine », « parasites » et « sulfites ». *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 5 :4 (2017) :449-455
- [67] Moreno-Arribas V., Lonvaud-Funel, A. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*, 180:1 (1999) 55-60.
- [68] Landete J.M., Arena M.E., Pardo I., De Nadra M.C.M., Ferrer S. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. *Food Microbiology*, 25 (2008) 882-887.

## Références partie A

---

- [69] Kelly M., Garcia F., Farines V., Blaise A. Etude des polyamines et de leurs précurseurs dans les baies et les vins des cépages Grenache noir et Syrah de la Vallée du Rhône. Centre de Formation et de Recherche en Oenologie, (2014) 1-7.
- [70] Pessione E., Mazzoli R., Giuffrida M.G., Lamberti C., Garcia-Moruno E., Barello C., Conti A., Giunta C. A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics*, 5 (2005) 687-698.
- [71] Calles-Enríquez M., Eriksen B.H., Andersen P.S., Rattray F.P., Johansen A.H., Fernández M., Ladero V., Alvarez M.A Sequencing and Transcriptional Analysis of the *Streptococcus thermophilus* Histamine Biosynthesis Gene Cluster: Factors That Affect Differential hdcA Expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:18 (2010) 6231-6238.
- [72] Martí-Álvarez P.J., Marcobal A., Carmen P., Moreno-Arribas M.V. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *European Food Research Technology*, 222 (2006) 420-424. Doi: 10.1007/s00217-005-0142-7.
- [73] Alcaide-Hidalgo J.M., Pueyo E., Polo M.C., Martínez-Rodríguez A.J. Bioactive Peptides Released from *Saccharomyces cerevisiae* under Accelerated Autolysis in a Wine Model System. *Journal of Food Science*, 72: 7 (2007) 276-279. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00450.x.
- [74] Pérez-Serradilla J.A., Luque de Castro M.D. Role of lees in wine production: A review of *Food Chemistry*, 111 (2008) 447-456. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.04.019.
- [75] Alexandre H., Heintz D., Chassagne D., Guilloux-Benatier M., Charpentier C., Feuillat M. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26 (2001) 335-240.
- [76] Bonnin-Jusserand M., Grandvalet C., Rieu A., Weidmann S., Alexandre H. Tyrosine-containing peptides are precursors of tyramine produced by *Lactobacillus plantarum* strain IR BL0076 isolated from wine. *BMC Microbiology*, 12:199 (2012) 1-12.
- [77] Tabanelli G., Torriani S., Rossi F., Rizzotti L., Gardini F. Effect of Chemico-Physical Parameters on the Histidine Decarboxylase (HdcA) Enzymatic Activity in *Streptococcus thermophilus* PRI60. *Journal of Food Science*, 0:0 (2012) 1-7.

## Références partie A

---

- [78] Bubelová Z., Buňka F., Tatáková M., štajnochová K., Purevdorj K., Buňková L. Effects of temperature, pH and NaCl content on in vitro putrescine and cadaverine production through the growth of *Serratia marcescens* CCM 303. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50:11 (2015) 797-808. Doi: 10.1080/03601234.2015.1058097.
- [79] De Filippis F., Pennacchia C., Di Pasqua R., Fiore A., Fogliano V., Villani F., Ercolini D. Decarboxylase gene expression and cadaverine and putrescine production by *Serratia proteamaculans* in vitro and in beef. *International Journal of Food Microbiology*, 165: 3 (2013) 332-338. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.021.
- [80] Gardini F., Martuscelli M., Caruso M.C., Galgano F., Crudele M.A., Favati F., Guerzoni M.E., Suzzi G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64 (2001) 105-117.
- [81] Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O., Mendes E., Oliveira B. M. Ferreira M. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitao cheeses. *Jour of Food Chemistry*, 75 (2001) 287-291.
- [82] Gennaro M.C., Gianotti V., Marengo E., Pattono D., Turi R.M. A chemometric investigation of the effect of the cheese making process on contents of biogenic amines in a semi hard Italian cheese (Toma). *Journa of Food Chemistry*, 82 (2003) 545-551. Doi: 10.1016/S0308-8146(03)00009-8.
- [83] Rezaei M., Montazeri N., Langrudi H.E., Mokhayer B., Parviz M., et Nazarinia A., Relation of biogenic amines and bacterial changes in ice-stored southern caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*). *Journal of Food Biochemistry*, 31:4 (2007) 541-550.
- [84] Hernández O.P., Lapeña A.C., Peña G.A., Astrain J., Baron C., Pardo I., Polo L., Ferrer S., Cacho J., et Ferreira V., Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels. Factors affecting formation. *Food Research International*, 41 (2008) 697-706.
- [85] Dandach S., Rôle des acides aminés dans la production d'amines biogènes chez *Oenococcus oeni*. Thèse de doctorat, Université de Dijon, (2013).
- [86] Bakar J., Yassoralipour A., Bakar F.A., et Rahman R.A., Biogenic amine changes in barramundi (*Lates calcarifer*) slices stored at 0°C and 4°C. *Journal of Food Chemistry*, 119 (2010) 467-470.

## Références partie A

---

- [87] Paulsen P., Bauer F. Biogenic amines in fermented sausages: 2. Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented sausages. *Fleischwirtschaft International*, 77 (1997) 32-34.
- [88] Ferreira I.M.P.L.V.O., et Pinho O., Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines. *Journal of Food Protection*, 69 (2006) 2293-2303
- [89] Marcobal A., de las Rivas B., Muñoz R. Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 1 (2006) 187-196.
- [90] Dapkevicius M.L.N.E., Nout M.J.R., Rombouts F.M., Houben J.H., et Wymenga W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 57 (2000) 107-114.
- [91] Linares D.M., Fernández M., Martín M.C., Álvarez M.A. Tyramine biosynthesis in *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine concentration. *Microbial Biotechnology*, 2:6 (2009) 625-633. Doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00117.x.
- [92] Liu F., Xu W., Du L., Wang D., Zhu Y., Geng Z., Zhang M. Xu W. Heterologous Expression and Characterization of Tyrosine Decarboxylase from *Enterococcus faecalis* R612Z1 and *Enterococcus faecium* R615Z1. *Journal of Food Protection*, 77:4 (2014) 592-598. Doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-326.
- [93] Buňková L., Buňka F., Pollaková E., Podešvová T., Dráb V. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *International Journal of Food Microbiology*, 147 (2011) 112-119. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.017.
- [94] Latorre-Moratalla M.L., Bover-Cid S., Talon R., Garriga M., Zanardi E., Ianieri A., Fraqueza M.J., Elias M., Drosinos E.H., Vidal-Carou M.C. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage Manufacturing. *LWT-Food Science and Technology*, 43 (2010) 20-25. Doi: 10.1016/j.lwt.2009.06.018.
- [95] Gonzalez-Fernández C., Santos E.M., Jaime I., Rovira J. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Journal of Food Microbiology*, 20 (2003) 275-284. Doi: 10.1016/S0740-0020(02)00157-0.

## Références partie A

---

- [96] <https://blog.cognifit.com/fr/types-neurotransmetteurs/> (consulté, le 31/10/2018).
- [97] Meguid M.M., Fetissov S.O., Varma M., Sato T., Zhang L., Laviano A., Rossi-Fanelli F. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition*, 16:10 (2000) 843-857. Doi: 10.1016/s0899-9007(00)00449-4.
- [98] Hausswirth C. nutrition et performance en sport : la science au bout de la fourchette Original. <http://books.openedition.org/insep/1190.47-57>.
- [99] Chaouloff F. Serotonin, stress and corticoids. *Journal of Psychopharmacol*, 14 (2000) 139-151.
- [100] Lataster J., Collip D., Ceccarini J., Haas D., Booij L., van Os J., Pruessner J., Laere K.V., Myin-Germeys I. Psychosocial stress is associated with in vivo dopamine release in human ventromedial prefrontal cortex: A positron emission tomography study using [<sup>18</sup>F] fallypride. *NeuroImage*, 58 :4 (2011) 1081-1089. Doi : 10.1016/j.neuroimage.2011.07.030.
- [101] [https://vitagate.ch/public/wem\\_files/Franzoesisch/Stress/hormones\\_stress.pdf](https://vitagate.ch/public/wem_files/Franzoesisch/Stress/hormones_stress.pdf) (consulté, le 31/10/2018).
- [102] McGaugh J.L., Roozendaal B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 12:2 (2002) 205-210. Doi: 10.1016/s0959-4388(02)00306-9.
- [103] Fetissov S.O., Meguid M.M., Chen C., Miyata G. synchronized release of dopamine and serotonin in the medial and lateral hypothalamus of rats. *Neuroscience*, 101:3 (2000) 657-663.
- [104] Brigitte M., Collin P., Erik M. La qualité microbiologique des aliments : maitrises et critères. 2<sup>ème</sup> édition (2005) 355.
- [105] Bettuzzi S., Davalli P., Astancolle S., Pinna C., Roncaglia R., Boraldi F., Tiozzo R., Sharrard M., Corti A. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Letters*, 446 (1999) 18-22.
- [106] Scorcioni F., Corti A., Davalli P., Astancolle S., Bettuzzi S. Manipulation of the expression of regulatory genes of polyamine metabolism results in specific alterations of the cell-cycle progression. *Journal of Biochemistry.*, 354 (2001) 217-223.
- [107] Babbar N., Gerner E.W. Polyamines as modifiers of genetic risk factors in human intestinal cancers. *Biochemical Society Transactions* 31:2 (2003) 388-392.

## Références partie A

---

- [108] Ignatenko N.A., Besselsen D.G., Basu Roy U.K., Stringer D.E., Blohm-Mangone K.A., Padilla-Torres J.L., Guillen R.J.M., Gerner E.W. Dietary Putrescine Reduces the Intestinal Anticarcinogenic Activity of Sulindac in a Murine Model of Familial Adenomatous Polyposis. *Nutrition and Cancer*, 56:2 (2006) 172-181. Doi: 10.1207/s15327914nc56028.
- [109] Gugliucci A. Review Polyamines as clinical laboratory tools. *Clinica Chimica Acta*, 344 (2004) 23-35. Doi: 10.1016/j.cccn.2004.02.022.
- [110] Coffino P. Polyamines in spermiogenesis: Not now, darling. *PNAS*, 97:9 (2000) 4421-4423.
- [111] Moruzzi M.S., Marverti G., Piccinini G., Frassinetti C., Monti M.G. Effect of spermine on membrane-associated and membrane-inserted forms of protein kinase C. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 124 (1993) 1-9.
- [112] Johnson L.R., McCormack S.A. Healing of Gastrointestinal Mucosa: Involvement of Polyamines. *News Physiological Sciences*, 14 (1999) 12-17.
- [113] Grimble R.F., Grimble G.K. Immunonutrition: Role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. *Nutrition*, 14 (1998) 605-610.
- [114] Law D.M., Davies P.J., Mutschler M.A., method of extending shelf life and enhancing keeping quality of fruits. Patent 186, 321 (1990) 1-5.
- [115] Alsokari S.S. Synergistic effect of kinetin and spermine on some physiological aspects of seawater stressed *Vigna sinensis* plants. *Journal of Biological Sciences*, 18 (2011) 37-44.
- [116] Lange J., Wittmann C. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Anal Bioanal Chemistry*, 372 (2002) 276-283. Doi: 10.1007/s00216-001-1130-9.
- [117] Stadnik J., Dolatowski Z.J. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9:3 (2010) 251-263.
- [118] Standarová E., Borkovcová I., Vorlová L. The occurrence of biogenic amines in dairy products on the czech market. *Acta Scientiarum Polonorum Medicina Veterinaria*, 7:3 (2008) 35-42.
- [119] Halász A., Baráth A., Simon-Sarkadi L. and Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sciences Technology*, 5 (1994) 42-48.

## Références partie A

---

- [120] Shalaby A.R Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29:7 (1996), 675-690.
- [121] Ha H.C., Yager J.D., Woster P.A., Casero R.A., Jr. Structural Specificity of Polyamines and Polyamine Analogues in the Protection of DNA from Strand Breaks Induced by Reactive Oxygen Species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244:1 (1998) 298-303.
- [122] Smith C.J., Hussain J.I., Allen J.C. Inhibition of cell proliferation by polyamines does not depend on the cytotoxicity of acrolein. *Biochemical Society Transactions*, 13 (1985) 326-329.
- [123] Eerola S., Sagues A.X.R., Lilleberg L., Aalto H. Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage. *Zeitung Lebensmittel für Untersuchung und Forschung A*, 205 (1997) 351-355.
- [124] European Food Safety Authority. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk base control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA journal*, 9 (2011) 1-93
- [125] Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M., Mastrocola D., Suzzi G. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control*, 16 (2005) 609-616. Doi: 10.1016/j.foodcont.2004.06.023.
- [126] Ladero V., Calles-Enríquez M., Fernández M., Alvarez M.A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6 (2010) 145-156.
- [127] Anses. Caractéristiques et sources de l'histamine, (2012).
- [128] <https://www.vignevin-sudouest.com> (consulté, le 13/04/2018).
- [129] Linder M.C., Houle P.A., Isaacs E., Moor J.R., Scott L.E. Copper regulation of ceruloplasmin in copper-deficient rats. *Enzyme*, 24 (1979) 23-35.
- [130] Directive 91/493/CEE, (1991).
- [131] DGAL/SDSSA/N2013-8198. Plan de surveillance d'histamine dans les produits de la pêche, (2013).
- [132] Kossel A. Über das agmatin. *Von*, (1910) 257-261.

## Références partie A

---

- [133] Goracke-Postle C.J., Overland A.C., Stone L.S. Fairbanks C.A. Agmatine transport into spinal nerve terminals is modulated by polyamine analogs. *Journal of Neurochemistry*, 100 (2007) 132-141. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04193.x.
- [134] Sun X., Song W., Liu L. Enzymatic production of agmatine by recombinant arginine decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (2015) 1-31. Doi: 10.1016/j.molcatb.2015.06.008.
- [135] Engeland R., Kutscher F. Ueber eine zweite wirksame Secale-base. *Zeitschrift fur Physiologische Chemie*, 57 (1910) 49-65.
- [136] Dale H.H., Lidlaw P.P. Further observations on the action of  $\beta$ -iminazolyethylamine. From the Wellcome Physiological Research Laboratories, Herne Hill, (1911)181-195.
- [137] Tabor C.W., Tabor H. Polyamines. *Annular Review Biochemistry*, 53 (1984) 749-790.
- [138] Li G., Reis D.J. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Journal of Science*, 263 (1994) 966-969
- [139] Gen, L., Regunathan, D., Barrow, C.J., Esraghi, J., Cooper, R., Reis, D.J. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Journal of Science*, 263 (1994) 12231-12234.
- [140] Horyn O., Luhovyy B., Lazarow A., Daikhin Y., Nissim I., Yudkoff M., Nissim I. Biosynthesis of agmatine in isolated mitochondria and perfused rat liver: studies with  $^{15}\text{N}$ -labelled arginine. *Journal of Biochemistry*, 388 (2005) 419-425.
- [141] Dreyfus J.C. Agmatine un nouveau neurotransmetteur? *Médecine/Sciences*, 10:5 (1994) 589.
- [142] Li G., Regunathan S., Reis D.J. Agmatine Is Synthesized by a Mitochondrial Arginine Decarboxylase in Rat Brain. *Annals New York Academy of Sciences*, (1995) 324-329.
- [143] Gilad G.M., Gilad V.H. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. *Neuroscience Letters*, 296 (2000) 97-100.
- [144] He H-M., Ren L-M., Tian H-L., Lu H-G., Zhao D. Effects of imidazolines on neurogenic contraction in isolated urinary bladder detrusor strips from rabbit. *Canadian Journal of Physiology Pharmacology*, 90 (2012) 219-227. Doi: 10.1139/y11-112.
- [145] Piletz J.E., Aricioglu F., Cheng J-T. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. *Drug Discovery Today*, (2013). Doi: 10.1016/j.drudis.2013.05.017.

## Références partie A

---

- [146] Steer H. The source of carbon dioxide for gastric acid production. *The Anatomical Record*, 292 (2009) 79-86.
- [147] Agostinelli E., Marques M.P.M., Calheiros R. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Chemistry and biology*, 38 (2010) 393-403. Doi: 10.1007/s00726-009-0396-7.
- [148] Remko M., Broer R., Remková A., Duijnen P.T.V. Structure and stability of complexes of agmatine with some functional receptor residues of proteins. *Chemical Physics Letters*, 673 (2017) 44-49. Doi: 10.1016/j.cplett.2017.02.006.
- [149] Song J., Zhou C., Liu R., Wu X., Wu D., Hu X. Ding Y. Expression and purification of recombinant arginine decarboxylase (speA) from *Escherichia coli*. *Molecular Biology*, 37 (2010) 1823-1829.
- [150] Burrell M., Hanfrey C.C., Murray E.J., Stanley-Wall N.R., Michael A.J. Metabolism: Evolution and Multiplicity of Arginine Decarboxylases in Polyamine Biosynthesis and Essential Role in *Bacillus subtilis* Biofilm Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (2010) 39224-39238. Doi: 10.1074/jbc.M110.163154.
- [151] Liao S., Poonpairaj P., Ko K-C. Occurrence of Agmatine Pathway for Putrescine Synthesis in *Selenomonas ruminatum*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 72:2 (2008) 445-455. Doi: 10.1271/bbb.70550.
- [152] Sun A., Song W., Qiap W., Chen X., Liu J., Luo Q., Liu L. Efficace agmatine production using an arginine decarboxylase with substrate-specific activity. *Chemical technology and biotechnology*, 92:9 (2017) 1-23.
- [153] Arena M.E., Manca de Nadra M.C. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90 (2001) 158-162.
- [154] Golding B.T., Mitchinson A., Clegg W., Elsegood M.R.J., Griffin R.J. Protecting-group strategies for the synthesis of N4-substituted and N1, N8-disubstituted spermidines, exemplified by hirudonine. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1* (1999) 349-356.
- [155] Cabella C., Gardini G., Corpillo D. Transport and metabolism of agmatine in rat hepatocyte cultures. *European Journal of Biochemistry*, 268 (2001) 940-947.

## Références partie A

---

- [156] Sastre M., Regunathan S., Galea E., Reis D.J. Agmatinas activity in rat brain a metabolic pathway for the degradation of agmatine. *Journal Neurochemistry*, 67 (1996) 1761-1765.
- [157] Mella C., Martinez F., de los Angeles Garcia M., Nualart F., Castro V., Bustos P., Carvajal N., Uribe E., Expression and localization of an agmatinase-like protein in the rat brain. *Histochem Cell Biology*, 134 (2010) 137-144. Doi: 10.1007/s00418-010-0720-z.
- [158] Polo L.M., Gil-Ortiz F., Cantin A., Rubio V. New insight into the transcarbamylase family: the structure of putrescine transcarbamylase a key catalyst for fermentative utilization of agmatine. *Journal of Pone*, 7: 2 (2012) 1-15. Doi: 10.1371/journal.pone.0031528.
- [159] Marchenko M., Thomson A., Ellis T.N., Knuckley B., Causey C.P. Development of a clickable activity-based protein profiling (ABPP) probe for agmatine deiminases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2015) 1-11. Doi: 10.1016/j.bmc.2015.03.013.
- [160] Regunathan S., Dozier D., Takkalapalli R., Phillips W.J. Agmatine Levels in the Cerebrospinal Fluid of Normal Human Volunteers. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*, 23:1 (2009) 35-39. Doi: 10.1080/15360280902728161.
- [161] Zhao S., Wang B., Yuan H., Xiao D. Determination of agmatine in biological samples by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting-diode-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1123 (2006) 138-141. Doi: 10.1016/j.chroma.2006.05.038.
- [162] Zhao S., Huang Y., Shi M., Liub Y-M. Quantification of biogenic amines by microchip electrophoresis with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 5155-5159. Doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.081.
- [163] Raasch W., Regunathan S., Li G., Reis D.J. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life Sciences*, 56: 26 (1995) 2319-2330.
- [164] Jing Y., Liu P., Leitch B. Region-specific changes in presynaptic agmatine and glutamate levels in the aged rat brain. *Journal of Neuroscience*, 312 (2016) 10-18.
- [165] Aricioglu F., Regunathan S., Piletz J.E. Is Agmatine an Endogenous Factor Against Stress? *Annals New York Academy Sciences*, 1009 (2003) 127-132. Doi: 10.1196/annals.1304.012.
- [166] Zhu M-Y., Wang W-P., Cai Z-W., Regunathan S., Ordway G. Exogenous agmatine has neuroprotective effects against restraint-induced structural changes in the rat brain.

## Références partie A

---

- European Journal of Neuroscience, 27 (2008) 1320-1332. Doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06104.x.
- [167] Zhu M-Y., Wang W-P., Huang J., Feng Y-E., Regunathan S., Bissette G. Repeated immobilization stress alters rat hippocampal and prefrontal cortical morphology in parallel with endogenous agmatine and arginine decarboxylase levels. *Neurochemistry International*, 53 (2008) 346-354. Doi: 10.1016/j.neuint.2008.09.001.
- [168] Reis D.J. Regunathan S. Review: Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Science*, 21 (2000) 187-193.
- [169] Sastre M., Regunath S., Reis D.J. Uptake of agmatine into rat brain synaptosomes: possible role of cation channel. *Journal of Neurochemistry*, 69 (1997) 2421-2426.
- [170] Yang X-C Donald J. Agmatine Selectively Blocks the N-Methyl-D-Aspartate Subclass of Glutamate Receptor Channels in Rat Hippocampal Neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288: 2 (1999) 2544-2549.
- [171] Gilad G.M., Gilad V.H. Agmatine, and polyaminoguanidine-bound heterocyclic compounds for neurotrauma and neurodegenerative diseases. Patent number: 6114392 (2000).
- [172] Raasch W., SchaÈfer U., Chun J., Dominiak P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *British. Journal of Pharmacology*; 133 (2001), 755-780.
- [173] Olmos G., De Gregorio-Rocasolano N., Regalado M.P., Gasull T., Boronat M.A., Trullas R., Villarroel A., Lerma J., GarcõÁa-Sevilla J.A. Protection by imidazoline drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *Journal of Pharmacology*, 127 (1999) 1317-1326.
- [174] Song J., Hur B.E., Bokara K.K., Yang W., Cho H.J., Park K.A., Lee W.T., Lee K.M., Lee J.E. Agmatine Improves Cognitive Dysfunction and Prevents Cell Death in a Streptozotocin-Induced Alzheimer Rat Model. *Yonsei Medical Journal*, 55:3 (2014) 689-699.
- [175] Unal G., Ates A., Aricioglu F. Agmatine-attenuated cognitive and social deficits in subchronic MK-801 model of schizophrenia in rats. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*, 28:3 (2018) 245-253, Doi: 10.1080/24750573.2018.1426696

## Références partie A

---

- [176] Zomkowski A.D.E., Hammes L., Lin J., Calixto J.B., Santos A.R.S., Rodrigues A.L.S. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Journal of Neuroreport*, 13:4 (2002) 387-391. Doi: 10.1097/00001756-200203250-00005.
- [177] Feng Y., LeBlanc M.H., Regunathan S. Agmatine reduces extracellular glutamate during pentylentetrazole-induced seizures in rat brain: A potential mechanism for the anticonvulsive effects. *Neuroscience Letters*, 390 (2005) 129-133.
- [178] Wolf C., Bruss M., Hanisch B., Gothert M., Kugelgen V.I., Molderings G.J. Molecular Basis for the Antiproliferative Effect of Agmatine in Tumor Cells of Colonic, Hepatic, and Neuronal Origin. *Journal of Molecular Pharmacology*, 71:1 (2006) 276-283. Doi: 10.1124/mol.106.028449.
- [179] Zhu M-Y., Wang W-P., Bissette G. Neuroprotective effects of agmatine against cell damage caused by glucocorticoids in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 141:4 (2006) 2019-2027. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.05.011.
- [180] Bence A.K., Worthen D.R., Stables J.P., Crooks P.A. An in Vivo Evaluation of the antiseizure activity and acute neurotoxicity of agmatine. *Journal of Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 74 (2003) 771-775.
- [181] Marx M., Trittenwein G., Aufrich C., Hoeger H., Lubec B. Agmatine et spermidine reduce collagene accumulation in kidneys of diabetic db/db mice. *Journal of Nephron*; 66 (1995) 155-158.
- [182] Galea E., Regunathan S., Eliououlos V., Feinstein D.L., Reis D.J. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Journal of Biochemistry*, 15: 316 15 (1996) 247-249.
- [183] Molderings G.J., Kribben B., Heinen A., Schröder D., Brüss M., Göthert M. Intestinal Tumor and Agmatine (Decarboxylated Arginine). Low Content in Colon Carcinoma Tissue Specimens and Inhibitory Effect on Tumor Cell Proliferation In Vitro. *Journal American Cancer Society* 101 (2004) 858-868.
- [184] Mayer C., Michaud M., Poulin S., Garrigue J., Blachier F. Effet anti-proliférant et mécanisme d'action de l'agmatine sur deux lignées d'adénocarcinome de côlon humain HT29 et Caco2. *Journal of Gastroentérologie Clinique Biologique*, 26: 4 (2002), 399.

## Références partie A

---

- [185] Hougaard M.D., Larsson L.I. Polyamine cytochemistry use of novel O-Phtalaldehyde method for visualizing spermidine and spermine. Comparisons to the formaldehyde-fluorescamine method. *Journal of Histochemistry*, 76 (1982) 247-259.
- [186] Sener A., Lebrun P., Blachier F., Malaisse W.J. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release insulinotropic action of agmatine. *Biochemical Pharmacology*, 38: 2 (1989) 327-330.
- [187] Sun M.K., Regunathan S., Reis D.J. Cardiovascular responses to agmatine, a clonidine-displacing substance, in anesthetized rat. *Clinical and Experimental Hypertension*, 17 (1995) 115-128, Doi: 10.3109/10641969509087059.
- [188] Kolesnikov Y., Jain S., Pasternak G.W. Modulation of opioid analgesia by agmatine. *European Journal of Pharmacology*, 296 (1996) 17-22.
- [189] Kim J.H., Kim J.Y., Mun C.H., Suh M., Lee J.E. Agmatine Modulates the Phenotype of Macrophage Acute Phase after Spinal Cord Injury in Rats. *Experimental Neurobiology*, 26:5 (2017) 278-286.
- [190] Moretti M., Matheus F.C., de Oliveira P.A., Neis V.B., Ben J., Walz Roger. Rodrigues A. L.S., Prediger R.D. Role of agmatine in neurodegenerative diseases and epilepsy. *Frontiers in Bioscience E6*, (2014) 341-359.
- [191] Fairbanks C.A., Schreiber K.L., Brewer K.L. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:19 (2000) 10584-10589.
- [192] Paszcuka A.F., Gadottib V.M., Tibolab D. Anti-hypernociceptive properties of agmatine in persistent inflammatory and neuropathic models of pain in mice. *Brain Research*, 1159 (2007) 124-133. Doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.050.
- [193] Horváth G., Kékesi G., Dobos I., Szikszay M., Klimscha W., Benedek G. Effect of intrathecal agmatine on inflammation-induced thermal hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, 368 (1999) 197-204. Doi: 10.1016/s0014-2999(99)00060-6.
- [194] Kekesi G., Joo G., Csullog E., Peter-Szabo M., Benedek G., Horvath G. Dose-independent antinociceptive interaction of endogenous ligands at the spinal level. *Brain Research*, 1029 (2004) 93-102.

## Références partie A

---

- [195] Önal A., Soykan N. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 69 (2001) 93-97.
- [196] Santos A.R.S., Gadotti V.M., Oliveira G.L. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology*, 48 (2005) 1021-1034. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.01.012.
- [197] Bradley K.J., Headley P.M. Effect of agmatine on spinal nociceptive reflexes: lack of interaction with  $\alpha_2$ -adrenoceptor or  $\mu$ -opioid receptor mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 331 (1997) 133-138.
- [198] Karadag H.C., Ulugol A., Tamer M., Ipci Y., Dokmeci I. Systemic agmatine attenuates tactile allodynia in two experimental neuropathic pain models in rats. *Neuroscience Letters*, 339 (2003) 88-90. Doi: 10.1016/S0304-3940(02)0146-8.
- [199] Courteix C., Privat A.-M., Pélissier T., Hernandez A., Eschalier A., Fialip J. Agmatine Induces Antihyperalgesic Effects in Diabetic Rats and a Superadditive Interaction with R(-)-3-(2-Carboxypiperazine-4-yl)-propyl-1-phosphonic Acid, a N-Methyl-D-aspartate-Receptor Antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322:3 (2007) 1237-1247. Doi: 10.1124/jpet.107.123018.
- [200] Önala A., Delen Y., Ülker S., Soykan N. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: Possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. *Life Sciences*, 73 (2003) 413-428. Doi: 10.1016/S0024-3205(03)00297-2.
- [201] Moulinoux J-P. Composition containing agmatine, and uses thereof in preparing drugs or nutraceutical substances. Nutrialys medical Nutrition SA, University, EP2802318A1 (2012).
- [202] Courteix C. Agmatine et douleur. Elsevier EM Sonsule, 1016 :10 (2007) 12-004.
- [203] <http://www.supersmart.com/fr> (consulté, le 14/08/2014).
- [204] Aricioglu F., Regunathan S. Agmatine attenuates stress- and lipopolysaccharide-induced fever in rats. *Physiology & Behavior* 85 (2005) 370-375.
- [205] Battaglia V., Rossi C.A., Colombatto S., Grillo M.A., Toninello A. Different behavior of agmatine in liver mitochondria: Inducer of oxidative stress or scavenger of reactive oxygen species? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768 (2007) 1147-1153. Doi : 10.1016/j.bbamem.2007.01.011.

## Références partie A

---

- [206] <http://www.infinitelabs.com/agmatine-2/> (consulté, le 18/01/2018).
- [207] <http://www.fitadium.com/fr> (consulté, le 14/08/2014).
- [208] <http://knp7.com/41141> (consulté, le 14/04/2018).
- [209] Wang J-F., Su R-B., Wu N., Xu B., Lu X-Q., Liu Y., Li J. Inhibitory effect of agmatine on proliferation of tumor cells by modulation of polyamine metabolism. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26:5 (2005) 616-622.
- [210] Kapancik S., Celik V.K., Kilickap S, Kacan T., Kapancik S. The relationship of agmatine deficiency with the lung cancer. *International Journal of Hematology and Oncology*, 26:2 (2016) 103-109
- [211] Gardini G., Cravanzola C., Autelli R. Agmatine inhibits the proliferation of rat hepatoma cells by modulation of polyamine metabolism. *Journal of Hepatology*, 39 (2003) 793-799.
- [212] Mayeur C., Veuillet G., Michaud M., Raul F., Blottière H.M., Blachier F. Effects of agmatine accumulation in human colon carcinoma cells on polyamine metabolism, DNA synthesis and the cell cycle. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1745 (2005) 111-123. Doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.12.004.
- [213] Lee J-P., Chen W., Wu H-T., Lin K-C., Cheng J-T. Metformin can Activate Imidazoline I<sub>2</sub> Receptors to Lower Plasma Glucose in Type 1-like Diabetic Rats. *Hormone Metabolic Research*, 43 (2011) 26-30. Doi: 10.1055/s-0030-1267169.
- [214] Gründemann D., Hahne C., Berkels R. and Schömig E. Agmatine Is Efficiently Transported by Non-Neuronal Monoamine Transporters Extraneuronal Monoamine Transporter (EMT) and Organic Cation Transporter 2 (OCT2). *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304:2 (2003) 810-817.
- [215] Lortie M.J., Novotny W.F., Peterson O.W. Agmatine, a Bioactive Metabolite of Arginine Production, Degradation, and Functional Effects in the Kidney of the Rat. *American Society for Clinical Investigation*, 97:2 (1996) 413-420.
- [216] Chang C-H., Wu H-T., Cheng K-C., Lin H-J., Cheng J-T. Increase of  $\beta$ -endorphin secretion by agmatine is induced by activation of imidazoline I<sub>2</sub>-receptors in adrenal gland of rats. *Neuroscience Letters*, 468 (2010) 297-299. Doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.018.

## Références partie A

---

- [217] Hwang S-L., Liu I-M., Tzeng T-F., Cheng J-T. Activation of imidazoline receptors in adrenal gland to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, 48 (2005) 767-775. Doi: 10.1007/s00125-005-1698-2.
- [218] Ko W.C., Liu I-M., Chung H-H., Cheng J-T. Activation of I<sub>2</sub>-imidazoline receptors may ameliorate insulin resistance in fructose-rich chow-fed rats. *Neuroscience Letters*, 448 (2008) 90-93. Doi: 10.1016/j.neulet.2008.10.002.
- [219] Su C-H., Liu I-M., Chung H-H. Activation of I<sub>2</sub>-imidazoline receptors by agmatine improved insulin sensitivity through two mechanisms in type-2 diabetic rats. *Neuroscience Letters*, 457 (2009) 125-128. Doi: 10.1016/j.neulet.2009.03.093.
- [220] Keynan O., Mirovsky Y., Dekel S., Gilad V.H., Gilad G.M. Safety and Efficacy of Dietary Agmatine Sulfate in Lumbar Disc-associated Radiculopathy. An Open-label, dose-escalating Study followed by a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Pain Medicine*, 11 (2010) 356-368.
- [221] Gilad G.M. Gilad V.H. Long-Term (5 Years), High Daily Dosage of Dietary Agmatine-Evidence of Safety: A Case Report. *Journal of Medical Food*, 17:11 (2014) 1256-1259.
- [222] <https://www.muscleexperience.com/glossaire> (consulté, le 03/05/2018).
- [223] Custódio F.B., Tavares É., Glória M.B.A. Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (2007) 280-288.
- [224] Park J.S., Lee C.H., Kwon E.Y., Lee H.J., Kim J.Y., Kim S.H. Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. *Journal of Food Control*, 21 (2010) 1219-1226. Doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.001.
- [225] Novella-Rodríguez S., Veciana-Nogueés M.T., Vidal-Carou M.C. Biogenic Amines and Polyamines in Milks and Cheeses by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48 (2000) 5117-5123.
- [226] Chen G.G., Turecki G., Mamer O.A. A novel liquid-liquid extraction and stable isotope dilution NCI-GC-MS method for quantitation of agmatine in postmortem brain cortex. *Journal Mass Spectrometry*, 45 (2010) 560-565. Doi: 10.1002/jms.1742.
- [227] Huisman H., Wynveen P., Nichkova M., Anal K.G. Novel ELISAs for screening of the biogenic amines GABA, glycine,  $\beta$ -phenylethylamine, agmatine, and taurine using one

## Références partie A

---

- derivatization procedure of whole urine samples. *Journal of Chemistry*, 82 (2010) 6526-6533.
- [228] Esnafoglu E., Irende I. Decreased plasma agmatine levels in autistic subjects. *Journal of Neural Transmission*, 125: 4 (2018) 735-740. Doi: 10.1007/s00702-017-1836-2.
- [229] Zhao S., Feng Y., LeBlanc M.H., Piletz J.E., Liu Y-M. Quantitation of agmatine by liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 470 (2002) 155-161.
- [230] Yen G-C., Hsieh C-L. Simultaneous Analysis of Biogenic Amines in Canned Fish by HPLC. *Journal of Food Science*, 56:1 (1991) 158-160.
- [231] Chotimarkorn C. Quality changes of anchovy (*Stolephorus heterolobus*) under refrigerated storage of different practical industrial methods in Thailand. *Journal of Food Sciences Technology*, 51:2 (2014) 285-293. Doi: 10.1007/s13197-011-0505-y.
- [232] Özyurt G., Kuley Y.E., Ozkutuk S., Ozogul F. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. *Journal of Food Chemistry*, 114 (2009) 505-510. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.078.
- [233] Paleologos E.K., Chytiri S.D., Savvaidis I.N, Kontominas M.G. Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation. *Journal of Chromatography A*, 1010 (2003) 217-224. Doi: 10.1016 /S0021-9673(03)01068-9.
- [234] Chen H-C., Huang Y-R., Hsu H-H. Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. *Journal of Food Control*, 21 (2010) 13-18. Doi: 10.1016/j.foodcont.2009.03.014.
- [235] Association of Official Analytical Chemists, *Official Methods of Analysis*, 16th ed. AOAC, Washington Method, 1995. 35.1.32.
- [236] Burnat M., Flores E. Inactivation of agmatinase expressed in vegetative cells alters arginine catabolism and prevents diazotrophic growth in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* *Microbiology Open* 3:5 (2014) 777-792. Doi: 10.1002/mbo3.207.
- [237] Thaoi N-V., Roche J., Robin Y. Métabolisme des dérivées guanidylés. I. Dégradation de l'arginine dans les invertébrés marins. *Biochimica et biophysica acta*, 11 (1953). 403-411.

## Références partie A

---

- [238] Roche J., Robin Y., Thoai N-Y., Pradel L.A. Sur les dérivés guanidiques et le phosphagène de quelques annélides polychètes de la baie de naples et du mollusque ARCA NOAE L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1 (1960) 44-55.
- [239] Larher F., Le Rudulier D., Goas G. Séparation de quelques dérivés de l'agmatine par électrophorèse et chromatographie sur papier. *Journal of Chromatography*, 95 (1974) 254-256.
- [240] Vidal-Carou M.C., Lahoz-Portoles F., Bover-Cid S., Marine-Font A. Ion pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 998 (2003) 235-241.
- [241] Bauza T., Blake A., Daumas F., Cabanis J.C. Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 707 (1995) 373-379.
- [242] Önal A., Tekkeli S.E.K., Önal C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Journal of Food Chemistry*, 138 (2013) 509-515
- [243] Wang Y-Q., Ye D-Q., Zhu B-Q., Wu G-F., Duan C-Q. Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect. *Journal of Food Chemistry*, 163 (2014) 6-15. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.064.
- [244] Latorre-Moratalla M.L., Bosch-Fusté J., Lavizzari T., Bover-Cid S., Veciana-Nogués M.T., Vidal-Carou M.C. Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of Chromatography*, 1216 (2009) 7715-7720.
- [245] Lee S., Yoo M., Shin D. The identification and quantification of biogenic amines in Korean turbid rice wine, Makgeolli by HPLC with mass spectrometry detection. *LWT - Food Science and Technology*, 62 (2015) 350-356. Doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.016.
- [246] Feng Y., Halaris A.E., Pilezt J.E. Determination of agmatine in brain and plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 691 (1997) 277-286.

## Références partie A

---

- [247] Shukla S., Park H-K., Kim J-K., Kim M. Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 1191-1195
- [248] Dalluge J.J., McCurtain J.L., Gilbertsen A.J., Kalstabakken K.A., Williams B.J. Determination of agmatine using isotope dilution UPLC-tandem mass spectrometry: application to the characterization of the arginine decarboxylase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2015). Doi: 10.1007/s00216-015-8724-0.
- [249] Chen G.G., Almeida D., Fiori L., Turecki G. Evidence of Reduced Agmatine Concentrations in the Cerebral Cortex of Suicides. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20:20 (2018) 1-6.
- [250] Zhongli Q., Ying L., Zhili X., Jianwei X. Determination of endogenous agmatine in rat plasma by isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 32:7 (2014) 779-783.
- [251] [www.biblimer.com](http://www.biblimer.com) (consulté, le 10/08/2014).
- [252] <http://www.biomatik.com/products/elisa-kits/human-agmatine-ureohydrolase-agmatinase-agmat-elisa-kit.html> (consulté, le 15/03/2018).
- [253] Özdestan Ö. Üren A. Biogenic amine content of kefir a fermented dairy product. *European Food Research Technology*, 231 (2010) 101-107. Doi: 10.1007/s00217-010-1258-y.
- [254] Lapa-Guimarães J., Pickova J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*, 1045 (2004) 223-232. Doi: 10.1016/j.chroma.2004.06.014.
- [255] García-Marino M., Trigueros Á., Escribano-Bailón T. Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23 (2010) 455-462. Doi: 10.1016/j.jfca.2010.02.003.
- [256] Landete J.M., Arena M.E., Pardo I., de Nadra M.C.M., Ferrer S. The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase. *International Journal of Microbiology*, 13 (2010) 169-177. Doi: 10.2436/20.1501.01.123.

## Références partie A

---

- [257] Suriano S., Savino M., Basile T., Tarricone L., Gennaro D.D. Management of malolactic fermentation and influence on chemical composition of aglianico red wines. *International Journal of Food Science*, 27 (2015) 310-319.
- [258] Zuman P. Reactions of Orthophthalaldehyde with Nucleophiles. *Chemical Reviews* 104:7 (2004) 3217- 3237.
- [259] Kital K., Traoré M., Sarr D., Mbaye M., Mbaye O., Cisse L., Seye M.D.G., Coly A., Delattre F., Tine A. Determination of Agmatine Rate by Spectrofluorimetric Method in Alkaline Medium: Optimization and Application on Shrimp. *Journal of Chemistry and Biochemistry* 7 (2019) 15-26. DOI: 10.15640/jcb.v7n1a2.
- [260] Sotou A., Loukou Z., Soufleros E., Stratis I. Determination of biogenic amines in wines and beers by high performance liquid chromatography with pre-column dansylation and ultraviolet detection. *Journal of Chromatographi A*, 57 (2003) 429-439.
- [261] Proestos C., Loukatos P., Komaitis M. Analytical, nutritional and clinical methods. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Journal of Food Chemistry*, 106 (2008) 1218-1224.
- [262] Daoudi E-H., Bonnet-Masimbert M. Polyamines conjuguées et différenciation florale chez le sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Canadian Journal Botany*, 76 (1998) 782-790.
- [263] Cohn V.H., Shore P.A. A Microfluorimetric for the determination of agmatine. *Analytical Biochemistry*, 2 (1961) 237-241.
- [264] Nedeljko P., Turel M., Lobnik A. Fluorescence-Based Determination of Agmatine in Dietary Supplements. *Analytical Letters*, (2015) 1-21. Doi: 10.1080/00032719.2014.991962.
- [265] Nishikawa H., Tabata T., Kitani S. Simple Detection Method of Biogenic Amines in Decomposed Fish by Intramolecular Excimer Fluorescence. *Food and Nutrition Sciences*, 3 (2012) 1020-1026. Doi: 10.4236/fns.2012.37135.

**PARTIE B :  
EXPERIMENTATION**

CHAPITRE III : PARTIE EXPÉRIMENTALE

III.1 Produits utilisés

Dans ce travail nous avons utilisé l'orthophtalaldéhyde (97%) (Figure III.1) et différentes amines biogènes : l'agmatine sulfaté (97%) (Figure III.1), la cadavérine (CAD), la dopamine (DOPA), l'histamine (HIST), la putrescine (PUT) la sérotonine (SERO), la spermidine (SPD), la tryptamine (TRY) et la tyramine (TYR).

Nous avons également utilisé des sels tels que : le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), le chlorure de fer(II) ( $\text{FeCl}_2$ ), le sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), le chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) et le phosphate de sodium ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ).

Tous ces produits étaient de qualité analytique provenant de Sigma Aldrich (France).

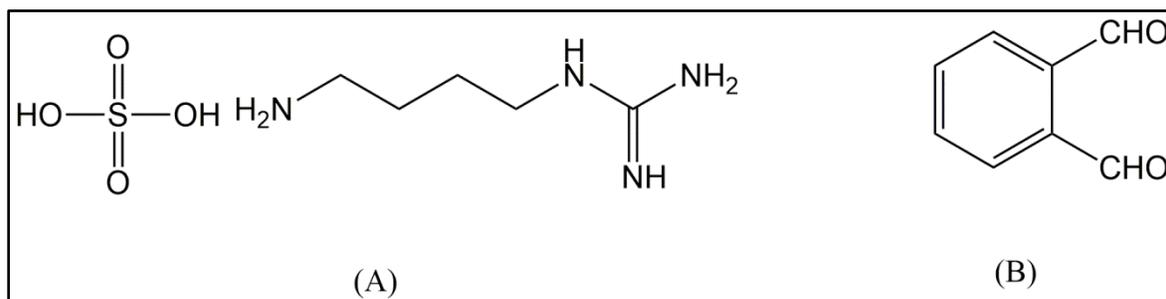


Figure III.1: Structure de l'agmatine sulfaté (A) et de l'orthophtalaldéhyde (B)

III.2 Les solvants

Comme solvants, nous avons utilisé : l'eau distillée, le méthanol, l'éthanol, le propan-2-ol, le propanol, le butanol, l'acétonitrile, le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'éther oxyde, le chloroforme, l'hexane et le cyclohexane. Tous ces solvants étaient de qualité spectroscopique. Nous avons également utilisé le trichloroacétate (TCA), l'hydroxyde de sodium (97%, m/m) et l'acide chlorhydrique 1N.

### III.3 Instrumentation

Les spectres d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 100 avec une gamme de 190 à 900 nm muni d'une bande passante variable de 0,2 à 4 nm. Les mesures fluorimétriques ont été faites à l'aide d'un spectrofluorimètre de marque Varian Cary Eclipse piloté par un logiciel WinUV. Ces appareils sont connectés à un logiciel WinUV pour l'acquisition des données.

Pour les mesures en UV, deux cuves parallélépipédiques en quartz comprenant deux faces polies (trajet optique 1 cm) ont été utilisées. Une cuve parallélépipédique en quartz (Labomoderne, France) comprenant cinq faces polies de trajet optique 1 cm et de volume intérieur 3,5 mL a été utilisée pour les mesures en fluorescence.

Dans ce travail, nous avons utilisé également une **balance Sartorius A.G** de précision 0,1 mg (Gottingen, Allemagne), des  **fioles** de 5 mL à 100 mL, des **micropipettes** (pipetman) de 5 à 1000  $\mu$ L (Gilson, France). Dans l'extraction, nous avons utilisé une centrifugeuse thermo **scientifique SL16R**. Pour la dissolution, un **Agitateur** (FISHER SCIENTIFIC FB15001) et un **ultrason** ont été utilisés. Enfin nous avons utilisé un **pH-mètre Consort model C6010** pour les mesures du pH.

Enfin, plus des logiciels classiques, nous avons utilisé d'autres logiciels qui sont l'**OriginPro version 8.5** pour le traitement statistique des données et le **ChemBioDraw ultra 13.0**: pour le dessin des structures moléculaires.

### II.4 Procédures expérimentales

#### II.4.1 Préparation des solutions

Des solutions mères d'amines biogènes et d'OPA de concentration  $10^{-2}$  M chacune ont été préparées dans des fioles de 25 mL avec de l'eau distillée. Cependant, il était nécessaire de dissoudre l'OPA dans de l'eau chaude. A partir de chaque solution mère nous avons procédé à des dilutions pour avoir des solutions filles de concentration désirée. Toutes les fioles contenant les solutions ont été protégées contre la lumière avec du papier aluminium et conservées dans un réfrigérateur jusqu'à leur utilisation. Egalement, des solutions mères de TCA (6%), de HCl (1M) et de NaOH (1 ou 5 M) et de différents sels de concentration  $10^{-2}$  M ont été préparées dans de l'eau distillée.

#### III.4.2 Détermination de la stœchiométrie du complexe OPA-AGM

L'agmatine (AGM) n'étant pas fluorescent, on l'a dérivée avec l'OPA pour avoir un complexe OPA-AGM fluorescent. Pour déterminer la stœchiométrie du complexe OPA-AGM, nous avons utilisé trois méthodes qui sont : la méthode des réactifs limitants, la méthode de Job et celle de Benesi-Hildebrand.

##### III.4.2.1 Méthode des réactifs limitants

Cette méthode consiste à fixer la concentration d'un des réactifs et faire varier celle de l'autre réactif dans une gamme de concentrations couvrant la concentration fixée. Après chaque mélange, nous avons enregistré les spectres d'excitation et d'émission du complexe. L'intensité de fluorescence de ce complexe est prélevée au maximum de la courbe d'émission. Ceci nous a permis d'établir la courbe de variation de l'intensité de fluorescence ( $I_F$ ) du complexe OPA-AGM en fonction de la concentration du réactif variant. Cette courbe nous donne deux droites de pentes différentes et la stœchiométrie est déterminée à partir de l'intersection des droites.

### III.4.2.2 Méthode de JOB

#### III.4.2.2.1 Principe de la méthode

Pour vérifier la stœchiométrie de la réaction, nous avons utilisé également la méthode de Job connue sous le nom de méthode de variation continue. La dénomination de cette méthode a été proposée pour la première fois en 1928 [1]. Cette méthode consiste à mélanger deux solutions variables A et B. La condition principale requise est d'avoir à chaque mesure :  $[A]_0 + [B]_0 = C_t$ . Dans cette formulation on fait varier  $[A]_0$  et  $[B]_0$  pour chaque mesure de telle sorte que la concentration du mélange ( $C_t$ ) reste toujours une constante à l'instant initial  $t_0$ .

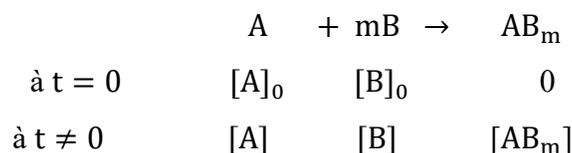
En réalité dans la formulation de Job les diverses fractions molaires ( $r_i$ ) utilisées sont calculées avant réaction dans le mélange  $i$ .

Pour plus de commodité on prépare au départ deux solutions mères différentes SA et SB équimolaires. Dans ce cas, l'opération se fera de telle sorte que  $V_A + V_B = \text{cste} = V$  pour chaque mélange  $i$ . Durant toute l'opération  $V_A$  et  $V_B$  sont variables avec  $V$  constant. Ceci nous permet d'avoir la fraction molaire ( $r_i$ ) d'un constituant donné pour chaque mélange  $i$ . On peut donc écrire pour chaque mélange  $r_i = \frac{V_i}{V}$  avec  $V_i$  égal au volume utilisé d'un constituant donné dans le mélange  $i$ . A chaque mélange, on peut mesurer l'intensité de fluorescence ( $I_F$ ) du complexe correspondant, calculer la concentration  $C_i$  et la fraction molaire  $r_i$ . Tout ceci nous permet de tracer la courbe de Job :  $I_F \cdot C_i = f(r_i)$ . L'allure de ce graphe donne toujours une courbe en cloche. Le maximum de cette courbe nous permet d'avoir la stœchiométrie de la réaction.

Par exemple, si la courbe de Job donne une cloche dont le maximum admet une abscisse  $r = 0,5$ , la stœchiométrie du complexe est de type 1 : 1.

### III.4.2.2.2 Démonstration de la méthode de Job pour une stœchiométrie de type (1:m)

Etant donnée la réaction entre A et B qui donne le complexe noté  $AB_m$  (type 1 : m) avec  $m \geq 1$ , on peut alors écrire :



Cette réaction est caractérisée par une constante d'association ( $K_a$ ) qui s'écrit :

$$K_a = \frac{[AB_m]}{[A][B]^m} \quad \text{Eq.1}$$

A tout instant, on peut écrire :

$$[A] = [A]_0 - [AB_m] \quad \text{Eq.2}$$

$$[B] = [B]_0 - m[AB_m] \quad \text{Eq.3}$$

$[A]_0$  et  $[B]_0$  représentent respectivement la concentration de A et de B pour un mélange i donné avant réaction.

$[AB_m]$  est la concentration du complexe dans le mélange i.

On peut donc écrire quel que soit le mélange i :

$$[A]_{0i} + [B]_{0i} = \text{cste} = C_t \quad \text{Eq.4}$$

Cependant, d'un échantillon à l'autre avant réaction, les fractions molaires respectives de A et de B pour le mélange i peuvent s'écrire :  $r_{Ai} = \frac{[A]_{0i}}{[A]_{0i} + [B]_{0i}}$  et  $r_{Bi} = \frac{[B]_{0i}}{[A]_{0i} + [B]_{0i}}$ .

Si on suit l'évolution de la fraction molaire de B avant réaction, au point maximum, on peut écrire :

$$r_B = \frac{[B]_0}{[A]_0 + [B]_0} = \frac{[B]_0}{C_t} \quad \text{Eq.5}$$

Dans cette équation  $[A]_0$  et  $[B]_0$  représentent respectivement les concentrations initiales (avant réaction) de A et de B et quand on atteint le maximum de la courbe de Job,  $r_B$  correspond à l'abscisse du sommet de cette courbe.

A partir de l'Eq.5 on aura donc :

$$[B]_0 = r_B C_t \text{ et } [A]_0 = C_t(1 - r_B)$$

D'après les équations Eq.1, Eq.2, et Eq.3 on peut aussi écrire:

$$\begin{cases} [AB_m] = K_a [A][B]^m \\ [AB_m] = [A]_0 - [A] = C_t(1 - r_B) - [A] \\ [AB_m] = \frac{[B]_0 - [B]}{m} = \frac{r_B C_t - [B]}{m} \end{cases}$$

Ainsi, dans la gamme des échantillons utilisés, la concentration  $[AB_m]$  varie en fonction de  $r_{Bi}$  et passe par un maximum pour  $\frac{d[AB_m]}{dr_{Bi}} = 0$ , ce qui se traduit en fonction des équations précédentes par:

$$\begin{cases} \frac{d[A]}{dr_{Bi}} [B]^m + m[A] \frac{d[B]}{dr_{Bi}} [B]^{m-1} = 0 \\ C_t + \frac{d[A]}{dr_{Bi}} = 0 \\ C_t - \frac{d[B]}{dr_{Bi}} = 0 \end{cases}$$

$$-C_t [B]^m + m[A] C_t [B]^{m-1} = 0 \Rightarrow [B] = m[A] \tag{Eq.6}$$

D'autre part on sait que  $[B] = [B]_0 - m[AB_m]$  et que  $[B]_0 = r_B C_t$

$$\Leftrightarrow [B] + m[AB_m] = r_B C_t \tag{Eq.7}$$

et  $[A] = [A]_0 - m[AB_m]$  et que  $[A]_0 = C_t(1 - r_B)$ ,

$$\Leftrightarrow [AB_m] = C_t(1 - r_B) - [A] \tag{Eq.8}$$

En combinant les équations Eq.7 et Eq.8 on a :  $r_B C_t = [B] + m C_t(1 - r_B) - m[A]$  Eq.9

Où  $[B] - m[A] = 0$  d'après l'équation 6. Dans ce cas, l'équation 9 devient :  $m = \frac{r_B}{1-r_B}$

Ainsi, le maximum de la concentration du complexe à l'équilibre est obtenu pour :

$$m = \frac{r_B}{1-r_B} \Leftrightarrow r_B = \frac{m}{1+m} \text{ avec } 0 < r_B < 1$$

Pour un complexe 1 : 1 on retrouve un maximum positionné à  $r_B$  0,5.

De même pour un complexe de type 1 :2 on trouve un maximum qui sera positionné  $r_B$  égale à 2/3.

### III.4.2.3 Méthode de Benesi-Hildebrand

#### III.4.2.3.1 Principe de la méthode

Cette méthode nous permet non seulement de vérifier la stœchiométrie du complexe entre l'OPA et l'AGM mais également d'avoir des avancés sur les paramètres thermodynamiques de la réaction entre l'OPA et l'AGM. Nous avons donc utilisé l'équation de Benesi-Hildebrand modifiée en prenant comme marqueur l'OPA [2, 3]. Avec une stœchiométrie de type 1 :1 entre l'AGM et l'OPA, à partir de l'équation de Benesi-Hildebrand on peut écrire :

$$\frac{1}{I_F - I_{F_{\min}}} = \frac{1}{I_{F_{\max}} - I_{F_{\min}}} + \frac{1}{(I_{F_{\max}} - I_{F_{\min}})K_a[OPA]} \quad \text{Eq.10}$$

pour une stœchiométrie de type 1 :2 on aura :

$$\frac{1}{I_F - I_{F_{\min}}} = \frac{1}{I_{F_{\max}} - I_{F_{\min}}} + \frac{1}{(I_{F_{\max}} - I_{F_{\min}})K_a[OPA]^2} \quad \text{Eq.11}$$

Dans ces relations :

$I_F$  représente l'intensité de fluorescence du complexe,

$I_{F_{\min}}$  représente l'intensité de fluorescence de l'AGM sans ajout d'OPA,

$I_{F_{\max}}$  représente l'intensité de fluorescence du complexe correspondant à la saturation en OPA,

$K_a$  représente la constante d'association entre l'OPA et l'AGM.

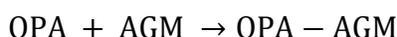
Ainsi, à partir de l'équation 10 : la courbe  $\frac{1}{I_F - I_{F_{\min}}} = f\left(\frac{1}{[OPA]}\right)$  donne une droite. Connaissant la pente et l'ordonnée à l'origine, on peut en déduire la constante d'association  $K_a$  à partir de laquelle on peut déterminer les paramètres thermodynamiques.

A partir de l'équation 11 : la courbe  $\frac{1}{I_F - I_{F_{\min}}} = f\left(\frac{1}{[OPA]^2}\right)$  donne également une droite à partir de laquelle on peut déterminer la constante d'association  $K_a$ .

### III.4.2.3.2 Démonstration de l'équation de Benesi-Hildebrand modifiée

#### Stœchiométrie entre l'OPA et l'AGM de type 1 :1

Dans ce cas on peut écrire la réaction de formation du complexe suivante :



La constante d'association  $K_a$  s'écrit : 
$$K_a = \frac{[OPA-AGM]}{[OPA][AGM]} \quad (1)$$

Si  $C_{AGM}$  et  $C_{OPA}$  sont respectivement la concentration initiale de l'AGM et de l'OPA, d'après la loi de conservation de la matière on peut écrire :

$$C_{AGM} = [AGM] + [OPA - AGM] \Rightarrow [AGM] = C_{AGM} - [OPA - AGM] \quad (2)$$

$$C_{OPA} = [OPA] + [OPA - AGM] \Rightarrow [OPA] = C_{OPA} - [OPA - AGM] \quad (3)$$

$$L'intensité de fluorescence du complexe s'écrit : I_F = a[AGM] + b[OPA - AGM] \quad (4)$$

Les constantes a et b représentent donc respectivement l'apport de l'AGM et du complexe OPA-AGM sur l'intensité de fluorescence ( $I_F$ ).

$$(2) \text{ et } (3) \text{ dans } (1) \text{ donne : } K_a = \frac{[OPA-AGM]}{(C_{OPA}-[OPA-AGM])(C_{AGM}-[OPA-AGM])}$$

Avec  $C_{OPA} \gg [OPA - AGM] \Rightarrow [OPA] = C_{OPA}$  donc on peut écrire :

$$K_a = \frac{[OPA-AGM]}{[OPA](C_{AGM}-[OPA-AGM])}$$

$$\Leftrightarrow K_a[OPA]C_{AGM} - K_a[OPA][OPA - AGM] = [OPA - AGM]$$

$$\Leftrightarrow [OPA - AGM] = \frac{K_a[OPA]C_{AGM}}{1+K_a[OPA]} \quad (5)$$

$$(2) \text{ et } (3) \text{ dans } (4) \text{ donne : } I_F = aC_{AGM} - a[OPA - AGM] + b[OPA - AGM] \quad (6)$$

$$(5) \text{ dans } (6) \text{ donne : } I_F = aC_{AGM} - \frac{aK_a[OPA]C_{AGM}}{1+K_a[OPA]} + \frac{bK_a[OPA]C_{AGM}}{1+K_a[OPA]} \quad (7)$$

Ors  $I_{F_{\min}} = aC_{AGM}$  et  $I_{F_{\max}} = bC_{AGM}$

En remplaçant  $aC_{AGM}$  et  $bC_{AGM}$  par  $I_{F_{\min}}$  et  $I_{F_{\max}}$  dans (7) on a :

$$I_F = I_{Fmin} - \frac{K_a[OPA]I_{Fmin}}{1+K_a[OPA]} + \frac{K_a[OPA]I_{Fmax}}{1+K_a[OPA]} \Rightarrow I_F - I_{min} = -\frac{K_a[OPA]I_{Fmin}}{1+K_a[OPA]} + \frac{K_a[OPA]I_{Fmax}}{1+K_a[OPA]}$$

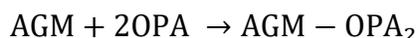
$$\Rightarrow \frac{1}{I_F - I_{Fmin}} = \frac{1}{I_{Fmax} - I_{Fmin}} + \frac{1}{(I_{Fmax} - I_{Fmin})K_a[OPA]}$$

Ainsi,

si la stœchiométrie est de type 1:1, la courbe  $\frac{1}{I_F - I_{Fmin}} = f\left(\frac{1}{[OPA]}\right)$  donne une droite de pente =  $\frac{1}{(I_{Fmax} - I_{Fmin})K_a}$  et d'ordonnée à l'origine  $\frac{1}{I_{Fmax} - I_{Fmin}}$

### Pour une stœchiométrie de type 1:2

L'équation de la réaction peut s'écrire :



Dans ce cas, la constante d'association  $K_a$  s'écrit :  $K_a = \frac{[OPA - AGM]}{[OPA]^2[AGM]}$  (1)

Si  $C_{AGM}$  et  $C_{OPA}$  sont respectivement la concentration initiale de l'AGM et celle de l'OPA, d'après la loi de conservation de la matière on peut écrire :

$$C_{AGM} = [AGM] + [OPA - AGM] \Rightarrow [AGM] = C_{AGM} - [OPA - AGM] \quad (2)$$

$$\text{et } C_{OPA} = [OPA] + 2[OPA - AGM] \Rightarrow [OPA] = C_{OPA} - 2[OPA - AGM] \quad (3)$$

En supposant une émission éventuelle de l'AGM, l'intensité de fluorescence du complexe s'écrit :

$$I_F = a[AGM] + b[OPA - AGM] \quad (4)$$

les constantes a et b représentent donc respectivement l'apport de l'AGM et du complexe OPA-AGM sur l'intensité de fluorescence ( $I_F$ ).

Les expressions (2) et (3) dans (1) donne :  $K_a = \frac{[OPA - AGM]}{(C_{OPA} - 2[OPA - AGM])^2(C_{AGM} - [OPA - AGM])}$

Avec  $C_{OPA} \gg 2[OPA - AGM] \Rightarrow [OPA] = C_{OPA}$  et on peut écrire :

$$K_a = \frac{[\text{OPA}-\text{AGM}]}{[\text{OPA}]^2(\text{C}_{\text{AGM}}-[\text{OPA}-\text{AGM}])}$$

$$\Leftrightarrow K_a[\text{OPA}]^2\text{C}_{\text{AGM}} - K_a[\text{OPA}]^2[\text{OPA} - \text{AGM}] = [\text{OPA} - \text{AGM}]$$

$$\Leftrightarrow [\text{OPA} - \text{AGM}] = \frac{K_a[\text{OPA}]\text{C}_{\text{AGM}}}{1+K_a[\text{OPA}]^2} \quad (5)$$

(2) et (3) dans (4) donne :  $I_F = a\text{C}_{\text{AGM}} - a[\text{OPA} - \text{AGM}] + b[\text{OPA} - \text{AGM}]$   
(6)

(5) dans (6) donne :  $I_F = a\text{C}_{\text{AGM}} - \frac{aK_a[\text{OPA}]^2\text{C}_{\text{AGM}}}{1+K_a[\text{OPA}]^2} + \frac{bK_a[\text{OPA}]^2\text{C}_{\text{AGM}}}{1+K_a[\text{OPA}]^2}$  (7)

Ors  $I_{F\min} = a\text{C}_{\text{AGM}}$  et  $I_{F\max} = b\text{C}_{\text{AGM}}$

En remplaçant  $a\text{C}_{\text{AGM}}$  et  $b\text{C}_{\text{AGM}}$  par  $I_{F\min}$  et  $I_{F\max}$  dans (7) on a :

$$I_F = I_{F\min} - \frac{K_a[\text{OPA}]^2 I_{F\min}}{1+K_a[\text{OPA}]^2} + \frac{K_a[\text{OPA}]^2 I_{F\max}}{1+K_a[\text{OPA}]^2} \Rightarrow I_F - I_{F\min} = -\frac{K_a[\text{OPA}]^2 I_{F\min}}{1+K_a[\text{OPA}]^2} + \frac{K_a[\text{OPA}]^2 I_{F\max}}{1+K_a[\text{OPA}]^2}$$

$$\Rightarrow \frac{1}{I_F - I_{F\min}} = \frac{1}{I_{F\max} - I_{F\min}} + \frac{1}{(I_{F\max} - I_{F\min})K_a[\text{OPA}]^2}$$

Ainsi,

si la stœchiométrie de la réaction est de type 1 :1, la courbe  $\frac{1}{I_F - I_{F\min}} = f\left(\frac{1}{[\text{OPA}]^2}\right)$  donne une droite de pente  $= \frac{1}{(I_{F\max} - I_{F\min})K_a}$  et d'ordonnée à l'origine  $\frac{1}{I_{F\max} - I_{F\min}}$

### III.4.3 Méthode de calcul des limites de détection, des limites de quantification et la déviation relative standard

En fixant les conditions optimales d'analyse à savoir le pH, la température, la stœchiométrie et le temps de stabilisation du complexe, nous avons établi des droites de calibration dans différents milieux.

Les caractéristiques de ces droites, nous ont permis de déterminer les performances analytiques telles que la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) définies comme suit :

- **la limite de détection (LOD)** est définie comme étant la concentration obtenue à partir de l'intensité de fluorescence correspondant à 3 fois l'écart-type du solvant =  $3 \sigma_s$ .

- **la limite de quantification (LOQ)**, elle est définie comme étant la concentration correspondant à l'intensité de fluorescence égale à 10 fois cet écart-type =  $10 \sigma_s$ .

Si l'équation de la droite d'étalonnage est de la forme :  $I = \beta + C$ .

Avec  $\beta$  l'ordonnée à l'origine de la droite, la pente, I l'intensité de fluorescence et C la concentration de l'agmatine.

Pour  $I = 3 \sigma_s \Rightarrow LOD = C$ , on peut donc écrire dans ce cas:  $3 \sigma_s = \beta + LOD$

$$\Leftrightarrow LOD = \frac{3 \sigma_s - \beta}{\alpha} \quad \text{Eq.12}$$

Dans ce cas  $LOQ = \frac{10 \sigma_s - \beta}{\alpha}$  Eq.13

Cependant, il est plus commode parfois d'utiliser la courbe  $\log I = f(\log C)$  car le LOD et LOQ peuvent être négatifs en utilisant respectivement les équations Eq.12 et Eq.13.

Dans ce cas, la courbe qu'on obtient aura comme équation :  $\log I = \beta' + \log C$ .

Si  $I = f(C)$  est une droite,  $\log I = f(\log C)$  est également une droite. Dans ce cas  $\beta'$  et  $\alpha'$  représentent respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine de cette nouvelle droite.

Egalement, pour  $I = 3 \sigma_s \Rightarrow LOD = C$  on peut écrire :

$$\Rightarrow \log 3 \sigma_s = \beta' + \alpha' \log LOD \Leftrightarrow \log \frac{(LOD)^{\alpha'}}{3 \sigma_s} = -\beta' = \log 10^{-\beta'}$$

$$\Leftrightarrow LOD = \left( \frac{3 \sigma_s}{10^{\beta'}} \right)^{1/\alpha'} \quad \text{Eq.14}$$

De même 
$$\text{LOQ} = \left( \frac{10\sigma_s}{10\beta'} \right)^{1/\alpha'} \quad \text{Eq.15}$$

Dans toutes ces relations  $\sigma_s$  représente l'écart-type du solvant. Il est obtenu à partir de la moyenne du signal de solvant lancé 10 fois.

Nous avons aussi évalué la **déviatiion standard relative (DSR)** qui nous renseigne sur la reproductibilité de la méthode utilisée. Plus cette DSR est faible plus la reproductibilité des mesures est bonne. Elle est donnée par la relation suivante :

$$\text{DSR} = \frac{\sigma}{I_m} \times 100 \quad \text{Eq.16}$$

où  $\sigma$  est l'écart type obtenu à partir de l'intensité de fluorescence du fluorophore pour une concentration fixée.

$I_m$  est l'intensité de fluorescence moyenne obtenue pour au moins six mesures de cette même concentration.

#### III.4.4 Limite de tolérance d'une substance interférente

Le principe consiste à fixer la concentration  $C_0$  de l'agmatine et faire varier celle de l'espèce interférente dans un grand excès d'OPA car la plupart des amines biogènes réagissent avec l'OPA. Soit  $I_0$  l'intensité du complexe en l'absence de l'interférent et  $I$  l'intensité du complexe en présence de l'interférent. La variation sur la mesure de l'intensité est donc

$$F = \frac{\Delta I}{I} = \frac{I_0 - I}{I_0}$$

$$\Leftrightarrow F (\%) = \frac{\Delta I}{I} \times 100 = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100 \quad \text{Eq. 17}$$

Pour notre cas, on s'est limité à une précision de  $\pm 5 \%$ .

Dans ce cas, la limite de tolérance (LT) est définie comme la concentration limite pour laquelle le pourcentage de variation du signal ne dépasse pas  $\pm 5 \%$ . Elle est obtenue à partir de la relation suivante :

$$F(\%) = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100 \leq \pm 5\%$$

De cette expression on peut déterminer les deux valeurs limites de  $I_1$  correspondent à  $F(\%) = \pm 5\%$ . Ces valeurs limites de  $I_1$  nous permettent de déterminer les limites de tolérances à partir de la courbe  $I = f[AB]$ .

La même procédure est utilisée pour déterminer les limites de tolérance avec les sels.

### III.5 Méthode d'extraction de l'agmatine dans les matrices

Les échantillons de crevettes séchées ont été achetés au marché sénégalais à Dakar et les crevettes fraîches au marché de Dunkerque (France) à la poissonnerie HALL.

Pour extraire l'agmatine dans ces échantillons, la méthode en phase solide (EPS) a été utilisée avec la chronologie de l'extraction sur les crevettes suivante.

Les crevettes ont été nettoyées au préalable avec de l'eau distillée puis écaillées. Ensuite, elles ont été broyées à l'aide d'un moulinex. Après, le broya a été réparti en trois bocaux conservés à différentes températures (-10 °C, +4 °C, et +25 °C). Deux grammes du broya ont été mélangés avec 10 mL de la solution de TCA 6%. Ce mélange a été homogénéisé pendant 5 minutes grâce à un agitateur magnétique. Après séparation par centrifugation pendant 20 minutes à la vitesse 5000 rpm à 4 °C, le liquide surnageant a été filtré à l'aide d'un papier filtre Wattman. Ensuite l'extrait a été neutralisé par du NaOH (5 N). Enfin, 10 $\mu$ L de cet extrait ont été placés dans une fiole de 5 mL puis complexés avec l'OPA avant de passer à l'analyse (Figure III.2). Ce même procédé a été utilisé pour extraire l'agmatine dans les raisins en provenance du supermarché Le clerc (Dunkerque).

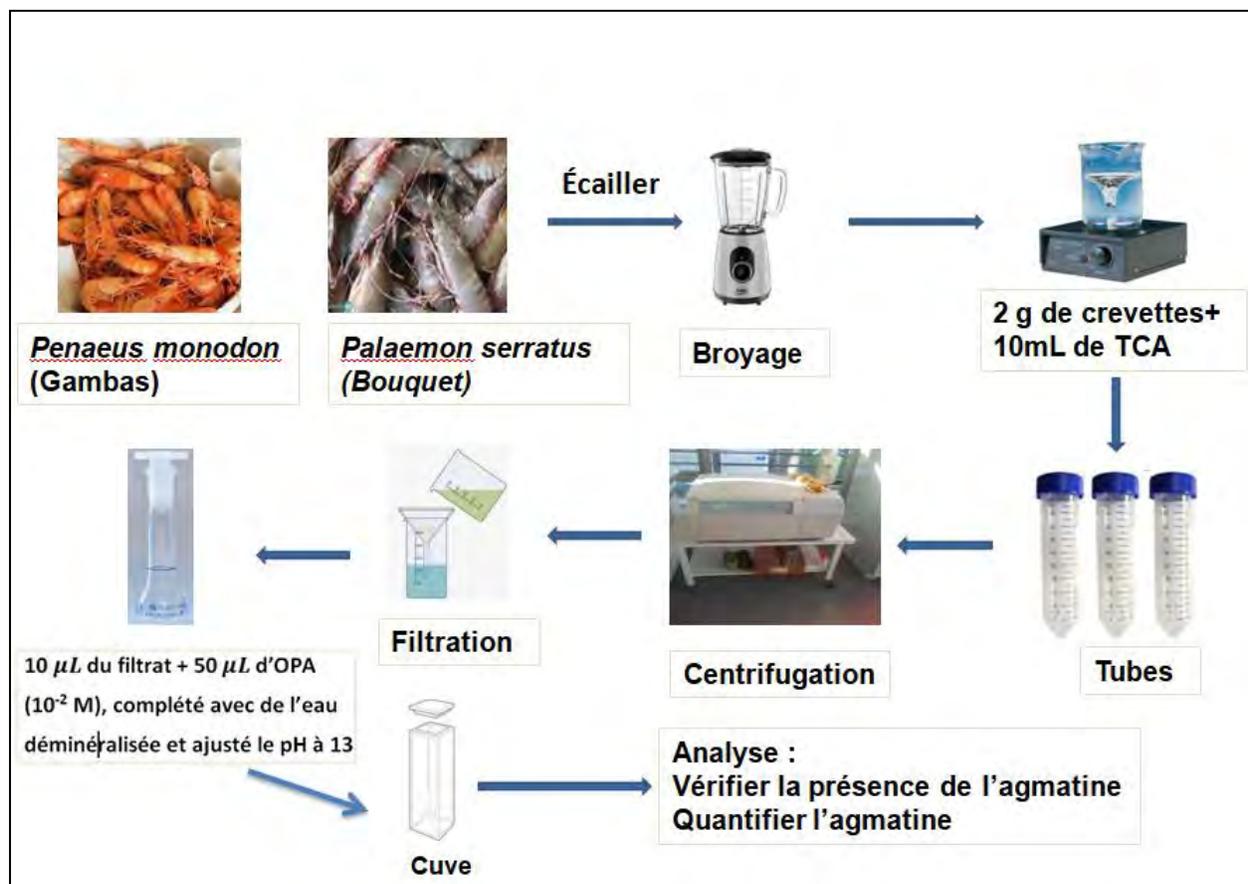


Figure III.2 : Procédure d'extraction de l'agmatine

Pour l'analyse de l'agmatine dans le vin, nous avons procédé ainsi : le vin a été filtré à travers un disque filtre (0,45 µm) afin d'éliminer les matières organiques en suspensions. Un mL de ce vin a été placé dans une fiole de 10 mL en présence de 50 µL d'agmatine (10<sup>-2</sup> M) et complétée avec de l'eau distillée. La teneur en agmatine dans le vin utilisé étant trop faible on était dans l'obligation de le fortifier avec de l'agmatine. Ce mélange a été ensuite complexé avec une solution d'OPA (10<sup>-4</sup> M) à pH 13. Avant toute analyse, ce mélange a été agité pendant 20 minutes.

### III.6 Méthode d'addition standard et calcul du pourcentage de recouvrement

#### III.6.1 Principe de la méthode d'addition standard

C'est une méthode utilisée pour l'analyse quantitative d'un composé dans une matrice. Elle permet ainsi d'évaluer l'effet de matrice par rapport à l'analyse d'un composé donné.

La méthode d'addition standard consiste donc à ajouter des volumes croissants de la solution standard à un volume fixe de l'échantillon à analyser. Dans ce cas, la première mesure se fait à blanc (échantillon à analyser seul). Pour chaque ajout, les intensités de fluorescence sont mesurées ; ce qui permet de tracer la droite d'addition standard. Dans le même repère on peut tracer les deux droites de calibration et d'addition standard afin de vérifier leur parallélisme. Si les deux droites sont parallèles (dans ce cas, pas d'effet de matrice), la concentration  $C_0$  du composé à analyser est déterminée en projetant horizontalement l'ordonnée à l'origine de la droite d'addition standard sur la droite de calibration. L'abscisse de ce point d'interception correspond à  $C_0$ .

Cependant, certaines erreurs de mesure effectuées lors de la préparation des échantillons peuvent affecter considérablement la pente de la droite d'addition standard, dans ce cas les deux droites ne peuvent être parallèles surtout quand il y'a un effet de matrice. C'est pourquoi, la détermination de la concentration  $C_0$  par cette méthode nécessite l'obtention d'une erreur relative de moins de 20 % sur les deux pentes. Bien entendu, les coefficients de corrélations des deux droites sont supposés supérieurs à 0,99 ( $r^2 > 0,99$ ) sur toute la gamme de concentrations étudiées [4, 5]. Si cette erreur relative est supérieure à 20% il faudra passer nécessairement par un autre type d'extraction liquide-liquide par exemple.

#### III.6.2 Détermination du taux massique

Les échantillons de crevettes ont été analysés en prélevant 10  $\mu\text{L}$  de l'extrait dilué dans un volume  $V$  (5 mL) d'eau déminéralisée. La concentration  $C_0$  (ng/mL) d'agmatine dans la solution de volume 5 mL est déterminée à partir des droites d'addition standard. La connaissance de  $C_0$

permet d'obtenir celle dans l'échantillon C (ng/mL) selon cette relation :  $C = 500C_0$  pour notre cas. En effet, cette concentration C est égale à celle qui est dans les 10  $\mu$ L identique à celle du filtrat. A partir de cette relation on en déduit la masse m (ng) d'agmatine pure contenue dans 2g ( $m_T$ ) de l'échantillon avec  $m = V \times C$ . Dans cette expression V est égal à 10 mL et C exprimée en ng/mL.

Ainsi, pour une masse de crevette ( $m_T$ ) le pourcentage massique ( $\tau$ ) peut s'écrire :

$$\tau = \frac{m \times 10^{-9}}{m_T} \times 100 \quad \text{Eq.18}$$

où m est exprimée en ng et  $m_T$  en g.

$$\text{Pour notre cas nous avons utilisé 2g de crevette donc } \tau = \frac{10^{-7} \times V \times C}{2}.$$

Ainsi, le taux massique  $\eta$  représentant la masse d'agmatine pure dans un Kg de crevette peut s'exprimer après simplification :

$$\eta = 10 \times \tau \quad \text{Eq.19}$$

#### III.6.3 Détermination du pourcentage de recouvrement

Cette grandeur permet d'évaluer le degré d'interférence pour chaque concentration située dans le domaine de linéarité de la courbe d'addition standard. Ce pourcentage est calculé à partir de l'équation suivant :

$$R(\%) = \frac{C_t}{C_a + C_0} \times 100 \quad \text{Eq.20}$$

$C_t$  : concentration totale de l'agmatine trouvée à partir de la droite d'addition standard.

$C_a$  : concentration ajoutée.

$C_0$  : concentration évaluée à blanc ( $C_a = 0$ ) à partir de la droite d'addition standard.

Si le pourcentage fluctue autour de 100%, l'effet de matrice est négligeable. Dans la pratique, les normes internationales de validation des résultats analytiques sont comprises entre 90% et 100%. Cependant, selon le degré de tolérance fixé à l'échantillon, on accepte en général

dans les laboratoires d'analyse des pourcentages de recouvrement variant entre 80% et 120% [6, 7].

#### III.7 Méthode de détermination des paramètres thermodynamiques

L'enthalpie libre d'un équilibre chimique est donnée par la relation :

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K \quad \text{Eq.21}$$

avec  $\Delta G^0$  l'enthalpie libre à l'état standard, R la constante des gaz parfaits, T la température et K la constante d'équilibre de formation du complexe OPA-AGM.

Cependant, à l'état d'équilibre l'enthalpie libre  $\Delta G$  de la réaction est nulle. En fait, le mélange réactionnel n'a aucune tendance d'évolution sans changement de paramètres à l'état d'équilibre.

A ce point on peut donc écrire :

$$\begin{aligned} 0 &= \Delta G^0 + RT \ln K \\ \Leftrightarrow \Delta G^0 &= -RT \ln K \end{aligned} \quad \text{Eq.22}$$

De même, la variation d'énergie libre peut s'écrire à l'état standard :

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad \text{Eq.23}$$

L'égalité entre les deux équations (Eq.22 et Eq.23) nous permet d'obtenir l'équation de Van't Hoff suivante :

$$-RT \ln K = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad \Rightarrow \quad \ln K = -\frac{\Delta H^0}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \frac{\Delta S^0}{R} \quad \text{Eq.24}$$

Ainsi, la représentation de la fonction  $\ln K = f(1/T)$  donne une droite de pente  $-\frac{\Delta H^0}{R}$  et d'ordonnée à l'origine  $\frac{\Delta S^0}{R}$ . A partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine, il est possible de déterminer la valeur des paramètres thermodynamiques  $\Delta H^0$  et  $\Delta S^0$ .

Cependant, la variation d'énergie libre  $\Delta G$  à différentes température peut être déterminée en utilisant la relation de Gibbs :

$$\frac{d}{dT} \left( \frac{\Delta G}{T} \right) = -\frac{\Delta H}{T^2} \quad \text{Eq.25}$$

En intégrant cette équation entre  $T_0$  et  $T$  on obtient la relation suivante :

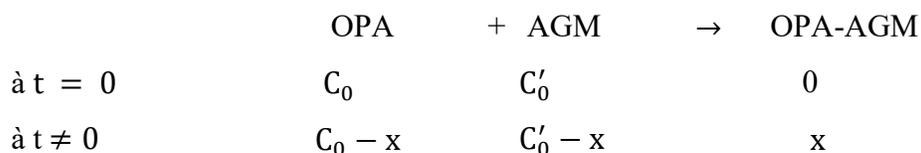
$$\Delta G = \Delta H - \frac{T}{T_0} \Delta H^0 + \frac{T}{T_0} \Delta G^0$$

Si dans cet intervalle de température  $\Delta H$  reste constante, c'est à dire  $\Delta H = \Delta H^0$  on peut déterminer  $\Delta G$  selon la relation :

$$\Delta G = \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) \Delta H^0 + \frac{T}{T_0} \Delta G^0 \quad \text{Eq.26}$$

### III.8 Méthode générale de détermination d'ordre d'une réaction chimique à deux réactifs

Soient deux composés OPA et AGM qui interagissent pour donner un complexe OPA-AGM fluorescent de stœchiométrie 1 :1 selon la réaction suivante :



La vitesse de cette réaction s'écrit :  $V = - \frac{d[\text{OPA}]}{dt} = - \frac{d[\text{AGM}]}{dt} = + \frac{d[\text{OPA-AGM}]}{dt}$ .

Si cette réaction admet une loi de vitesse on peut écrire :

$$V = K[\text{OPA}]^p[\text{AGM}]^q \Leftrightarrow - \frac{d[\text{AGM}]}{dt} = K[\text{OPA}]^p[\text{AGM}]^q \quad \text{Eq.27}$$

Dans cette relation,  $K$  représente la constante de vitesse,  $p$  et  $q$  sont respectivement les ordres partiels par rapport à l'OPA et à l'AGM et la somme  $p + q = n$  étant l'ordre global.

On sait par ailleurs que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration du fluorophore [8]. Si  $x$  représente la concentration du complexe à l'instant  $t$  et  $I_F$  son intensité de fluorescence en cet instant, on peut écrire :

$$I_F = 2,303\Phi_F I_0 \epsilon l x = h x \quad \text{avec} \quad h = 2,303\Phi_F I_0 \epsilon l = \text{cste.}$$

A un instant  $t \neq 0$ ,  $[\text{AGM}] = C = C_0 - x$

A la fin de la réaction  $C_0 - x = 0 \Leftrightarrow x = C_0$  et l'intensité maximale de fluorescence ( $I_{F_{\max}}$ ) du complexe peut s'écrire :  $I_{F_{\max}} = h C_0$ .

Ainsi, la concentration de l'AGM à l'instant t peut s'écrire :

$$C = C'_0 - x = C'_0 \left( \frac{I_{Fmax} - I_F}{I_{Fmax}} \right) \quad \text{Eq.28}$$

### III.8.1 Détermination de l'ordre global

Pour déterminer l'ordre global, il est plus commode d'utiliser à l'instant initial des concentrations équimolaires d'OPA et d'AGM. C'est à dire à  $t = 0$ ,  $C_0 = C_0$ . Dans ce cas à tout instant,  $[OPA] = [AGM] = C_0 - x = C$

L'équation 27 peut donc s'écrire :  $-\frac{dC}{dt} = KC^p C^q = KC^{p+q} = KC^n$  Eq.29

$$\Leftrightarrow -\frac{dC}{C^n} = K dt \quad \Leftrightarrow \int -\frac{dC}{C^n} = K \int dt + cte \quad \text{Eq.30}$$

On peut avoir deux cas possibles selon que  $n \neq 1$  ou  $n = 1$

#### Premier cas $n \neq 1$

Dans ce cas, la solution de l'équation 30 peut s'écrire :  $\frac{C^{1-n} - C_0^{1-n}}{n-1} = Kt$  Eq.31

$$\Leftrightarrow \frac{1}{(n-1)C_0^{n-1}} \left( \frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax} - I_F} \right)^{n-1} = Kt + \frac{1}{(n-1)C_0^{n-1}} \quad \text{Eq.32}$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{(n-1)C_0^{n-1}} \left[ \left( \frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax} - I_F} \right)^{n-1} - 1 \right] = Kt \quad \text{Eq.33}$$

Dans ces conditions, la vitesse initiale

$$V_0 = KC^n \quad \text{Eq.34}$$

Et le temps de demi-réaction s'écrit :

$$t_{1/2} = \frac{C_0^{1-n}}{K(n-1)} \left( \frac{1}{2^{1-n}} - 1 \right) \quad \text{Eq.35}$$

#### Deuxième cas $n = 1$

Si l'ordre global est égale à 1, l'équation 30 admet comme solution :  $\ln \frac{C_0}{C} = Kt$  . Eq.36

$$\Leftrightarrow \ln\left(\frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax}-I_F}\right) = Kt \quad \text{Eq.37}$$

Dans ce cas, la courbe  $\ln\frac{C_0}{C} = \ln\left(\frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax}-I_F}\right) = f(t)$  donne une droite de pente  $+K$  ; cette pente est donc égale à la constante de vitesse de la réaction. A partir de cette constante de vitesse  $K$  on peut déterminer la vitesse initiale  $V_0 = KC_0$  et le temps de demi-réaction  $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$ .

### II.8.2 Détermination de l'ordre partiel

Si on veut étudier l'ordre partiel par rapport à l'AGM, on utilise un grand excès d'OPA c'est-à-dire  $C_0 \gg C_0$  de telle sorte que  $C_0 - x \approx C_0$ . Ainsi, durant toute la réaction la concentration de l'OPA reste constante. Dans ce cas, la loi de vitesse peut donc s'écrire :

$$V = K[OPA]^p[AGM]^q = KC_0^p(C_0 - x)^q = K'C^q \quad \text{Eq.38}$$

avec  $K = KC_0^p = \text{constante}$ ,  $K$  est appelée constante de vitesse apparente d'ordre  $q$ .

$$V = -\frac{dC}{dt} = K'C^q \Leftrightarrow \frac{dC}{C^q} = -K'dt$$

$$\Leftrightarrow \int -\frac{dC}{C^q} = -K' \int dt + \text{cte.} \quad \text{Eq.39}$$

Il faut se rappeler qu'on peut avoir  $q \neq 1$  ou  $q = 1$

### Références

- [1] Job P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Annali di Chimica Applicata*, 9 (1928) 113-203.
- [2] Aich K., Goswami S., Das S. and Mukhopadhyay C.D. Supporting Information. A new ICT and CHEF based visible light excitable fluorescent probe easily detects “in vivo” Zn<sup>2+</sup>, the royal society of chemistry, (2015) 1-11.
- [3] Goswami S., Aich K., Das S., Mukhopadhyay C.D., Sarkar D. and Mondal T.K. A new visible light excitable ICT-CHEF mediated fluorescence „tum on“ probe for the selective detection of Cd<sup>2+</sup> in aqueous system with live-cell imaging. Royal Society of Chemistry, (2015) 1-14
- [4] Thompson M. Standard additions: myth and reality. *Analytical Methods Committe AMCTB*, 37 (2009).
- [5] Kelley W.D., Ratliff J., Thomas A., Nenadic C. *Basic Statistics For Laboratories: A Primer for Laboratory Workers*, (1992).
- [6] Wong J., Hao C., Zhang K., Yang P., Banerjee K., Hayward D., Oulkar D.P. Development and Interlaboratory Validation of a QuEChERS-Based Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Multiresidue Pesticide Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:10 (2010) 5897-5903. Doi: 10.1021/jf903849n.
- [7] Toussaint B., Chedin M., Bordin G., Rodriguez A.R. Determination of (fluoro) quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1088 (2005) 32-39. Doi : 10.1016/j.chroma.2005.02.057.
- [8] Brown S.C. and Poujol C. Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie. *La CNRS Formation : la Microscopie Confocale*, (2013) 1-37.

**PARTIE C :  
RÉSULTATS ET DISCUSSION**

**CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE**

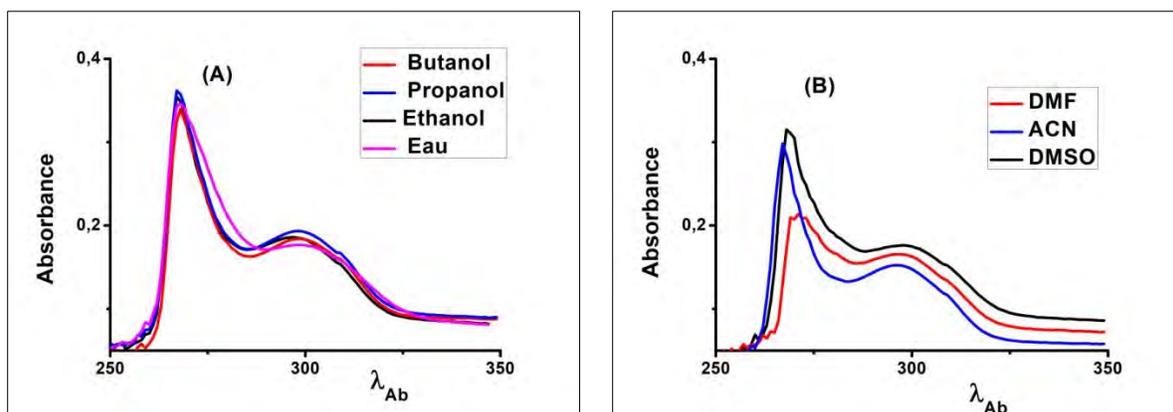
**IV.1 Étude préliminaire sur les spectres d'absorption de l'Orthophtalaldéhyde**

**IV.1.1 Etude d'absorption de l'Orthophtalaldéhyde dans différents solvants**

L'Orthophtalaldéhyde (OPA) est un marqueur fluorogénique utilisé comme réactif pour l'analyse des acides aminés, les pesticides, les amines biogènes etc [1-5]. Il est utilisé aussi comme désinfectant [6, 7].

Les spectres d'absorption de l'orthophtalaldéhyde sont formés de deux bandes dont les pics se situent respectivement vers 267 nm et 299 nm. Dans tous les solvants le coefficient d'extinction molaire est plus élevé au pic 267 nm. Nous n'avons noté aucun déplacement significatif des bandes dans tous ces solvants (Figure IV.1A) à l'exception de DMF où on note un petit déplacement bathochrome par rapport aux autres solvants (Figure IV.1B). Dans ces solvants il n'y a pas eu de modification significative de la forme des spectres. On peut observer tout de même des absorbances plus faibles dans les solvants aprotiques polaires (Tableau IV.1, Figure IV.1).

**CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE**



**Figure IV.1 :** Spectres d'absorption de l'OPA dans différents solvants polaires : protiques (A) et aprotiques (B) ( $[OPA]= 4.10^{-4}$  M) ; Diméthylformamide (DMF) ; Acétonitrile (ACN) Diméthylsulfoxyde (DMSO)

**Tableau IV.1:** Caractéristiques spectrale de l'OPA dans différents solvants

Solvants	Eau	Ethanol	Propanol	Butanol	DMSO	ACN	DMF
$\lambda_{Ab}$ (nm)	268/299	267/297	267/298	268/298	268/298	267/296	273/296
Absorbance	0,346/0,177	0,355/0,186	0,362/0,193	0,339/0,184	0,315/0,176	0,298/0,153	0,209/0,166

#### IV.1.2 Effet du pH sur les spectres d'absorption de l'OPA

La figure IV.2A représente les spectres d'absorption de l'OPA à différents pH. Comme précédemment les spectres présentent deux pics respectifs à 267 nm et 299 nm. Nous n'avons observé aucun déplacement significatif de bande ni de forme à différents pH. Cependant, l'absorbance diminue faiblement mais d'une manière régulière quand on passe des pH acides aux pH basiques jusqu'au pH 11 (Figure IV.2B). Cet effet est beaucoup plus remarqué pour le pic vers 267 nm. La courbe traçant l'absorbance du pic à 267 nm en fonction du pH est représentée par la figure IV.2B

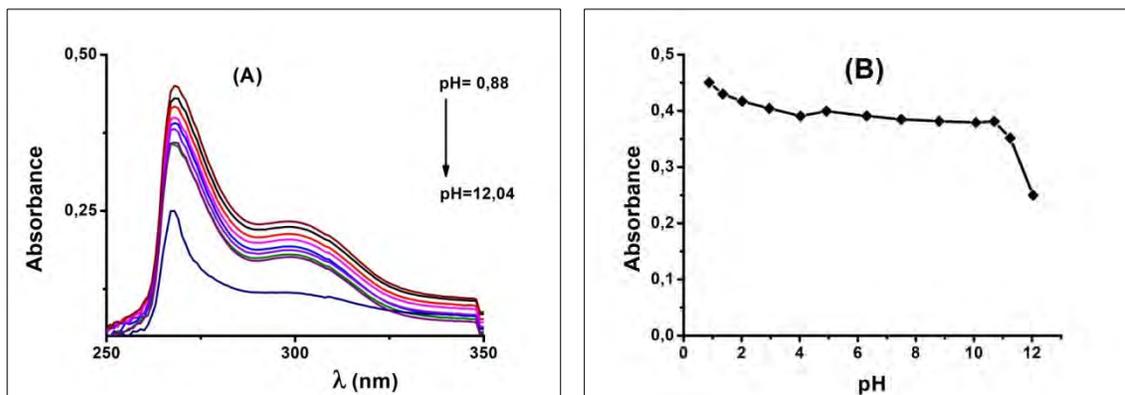


Figure IV.2 : Effet du pH sur les spectres d'absorption (A) et sur l'intensité d'absorbance (B) de l'OPA ( $[OPA] = 4 \cdot 10^{-4} M$ )

## IV.2 Étude du complexe OPA-AGM

### IV.2.1 Mise en évidence du complexe OPA-AGM

L'agmatine et même l'OPA absorbent faiblement dans le visible (Figure IV.3). Cependant, le mélange entre l'OPA et l'AGM donne un spectre d'absorption dont les maxima se situent vers 269 nm et 328 nm (Figure IV.4). On remarque que ce spectre (Figure IV.4a) est totalement différent de la somme des deux spectres d'absorption pris isolément (S1+S2) (Figure IV.4b). Ainsi, l'agmatine réagit avec l'OPA à l'état fondamental pour donner le complexe OPA-AGM qui absorbe dans l'UV. La figure IV.4 montre donc que dans l'eau, le spectre d'absorption du complexe OPA-AGM comprend deux bandes dont la plus large et plus intense correspond au pic à 328 nm et l'autre au pic à 269 nm, moins large.

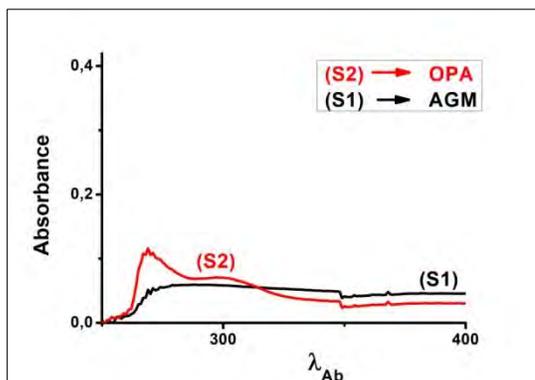


Figure IV.3 : Spectres d'absorption de l'AGM (S1) et de l'OPA (S2) dans l'eau déminéralisée

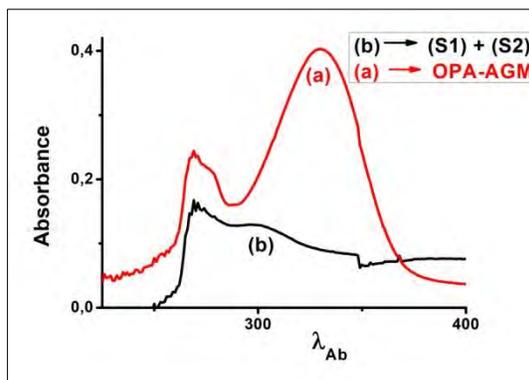
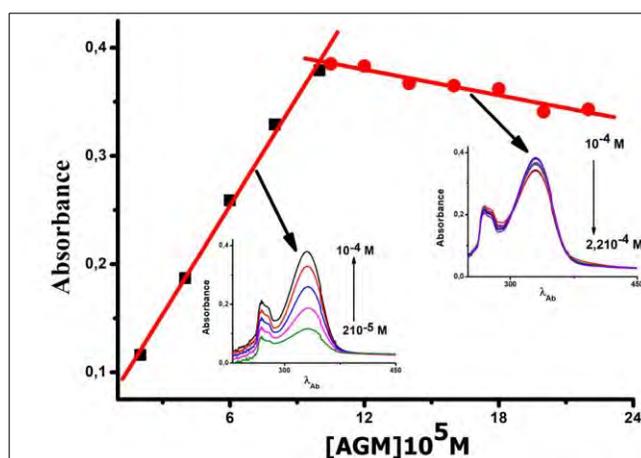


Figure IV.4 : Spectres d'absorption du complexe OPA-AGM (a) et (S1+S2) (b) dans l'eau déminéralisée

#### IV.2.2 Détermination de la stœchiométrie du complexe entre OPA et AGM

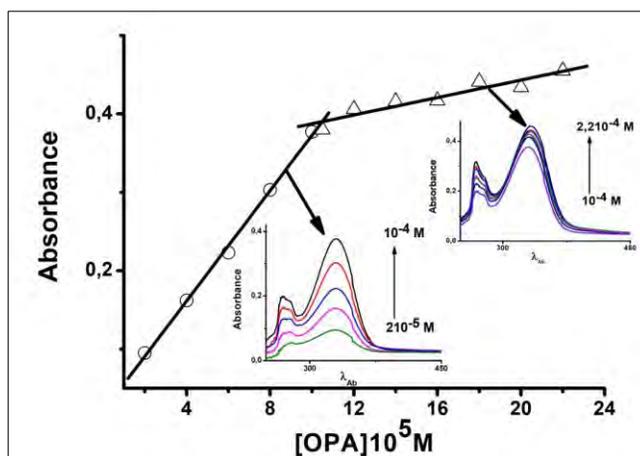
La stœchiométrie du complexe OPA-AGM a été étudiée en milieu aqueux (pH 11). En un premier temps, nous avons fixé la concentration d'OPA à  $10^{-4}$  M et fait varier celle de l'agmatine de  $2 \cdot 10^{-5}$  M à  $2 \cdot 10^{-4}$  M par ajout répétitifs. La figure IV.5 représente la variation de l'absorbance du complexe en fonction de la concentration de l'agmatine. Cette figure montre deux droites sécantes de pentes distinctes. La première droite de pente positive traduit la formation progressive du complexe. Le point d'intersection des deux droites correspond à la fin de la réaction. A ce point, la concentration de l'agmatine est égale à celle de l'OPA fixée ; ce qui indique que la stœchiométrie du complexe est de type 1:1. La seconde droite de pente négative traduit l'effet de l'agmatine sur l'absorption du complexe. Aussi, l'excès d'agmatine inhibe-t-il l'absorption du complexe. En réalité, aucun changement de forme ni de déplacement des longueurs d'absorption n'ont été constatés au cours de cette étude.

## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE



**Figure IV.5:** Evolution de l'absorbance du complexe OPA-AGM en fonction de la concentration de l'AGM ( $\lambda_{Ab} = 328$  nm)

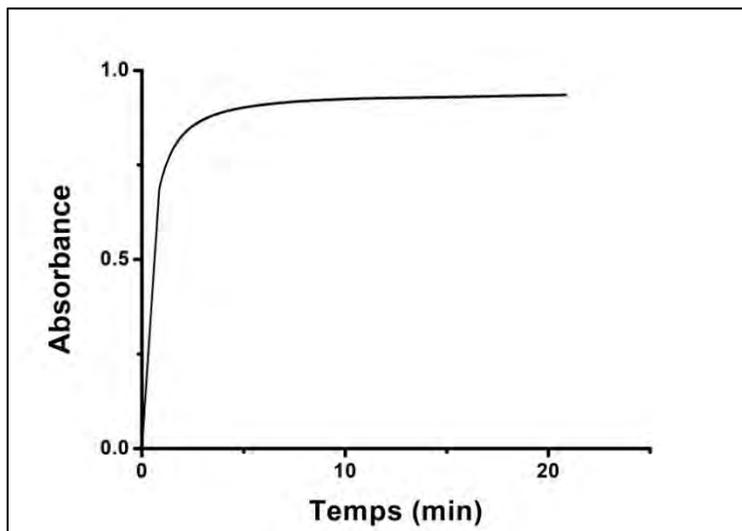
Pour vérifier la stœchiométrie du complexe OPA-AGM, une seconde expérience a été faite en fixant cette fois la concentration de l'AGM à  $10^{-4} M$  pour faire varier celle l'OPA de  $2 \cdot 10^{-5} M$  à  $2 \cdot 10^{-4} M$  (Figure IV.6). Cette figure montre deux droites sécantes de pente positives. La première droite de pente plus élevée correspond à la formation du complexe. Le point d'intersection des deux droites marque la fin de la formation du complexe, confirmant une stœchiométrie de type 1 :1. La seconde droite traduit l'effet de l'OPA sur le complexe qui exalte son absorption. Dans tous les cas, aucun changement de forme de spectres ni de déplacement de longueur d'onde n'ont été observés durant cette expérience.



**Figure IV.6:** Evolution de l'absorbance du complexe OPA-AGM en fonction de la concentration de l'OPA ( $\lambda_A = 328$  nm)

### IV.2.3 Etude de la stabilité du complexe OPA-AGM

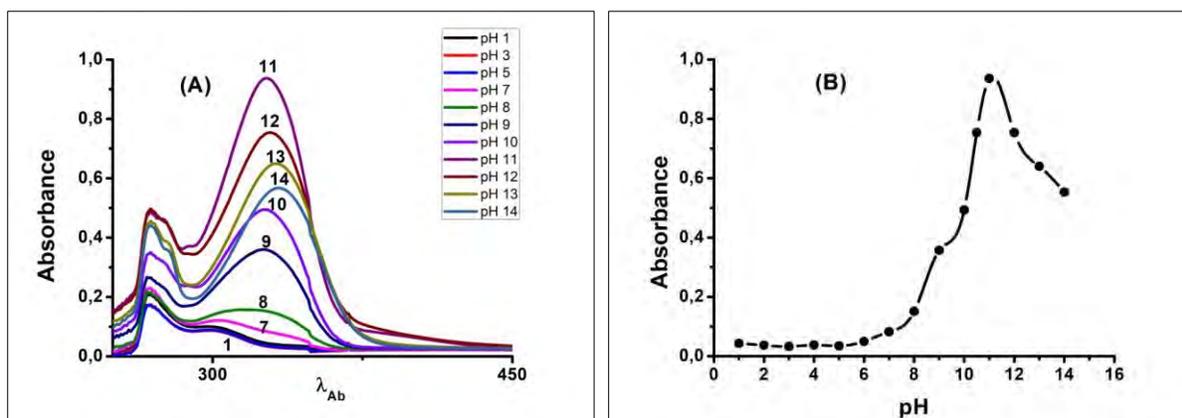
La stabilité du complexe OPA-AGM ( $18.10^{-5}M$ ) en milieu aqueux (pH 11) a été étudiée en suivant depuis le début du mélange l'évolution de son absorbance à 328 nm au cours du temps pendant 20 minutes. Le complexe formé entre l'OPA et l'agmatine commence à se stabiliser au bout de 5 minutes et à 20 minutes environ le complexe est entièrement stabilisé (Figure IV.7).



**Figure IV.7:** Evolution du signal d'absorption du complexe OPA-AGM en fonction du temps

#### IV.2.4 Effet du pH sur les spectres d'absorption du complexe OPA-AGM

Le pH est un facteur important qui peut affecter la structure d'une molécule en entraînant une délocalisation électronique avec un déplacement chimique des liaisons. Ce changement de structures peut aussi affecter le spectre d'absorption de la molécule soit en intensité soit en déplacement de longueur d'onde. Ainsi, pour étudier l'effet du pH sur l'absorption du complexe OPA-AGM nous avons mélangé au départ deux concentrations équimolaires  $2 \cdot 10^{-4}$  M d'OPA et d'AGM dans une gamme de pH (entre 1 et 14) donné. Pour chaque valeur de pH, nous avons enregistré les spectres d'absorption en notant l'absorbance du pic maximal (Figure IV.8A). Aucun changement de forme des spectres n'a été observé, sinon un faible déplacement de longueur d'onde des maxima d'absorption quand on passe de pH 11 à pH 14. A partir des maxima d'absorption à 328 nm, nous avons tracé la courbe de l'évolution de l'intensité d'absorption en fonction du pH. L'intensité d'absorbance augmente progressivement pour passer à un maximum à pH 11 (Figure IV.8B). Cette valeur de pH a alors été choisie pour la suite du travail.

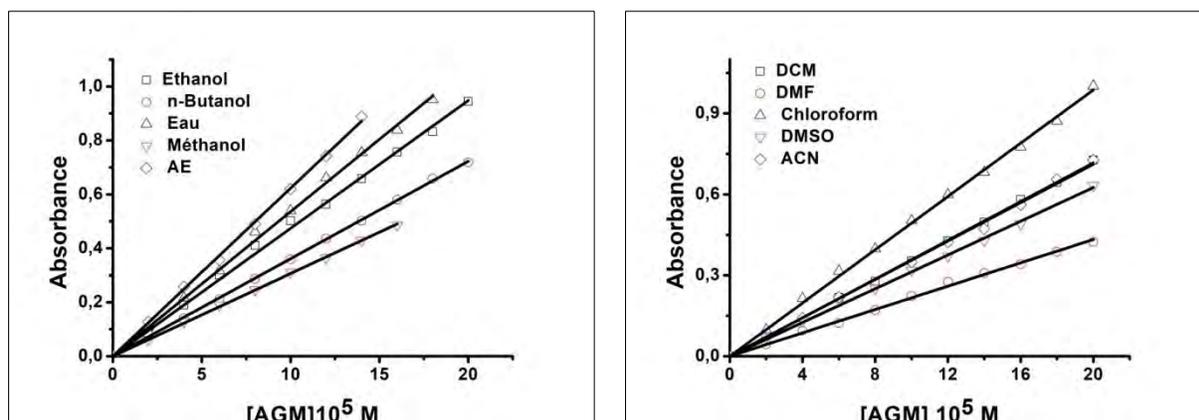


**Figure IV.8:** Effet du pH sur le spectre d'absorption (A) et sur l'intensité d'absorbance (B) du complexe OPA-AGM

#### IV.2.5 Droite de calibration dans différents solvant

Pour mieux valoriser l'intérêt de cette méthode par voie spectrophotométrique d'absorption, nous avons établi des droites de calibration du complexe OPA-AGM dans différents solvants et dans des conditions optimales (température ambiante, pH 11). Ceci nous a permis de déterminer les performances analytiques à savoir les limites de détection, les limites de quantification et la déviation relative standard en milieu aqueux et dans certains solvants organiques. Les droites de calibration ont été établies en traçant l'intensité d'absorbance en fonction de la concentration de l'agmatine (Figure IV.9). Pour l'ensemble des solvants nous avons noté une bonne linéarité des droites de calibration avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,999.

## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE



**Figure IV.9:** Droites de calibration du complexe OPA-AGM dans différents solvants Acétate d'éthyl (AE) ; Dichlorométhane (DCM) ; Diméthylformamide (DMF) ; Acétonitrile (ACN) ; Diméthylsulfoxyde (DMSO)

### IV.2.6 Détermination des performances analytiques

Nous avons déterminé les performances analytiques de la méthode dans différents solvants organiques et aqueux à partir des courbes d'étalonnage. Dans tous les solvants utilisés, nous avons noté une bonne linéarité sur une gamme de concentration allant de  $10^{-5}$  à  $2.10^{-4}$  M. Les différents coefficients de corrélations ( $r^2$ ) obtenus sont supérieurs à 0,999, proches de l'unité ; ce qui atteste la bonne précision des mesures (Figure IV.9). Les limites de détection et de quantification sont calculées respectivement à partir des équations 12 et 13 (chapitre III). Elles varient respectivement de  $0,10 \mu\text{g/mL}$  à  $2,785 \mu\text{g/mL}$  et de  $0,350 \mu\text{g/mL}$  à  $9,283 \mu\text{g/mL}$ . Ces faibles limites montrent ainsi la bonne sensibilité de la méthode. Les déviations relatives standards trouvées à partir de l'équation 16 (Chapitre III), sont comprises entre 1,486% et 5,280% dans tous les solvants étudiés. Ceci atteste la bonne reproductibilité de nos mesures. Tous ces résultats sont regroupés dans le tableau IV.2.

Ainsi, ces performances obtenues montrent que cette méthode peut être appliquée à l'analyse de l'agmatine dans différentes matrices. Cependant, cette méthode admet une limite importante car la plupart des amines biogènes en présence de l'OPA absorbent dans la même zone que le complexe OPA-AGM. Ceci implique des effets d'interférences très importants.

**CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE**

**Tableau IV.2:** Propriétés spectrales d'absorption UV-Visible et paramètres d'analyse du complexe OPA-AGM dans différents solvants

Solvants	$\lambda_A$ (nm)	Pentes des droites	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	DSR (%)
Eau	328	0,05359	0,9993	0,122	0,407	2,138
Méthanol	331	0,03064	0,9998	0,144	0,480	5,280
Ethanol	332	0,04740	0,9992	0,208	0,693	1,486
Butanol	333	0,03613	0,9999	0,275	0,917	3,595
Dichlorométhane	337	0,03591	0,9998	0,725	2,417	3,460
Acétate d'éthyle	334	0,06228	0,9996	0,392	1,307	2,420
Acétonitrile	335	0,03559	0,9992	0,105	0,350	2,617
Chloroforme	336	0,04936	0,9995	0,360	1,200	3,356
Diméthylformamide	338	0,02164	0,9992	2,785	9,283	2,320
Diméthylsulfoxyde	342	0,03128	0,9993	0,130	0,433	3,360

$\lambda_A$  : Longueur d'onde d'absorption ;  $r^2$  : coefficient de corrélation ; LOD : Limite de Détection ; LOQ : Limite de Quantification ; DSR : Déviation relative standard

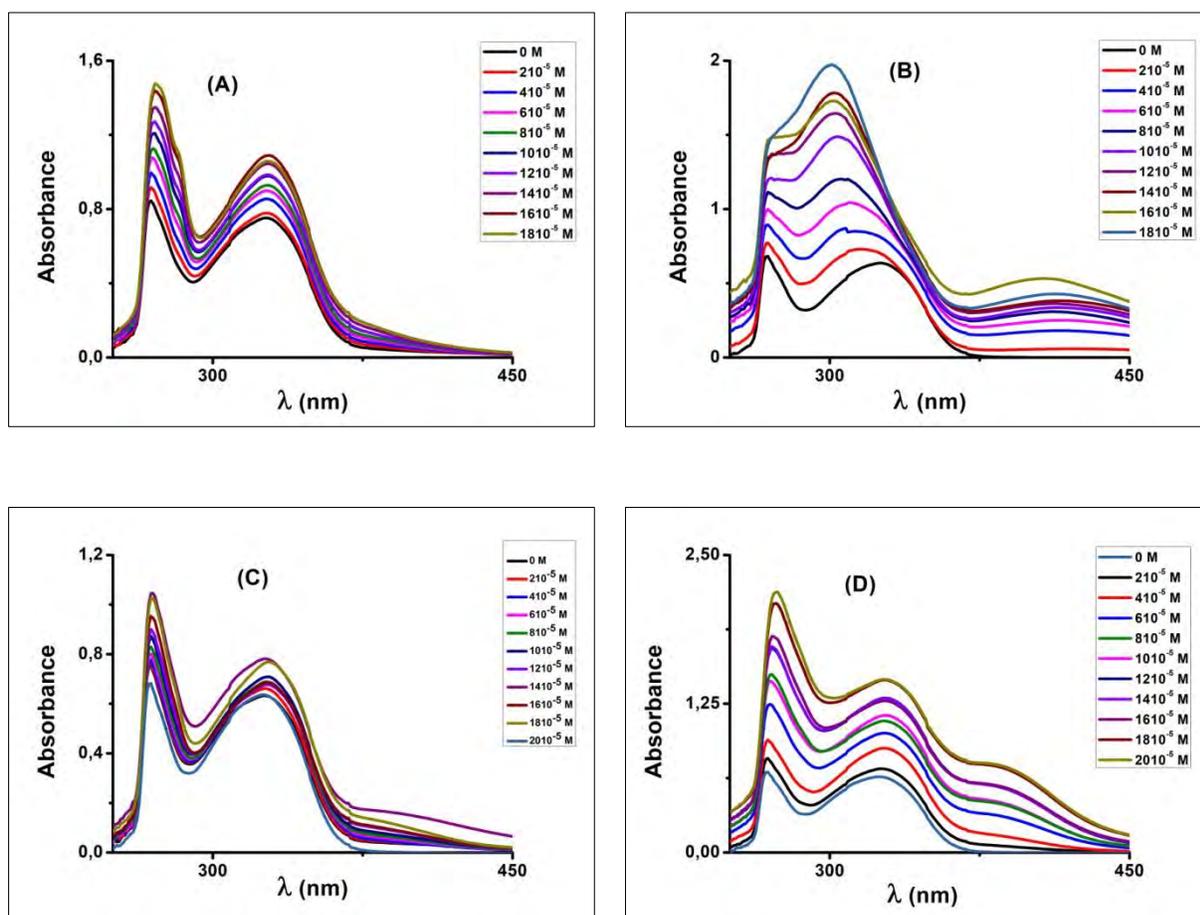
## IV.2.7 Etude d'interférence

### IV.2.7.1 Avec les amines biogènes

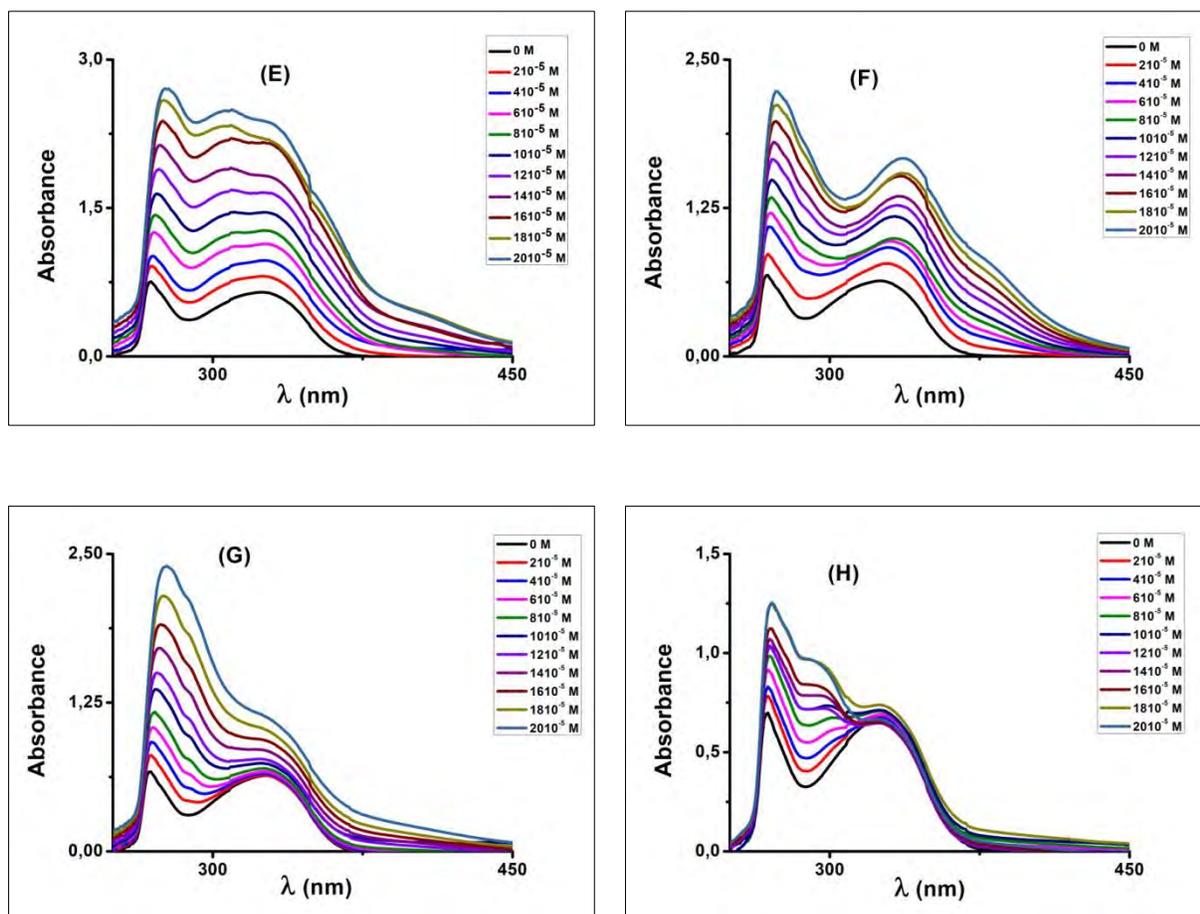
Nous avons étudié l'effet de certaines amines biogènes susceptibles d'interférer lors de la détermination de l'agmatine dans les aliments. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux amines biogènes (groupement d'amine primaire) telles que l'histamine, la spermidine, la cadavérine, la putrescine, la dopamine, la sérotonine, la tyramine et la tryptamine. En effet, ces amines sont présentes dans beaucoup d'aliments et ont la possibilité de se complexer avec l'OPA. C'est pourquoi dans cette étude, nous avons évalué respectivement l'effet des amines biogènes sur le spectre d'absorption du complexe OPA-AGM en présence d'un excès d'OPA ( $10^{-3}$  M). Pour ce faire, nous avons fixé la concentration de l'agmatine à  $1,2 \cdot 10^{-4}$  M, et fait varier celle de l'interférant à des concentrations comprises entre  $0,2 \cdot 10^{-4}$  M et  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Sur la figure IV.10, nous avons représenté les spectres d'absorption du complexe OPA-AGM en présence de différentes concentrations de l'interférant. Cette figure IV.10, montre respectivement que la

## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE

présence de ces amines : cadavérine, spermidine, putrescine, tyramine et histamine ne modifie pas d'une manière significative la forme du spectre du complexe OPA-AGM. En revanche, avec la dopamine, la sérotonine, et la tryptamine, on note une modification plus ou moins significative de la forme du spectre d'absorption du complexe (Figure IV.10).



## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE



**Figure IV.10:** Effet des interférants sur les spectres d'absorption du complexe OPA-AGM : Cadavérine (A), Dopamine (B), Histamine (C), Putrescine (D), sérotonine (E), Spermidine (F), Tryptamine (G), Tyramine (H)  $[OPA]=10^{-3}$  M ;  $[AGM]=12 \cdot 10^{-5}$  M

A partir des maxima de ces spectres aux environs de 328 nm, on a déterminé l'effet de chaque amine sur l'absorbance du complexe OPA-AGM (Figure IV.11). Cette figure montre qu'en général, l'absorbance du complexe OPA-AGM augmente progressivement en fonction de la concentration de l'amine ajoutée. Cette augmentation est beaucoup plus significative pour le cas de la sérotonine. En revanche, elle est moins importante pour le cas de la tyramine, de la tryptamine et de l'histamine.

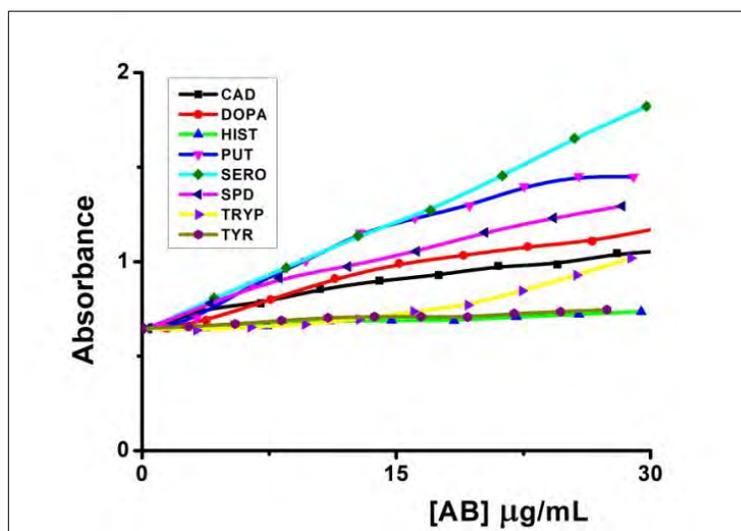


Figure IV.11: Effet des amines biogènes sur l'absorbance du complexe OPA-AGM

A partir de ces courbes on a pu déterminer les limites de tolérance pour chaque amine. Pour notre cas, on a défini la limite de tolérance comme étant la limite de concentration pour laquelle le pourcentage de la variation de l'absorbance du complexe OPA-AGM ne dépasse pas  $\pm 5\%$ .

A partir de l'équation 17 (Chapitre III) on peut alors écrire :

$$\Delta = \pm 5\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \Leftrightarrow \pm 5 = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Dans cette expression  $A_0$  est l'absorbance du complexe seul et  $A$  celle du complexe en présence de l'amine correspondante. Ainsi, il existe deux valeurs limites de  $A$  notées  $A_1$  et  $A_2$  correspondant à cette précision.

Si  $\Delta$  est positif, dans ce cas  $A$  est inférieur à  $A_0$  (extinction) on aura :  $A_1 = \frac{95A_0}{100}$

Si  $\Delta$  est négatif, dans ce cas  $A$  est supérieur à  $A_0$  (exaltation) on aura :  $A_2 = \frac{105A_0}{100}$

L'intersection de la courbe  $A = f([AB])$  avec les droites  $y = A_1$  ou  $y = A_2$  correspondent respectivement aux limites de tolérance  $x_1$  ou  $x_2$ . S'il n'existe pas d'intersection, l'amine n'est pas interférente sur le dosage de l'agmatine.

## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE

Dans cette partie, nous avons développé plus en détail le cas de la sérotonine. Avec  $A_0$  égale à 0,646, le calcul de  $A_1$  et de  $A_2$  donne respectivement les valeurs 0,6137 et 0,6783. Dans notre cas, la courbe  $A=f([SERO])$  (Figure IV.12) ne coupe pas la droite  $y = A_1$  donc pas de limite, en effet la sérotonine exalte l'absorbance du complexe OPA-AGM. Cependant, avec  $\Delta$  négatif la courbe  $A=f([SERO])$  (Figure IV.12) coupe la droite  $y = A_2$  au point d'abscisse  $x_2$  correspondant à la limite de tolérance (LT). Le graphe montre que cette limite de tolérance est égale à  $1,267 \mu\text{g/mL}$ . Cette faible valeur montre que la sérotonine interfère beaucoup avec l'agmatine. Par ailleurs, avec une concentration de l'agmatine fixée à  $27,392 \mu\text{g/mL}$ , la limite de tolérance de la sérotonine représente un taux massique de 4,625% par rapport à l'agmatine. Ainsi, le taux massique de sérotonine par rapport à l'agmatine ne doit pas dépasser 4,625% en masse pour doser avec précision l'agmatine dans un échantillon. Le même procédé a été fait pour les autres amines. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le tableau IV.3.

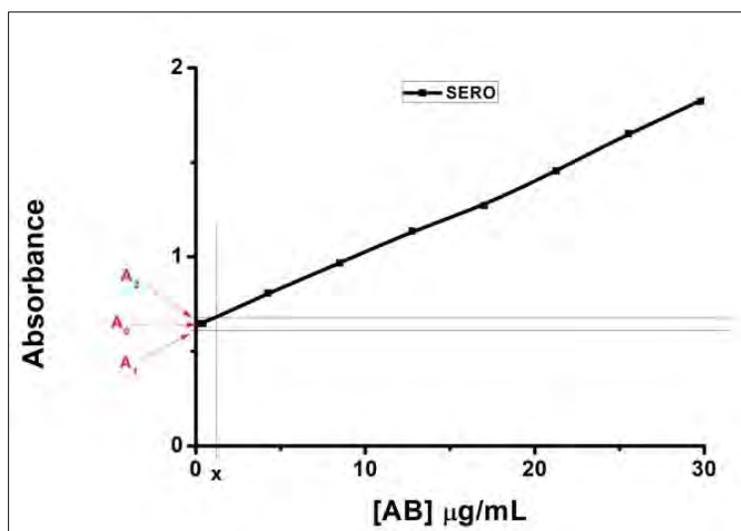


Figure IV. 12: Effet de la sérotonine sur l'absorbance du complexe OPA-AGM

**CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE**

**Tableau IV.3:** Valeurs des limites de tolérances des amines biogène ajoutées

Amines biogènes	Gamme de concentration testée ( $\mu\text{g/mL}$ )	Limite de tolérance ( $\mu\text{g/mL}$ )	* $\tau$ (% <i>massique</i> )
Tryptamine	3,204 - 28,840	15,591	56,918
Histamine	3,681 - 29,4512	12,656	46,203
Tyramine	3,204 - 27,436	11,299	41,249
Dopamine	1,517 - 26,5496	4,075	14,877
Putrescine	1,289 - 28,993	3,349	10,222
Cadavérine	1,401 - 28,016	2,111	7,706
Spermidine	0,509 - 28,328	1,497	5,465
Sérotonine	0,425 - 29,775	1,267	4,625

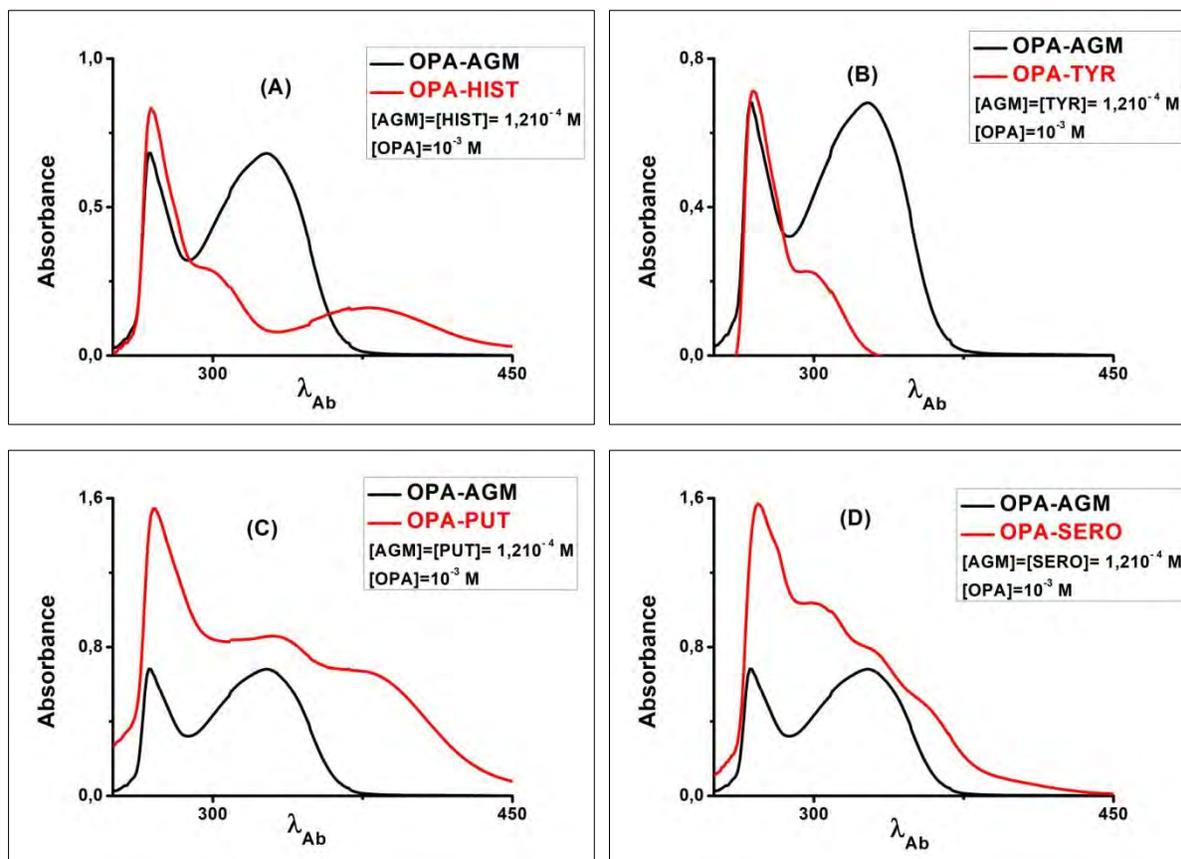
\*  $\tau$  (% *massique*) =  $\frac{[AB]}{[AGM]_0} \cdot 100$       Concentration de l'agmatine fixée égale à 27,392  $\mu\text{g/mL}$

Compte tenu des limites de tolérance ou de taux massiques par rapport à l'agmatine, ce tableau montre qu'en absorption, la sérotonine interfère plus dans le dosage de l'agmatine suivie de la spermidine puis de la cadavérine, de la putrescine et en fin de la dopamine. Pour les amines biogènes à savoir la tyramine, l'histamine et la tryptamine on note moins d'interférence dans le dosage de l'agmatine du moins en absorption.

Cette différence notée sur les limites de tolérance ou des taux massiques d'une amine à l'autre peut s'expliquer par le recouvrement des bandes d'absorption vers les 328 nm des complexes OPA-AGM avec autre amine en présence d'OPA. Par exemple, la figure IV.13A et la figure IV.13B montrent un faible recouvrement des bandes d'absorption vers les 328 nm. Ces faibles recouvrements expliquent pourquoi l'histamine et la tyramine interfèrent faiblement en absorption avec des taux massiques très élevés. En revanche, on note un fort recouvrement de la bande d'absorption vers 328 nm des complexes OPA-AGM et OPA-PUT (Figure IV.13C). De même sur la figure IV.13D, un quasi recouvrement des bandes situées vers 328 nm entre les complexes OPA-AGM et OPA-SERO est observé. Le même phénomène est noté pour la spermidine. Ceci explique donc les faibles limites de tolérance ou taux massiques obtenus

## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE

respectivement pour les cas de la sérotonine, de la spermidine, de la putrescine et de la cadavérine. Aussi, ces dernières amines sont-elles largement interférantes. C'est pourquoi, il est difficile d'analyser l'agmatine en absorption avec une grande précision dans des matrices contenant ces amines biogènes (sérotonine, putrescine, spermidine et la cadavérine).



**Figure IV.13:** Comparaison de la bande d'absorption du complexe OPA-AGM avec les autres complexes OPA-amine vers 328 nm : (A) OPA-AGM et OPA-HIST ; (B) OPA-AGM et OPA-TYR ; (C) OPA-AGM et OPA-PUT et (D) OPA-AGM et OPA-SERO

#### IV.2.7.2 Interférence avec les sels

La plupart des sels susceptibles d'être présents dans les matrices alimentaires et biologiques sont :  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  et  $\text{FeCl}_2$ . C'est pourquoi, leurs influences sur l'absorption du complexe OPA-AGM à la longueur d'onde de 328 nm ont été étudiées. Ceci nous permet de déterminer la limite de tolérance pour chaque sel (Tableau IV.4). Ces limites de tolérances sont calculées de la même manière que celles des amines biogènes.

Ce tableau montre que les sels de  $\text{MgSO}_4$  et de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  n'interfèrent pas avec l'agmatine en absorption sur toute la gamme de concentration utilisée. Ils n'ont donc aucune influence sur le dosage de l'agmatine, du moins sur la gamme utilisée. Ceci s'explique par le fait qu'aucune valeur de l'absorbance correspondant à la précision de  $\pm 5\%$  n'a été trouvée sur la courbe représentant l'intensité de l'absorption en fonction de la concentration de ces deux sels (Figure IV.14). Sur ce schéma,  $A_0$  est l'absorbance du complexe en l'absence de sel,  $A_1$  est l'absorbance calculée avec la précision de +5% et  $A_2$  celle calculée avec la précision de -5%.

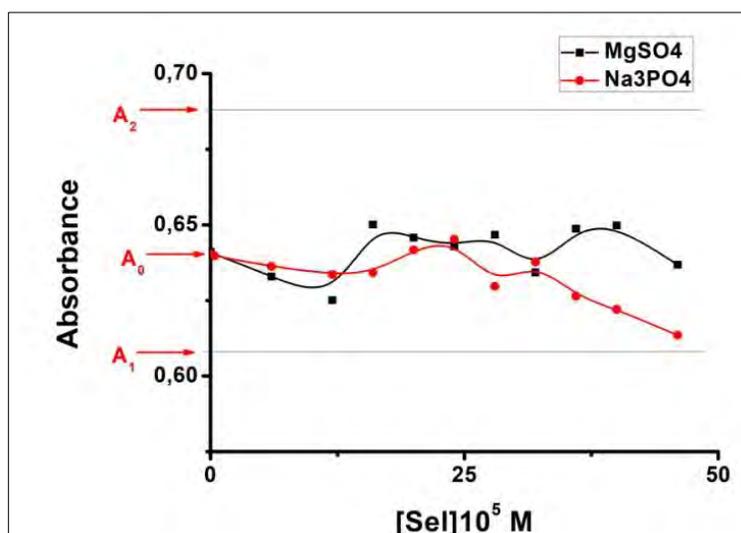


Figure IV.14: Effet de  $\text{MgSO}_4$  et  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  sur l'absorbance du complexe OPA-AGM

## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE

Cependant, pour le sel  $\text{CaCl}_2$ , l'absorbance correspondant à la précision de -5% ( $A_2$ ) n'a aucun point d'intersection avec la courbe représentant la variation d'absorbance du pic maximal en fonction de la concentration du sel. Cependant, avec la précision de +5%, la droite  $y=A_1$  coupe cette courbe en deux points correspondant aux concentrations respectives  $x_1$  et  $x_2$  du sel qui sont des limites de tolérance pour  $\text{CaCl}_2$ . Sur la courbe, les valeurs de  $x_1$  et  $x_2$  sont respectivement égales à 2,32  $\mu\text{g/mL}$  et 19,54  $\mu\text{g/mL}$  (Figure IV.15). En tenant compte de l'allure de cette courbe et de ces valeurs  $x_1$  et  $x_2$  on peut obtenir une précision de moins de 5% uniquement pour des intervalles de concentrations  $C < x_1$  et  $C > x_2$ . En revanche, pour des concentrations comprises entre  $x_1$  et  $x_2$  la précision de mesure dépasse 5%. On peut tout de même mesurer le taux d'agmatine entre  $x_1$  et  $x_2$  mais avec une précision supérieure à 5%.

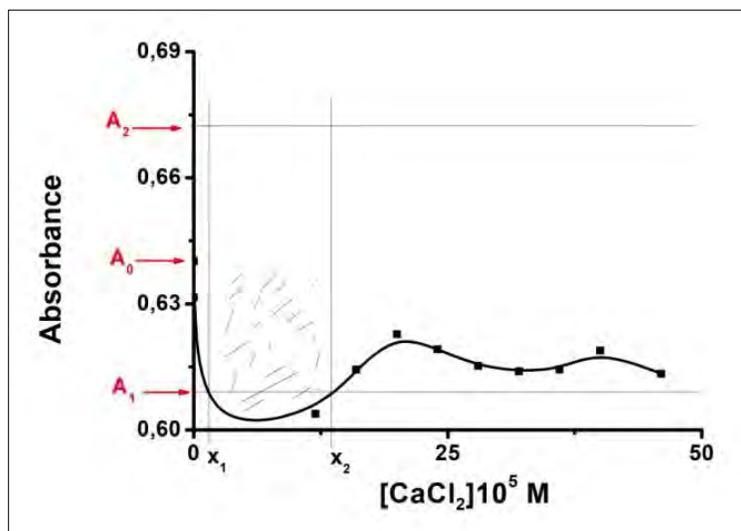


Figure IV.15: Effet de  $\text{CaCl}_2$  sur l'absorbance du complexe OPA-AGM

Pour le cas de  $\text{FeCl}_2$ , la figure IV.16 montre une certaine particularité de l'effet de sa concentration sur l'absorbance du complexe OPA-AGM. En effet, on note une exaltation de l'absorbance du complexe sous l'effet de  $\text{FeCl}_2$ . Cette exaltation passe par un maximum à la concentration du sel égale à 9,63  $\mu\text{g/mL}$ . Ainsi, compte tenu de l'allure de cette courbe, on trouve deux valeurs pour avoir une précision de -5% du résultat du dosage de l'agmatine en présence de

## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE

ce sel : une première valeur calculée à partir de la branche montante et une seconde valeur sur la branche descendante. En considérant la concentration initiale de l'agmatine à 27,39  $\mu\text{g/mL}$ , pour avoir une précision plus petite que  $\pm 5\%$  sur les résultats du dosage, il faut et il suffit : d'une part que la concentration de  $\text{FeCl}_2$  dans l'échantillon soit inférieure à 9,63  $\mu\text{g/mL}$  et d'autre part qu'elle soit supérieure à 113,37  $\mu\text{g/mL}$ . Ainsi dans la limite de l'absorbance, pour doser un échantillon d'agmatine contenant une certaine quantité de sel  $\text{FeCl}_2$ , on obtient une précision de  $\pm 5\%$  de la valeur trouvée si le pourcentage massique de  $\text{FeCl}_2$  par rapport à l'agmatine est d'une part inférieure à 35% et d'autre part supérieur à 414 % ; entre ces deux valeurs on sort de la précision de  $\pm 5\%$ . Cependant, pour  $\text{FeCl}_2$ , nous avons tenu compte uniquement que de la concentration inférieure à 9,63  $\mu\text{g/mL}$ . En effet, au-delà de cette valeur limite, la bande d'absorption du complexe OPA-AGM disparaît.

Ainsi, pour doser l'agmatine en présence de  $\text{FeCl}_2$  avec une précision au moins de 5%, il faut se situer dans la zone numéro 1 (Figure IV.16) c'est-à-dire avec une proportion molaire entre  $\text{FeCl}_2$  et agmatine inférieure à 35 %.

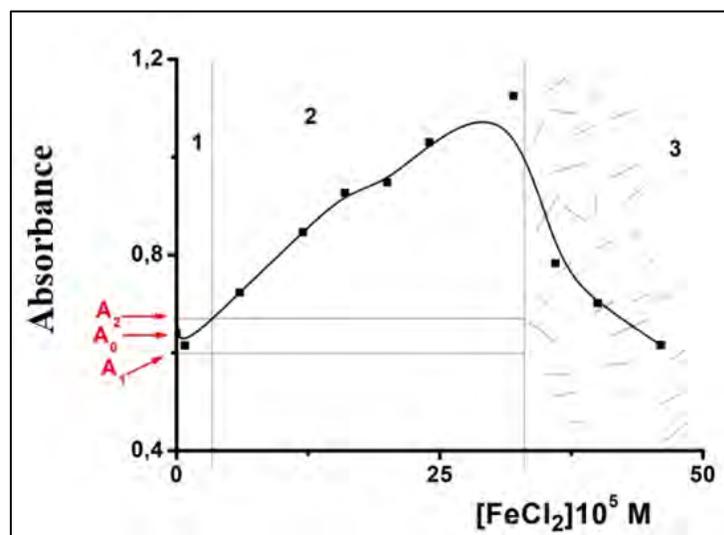
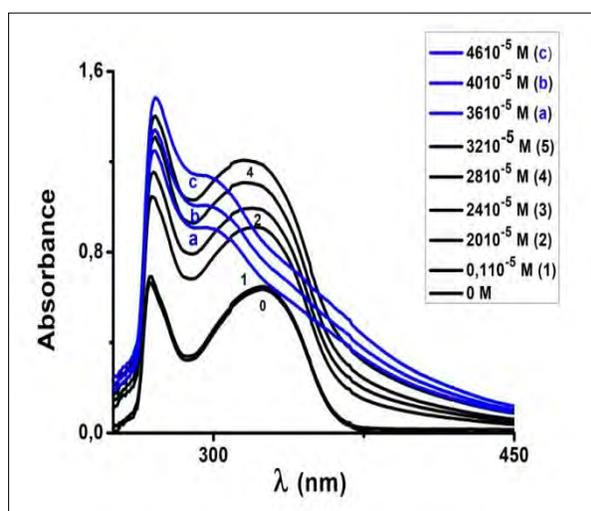


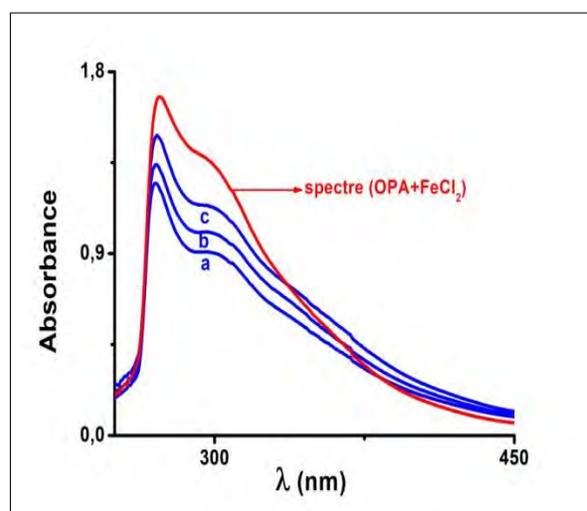
Figure IV.16: Effet de  $\text{FeCl}_2$  sur l'absorbance du complexe OPA-AGM

## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE

En réalité, l'effet de  $\text{FeCl}_2$  sur l'absorbance du complexe OPA-AGM comprend deux phases : une phase d'exaltation de l'absorbance du complexe et une phase d'inhibition au-delà de  $32 \cdot 10^{-5}$  M de  $\text{FeCl}_2$ . Cela est dû soit à un quenching soit à une disparition du complexe (Figure IV.17). En fait, la forme du spectre du complexe ne change pas jusqu'à la concentration de  $\text{FeCl}_2$  égale à  $32 \cdot 10^{-5}$  M (voir spectres 1, 2, 3, 4, 5 de la Figure IV.17). Au-delà de cette concentration, la forme de la bande à 328 nm disparaît pour donner un autre type de spectre (voir spectres a, b, c de la Figure IV.17) ; dans ce cas, il ne s'agit pas d'un quenching. On peut remarquer qu'au-delà de cette concentration limite, les spectres d'absorption obtenus ont la même forme que le spectre d'absorption du mélange entre OPA et  $\text{FeCl}_2$  (Figure IV.18). Dans ce cas, on peut dire qu'au-delà de cette concentration limite de  $\text{FeCl}_2$ , ce sel rompt les liaisons entre l'OPA et l'AGM et fait donc disparaître le complexe.



**Figure IV.17:** Effet de  $\text{FeCl}_2$  sur le spectre d'absorption du complexe OPA-AGM

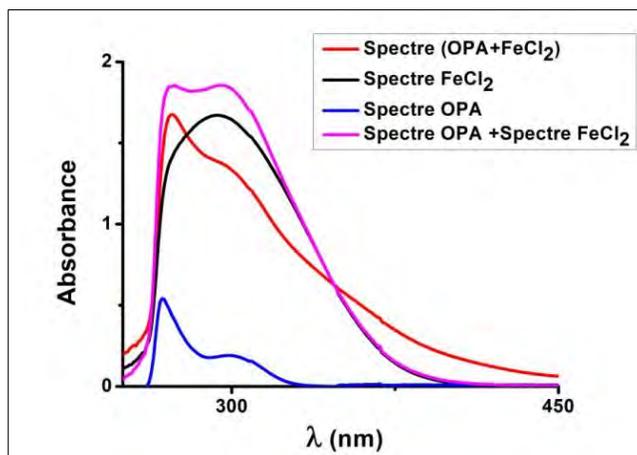


**Figure IV.18:** Comparaison des spectres absorption a, b et c avec celui du mélange OPA et  $\text{FeCl}_2$

Ainsi, on peut donc se poser la question si OPA et  $\text{FeCl}_2$  sont liés. Pour cela dans la figure IV.19, nous représentons respectivement le spectre de l'OPA, le spectre de  $\text{FeCl}_2$  et l'addition des deux spectres. La comparaison de la somme des deux spectres avec le spectre du mélange OPA et  $\text{FeCl}_2$  montre une nette différence. Ceci prouve que l'OPA et le  $\text{FeCl}_2$  sont bien liés dans le mélange. L'ensemble de toutes ces liaisons dans le mélange engendre des agrégats. Tout ceci se

## CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE

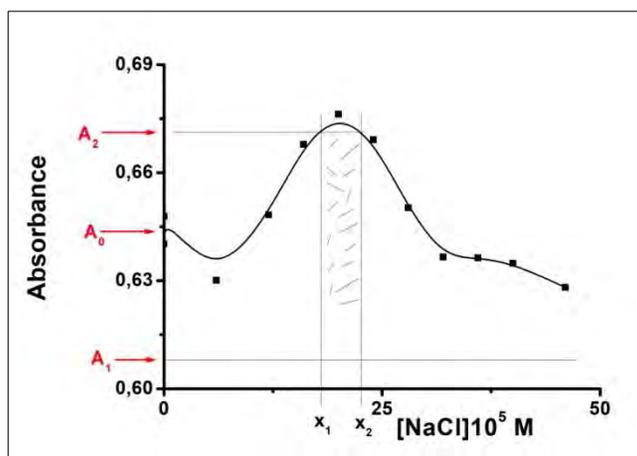
traduit par la formation d'une large bande d'absorption entre 275 nm et 450 nm que l'on observe dans la figure IV.17 et la figure IV.19.



**Figure IV.19:** Comparaison du spectre (OPA+FeCl<sub>2</sub>) avec la somme (spectre OPA + spectre de FeCl<sub>2</sub>)

Concernant le sel NaCl, seule la précision -5% correspondant à  $A_2$  est prise en compte. Également la projection de la droite  $y=A_2$  coupe la courbe en deux points correspondant à  $x_1$  et  $x_2$  (Figure IV.20). Ces valeurs de  $x_1$  et  $x_2$  qui sont respectivement égales à 10,44  $\mu\text{g/mL}$  et 12,97  $\mu\text{g/mL}$  correspondent aux concentrations limites de NaCl. Ainsi, pour des concentrations de NaCl inférieures à 10,44  $\mu\text{g/mL}$  ou supérieures à 12,97  $\mu\text{g/mL}$ , on peut doser l'agmatine avec une précision au moins de 5%. Entre les deux concentrations on peut toujours doser l'agmatine mais avec une précision supérieure à 5%. Compte tenu des concentrations utilisées on peut doser l'agmatine en présence de NaCl avec une précision inférieure ou égale à 5% si le taux de NaCl par rapport à l'agmatine est inférieur à 38,11% ou supérieur à 47,35%. Entre ces deux valeurs, la précision sera supérieure à 5%.

**CHAPITRE IV : ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE D'ABSORPTION UV-VISIBLE DU COMPLEXE ORTOPHTALALDÉHYDE-AGMATINE**



**Figure IV.20:** Effet de NaCl sur l'absorbance du complexe OPA-AGM

**Tableau IV.4:** Valeurs des limites de tolérances et taux massique par rapport à l'agmatine des sels ajoutés

Sels	Gamme de concentration testée ( $\mu\text{g/mL}$ )	LT ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\tau$ (% <i>massique</i> ) *
CaCl <sub>2</sub> (Ca <sup>2+</sup> , 2Cl <sup>-</sup> )	0,0147-67,62	2,32-19,54	8,47-71,33
FeCl <sub>2</sub> (Fe <sup>2+</sup> , 2Cl <sup>-</sup> )	0,027-124,2	9,63-113,37	35,16-413,88
MgSO <sub>4</sub> (Mg <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	0,0171-78,66	$\infty$	$\infty$
NaCl (Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> )	0,0058-26,68	10,44-12,97	38,11-47,35
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (3Na <sup>+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	0,664-76,36	$\infty$	$\infty$

\*  $\tau$  (% *massique*) =  $\frac{[Sel]}{[AGM]_0} \cdot 100$  Concentration d'agmatine fixée égale 27,392  $\mu\text{g/mL}$

CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE  
SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

V.1 Caractéristiques spectrales du complexe OPA-AGM

Pour déterminer les longueurs d'onde d'excitation ( $E_x$ ) et d'émission ( $E_m$ ) du complexe OPA-AGM, on a mélangé deux solutions équimolaires d'OPA et d'AGM de concentration  $4.10^{-6}$  M dans l'eau déminéralisée. Le balayage dans la gamme de longueur d'onde UV-Visible, nous a permis d'obtenir le spectre 3D qui est représenté sur la figure V.1A. L'examen de ce spectre 3D nous montre l'existence de deux spectres d'excitation et d'émission. Le spectre d'excitation comprend deux bandes de pics respectifs à 230 nm (plus intense) et à 333nm (moins intense). Cependant, le spectre d'émission comprend une seule bande de pic situé à 473 nm. Les spectres 2D confirment ces valeurs trouvées (Figure V.1B).

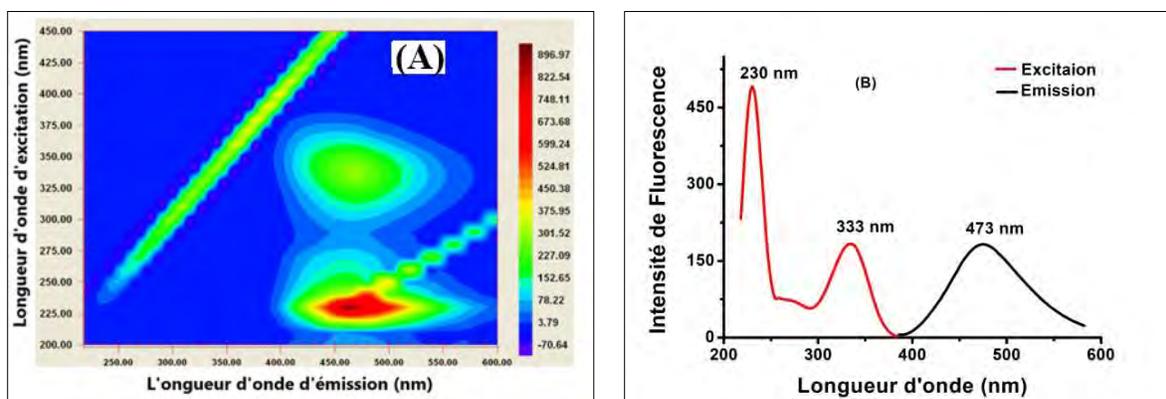


Figure V.1: Spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM: 3D (A) et 2D (B)

## **V.2 Détermination des paramètres analytiques optimaux**

Pour rendre le processus beaucoup plus efficace, nous avons procédé à la détermination des paramètres analytiques optimaux que sont : la stœchiométrie du complexe, les effets de pH, de l'agitation et du chauffage sur les spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM.

### **V.2.1 Détermination de la stœchiométrie du complexe OPA-Agmatine**

#### **V.2.1.1 Détermination de la stœchiométrie par la méthode des réactifs limitants**

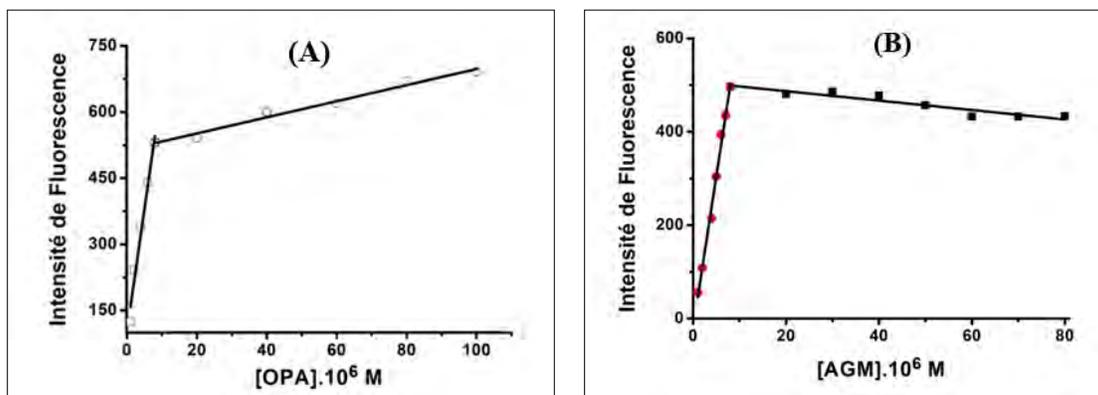
Avant de quantifier le taux d'agmatine par la méthode spectrofluorimétrique, nous nous sommes proposés tout d'abord d'étudier la stœchiométrie de la réaction entre l'OPA et l'agmatine. Pour ce faire nous avons appliqué la méthode des réactifs limitants (dosage répétitif). Cette méthode consiste à fixer la concentration de l'un des réactifs et à faire varier l'autre. On observe une droite de pente positive correspondant à la formation du complexe. A la fin de la réaction tout ajout supplémentaire correspond à une autre forme de droite dont la pente peut être nulle, positive ou négative. La stœchiométrie du complexe est déterminée à partir du point sécant des deux droites.

Dans notre cas, nous avons fixé la concentration de l'agmatine à  $8 \cdot 10^{-6}$  M et fait varier celle de l'OPA entre  $10^{-6}$  M et  $10^{-4}$  M (Figure V.2A). La figure V.2A montre deux droites de pentes différentes dont le point sécant correspond à la fin de la formation du complexe. A ce point, le nombre de mole d'OPA versé est égal au nombre de mole d'AGM initial. Ce résultat montre qu'une molécule d'OPA réagit avec une molécule d'agmatine. Ainsi la stœchiométrie du complexe OPA-AGM est de type 1:1. Après la formation du complexe, on note que l'excès d'OPA entraîne une exaltation de son signal de fluorescence (Figure V.2A).

Inversement, en fixant la concentration de l'OPA (Figure V.2B) et en faisant varier celle de l'agmatine, on obtient également deux droites dont la première, de pente positive correspond à la formation et du complexe et l'autre, de pente négative correspondant à l'effet de l'agmatine sur le complexe formé. Là aussi le point d'interception des deux droites montre que la stœchiométrie

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

est de type 1 :1. En revanche la figure V.2B montre que l'excès d'agmatine inhibe légèrement la fluorescence du complexe OPA-AGM.



**Figure V.2:** Variation de l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM en fonction de la concentration : (A) OPA et (B) AGM

### V.2.1.2 Détermination de la stœchiométrie par la méthode de JOB

Pour la détermination de la stœchiométrie du complexe OPA-AGM, nous avons utilisé la méthode de Job décrit dans le chapitre III (partie expérimentale). Sur la figure V.3 nous représentons la courbe de Job. Dans notre cas  $r_i$  représente le taux d'OPA au point  $i$ . Cette figure montre une courbe en forme de cloche centrée au tour de l'abscisse  $r$  égale à 0,5. A cette valeur de  $r$ , la concentration de l'OPA est égale à celle de l'agmatine. Ceci montre que la stœchiométrie du complexe OPA-AGM est bien de type 1 :1. Ceci confirme les résultats trouvés avec la méthode des réactifs limitants.

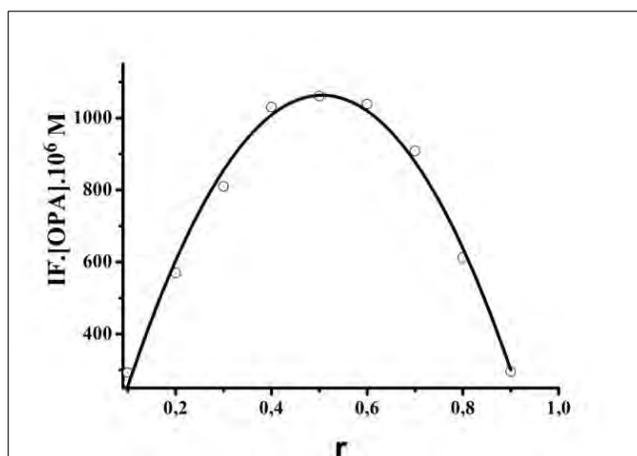


Figure V.3: Courbe de Job

### V.2.1.3 Détermination de la stœchiométrie par la méthode de Benesi-Hildebrand

Pour déterminer la stœchiométrie du complexe OPA-AGM à 298 K, nous avons utilisé l'équation de Benesi-Hildebrand (chapitre III). Les graphes typiques de la double représentation de la fonction  $\frac{1}{I_F - I_{Fmin}}$  en fonction de  $\frac{1}{[OPA]^2}$  puis en fonction de  $\frac{1}{[OPA]}$  sont enregistrés sur la figure V.4. Le graphe de la fonction  $\frac{1}{I_F - I_{Fmin}} = f\left(\frac{1}{[OPA]^2}\right)$  donne une courbe non linéaire (Figure V.4.B). Donc la stœchiométrie du complexe ne peut être de type 2 : 1. En revanche, celui de la fonction  $\frac{1}{I_F - I_{Fmin}} = f\left(\frac{1}{[OPA]}\right)$  (Figure V.4.A) donne une courbe linéaire avec un coefficient de corrélations plus grand que 0,999, proche de l'unité. Ainsi, la stœchiométrie du complexe entre l'OPA et l'AGM est bien de type 1 : 1 confirmant les résultats obtenus précédemment.

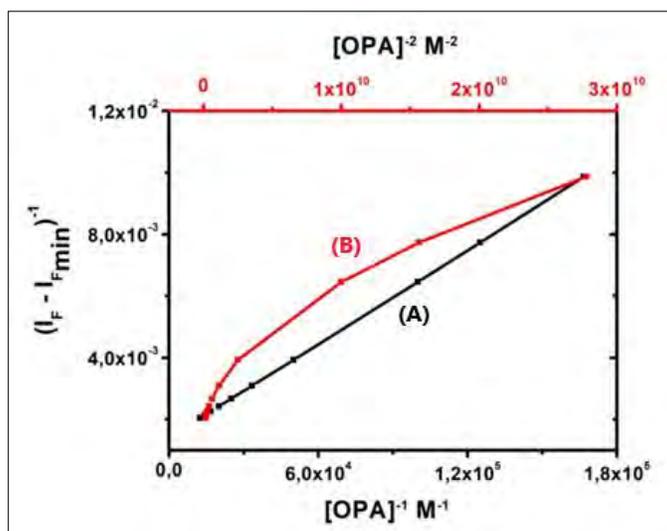
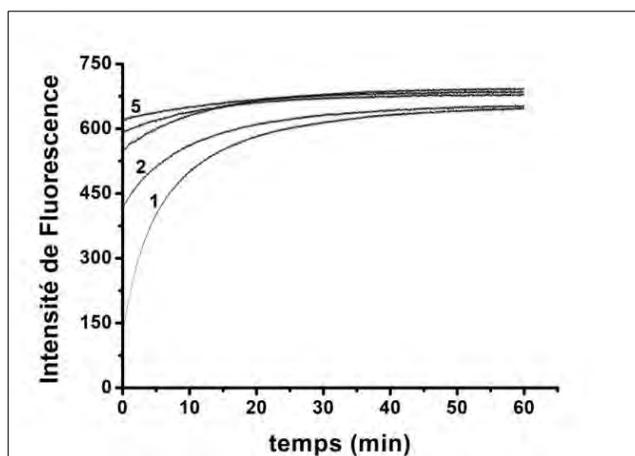


Figure V.4: Graphes de la double représentation de Benesi-Hildebrand

## V.2.2 Optimisation du spectre de fluorescence du complexe OPA-AGM

### V.2.2.1 Effet de l'agitation sur la fluorescence du complexe OPA-AGM

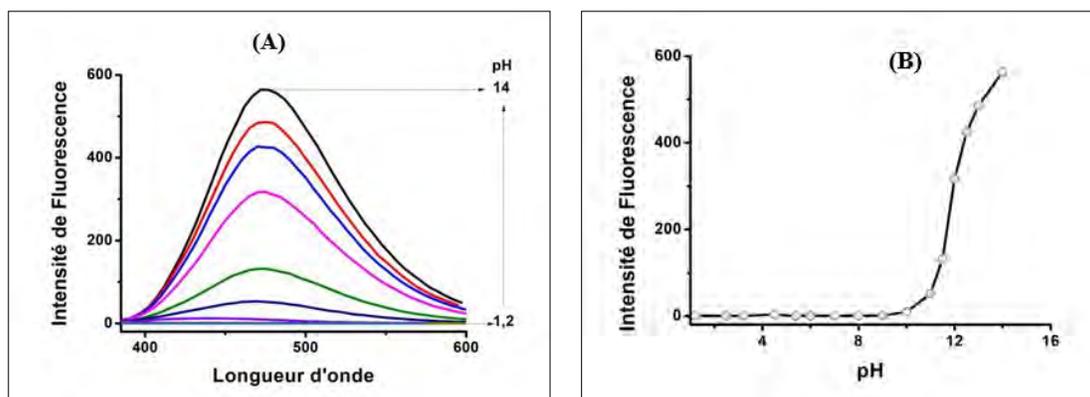
La formation du complexe OPA-AGM étant un processus lent, nous avons cru devoir étudier l'effet d'agitation sur sa cinétique de formation. Pour cela, nous avons procédé à plusieurs agitations à des durées respectives de 5, 10, 15 et 20 minutes. Après chaque agitation nous avons évalué la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps. La figure V.5 montre que le temps d'agitation joue un rôle important sur le signal du complexe. En effet on note une nette exaltation du signal de fluorescence au niveau du palier sous l'effet de l'agitation. Dans la suite du travail nous avons choisi 20 minutes comme temps optimal d'agitation qui correspond à la plus grande stabilité du complexe (figure V.5).



**Figure V.5:** Cinétiques de formation du complexe OPA-AGM selon le temps d'agitation: (1) sans agitation, (2) 5 minutes, (3) 10 minutes, (4) 15 minutes, (5) 20 minutes d'agitation, [OPA-AGM]=  $10^{-5}$  M

#### V.2.2.2 Effet du pH sur l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM

Des études ont révélé que le signal de fluorescence des amines est très sensible au pH du milieu [8]. En effet, dans beaucoup de cas les réactions de protonation et de déprotonation des groupes fonctionnels modifient profondément la structure du fluorophore dans l'état excité singlet [9]. C'est pourquoi, nous avons étudié l'influence du pH sur les spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM en milieu aqueux. Il ressort de cette étude qu'aucun déplacement des bandes n'a été observé ni une modification de la forme des spectres de fluorescence en milieu basique (Figure V.6.A). On note qu'en milieu acide l'intensité de fluorescence est très faible. Ceci n'est pas surprenant, car les sites aminés qui peuvent réagir avec l'OPA sont totalement protonés dans les milieux physiologiques (pH 5,5) [10]. Cependant, en milieu alcalin le signal de fluorescence augmente progressivement en fonction des valeurs croissantes du pH (Figure V.6B). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Nedeljko [11]. Dans la suite du travail nous avons choisi 13 comme valeur du pH optimal.

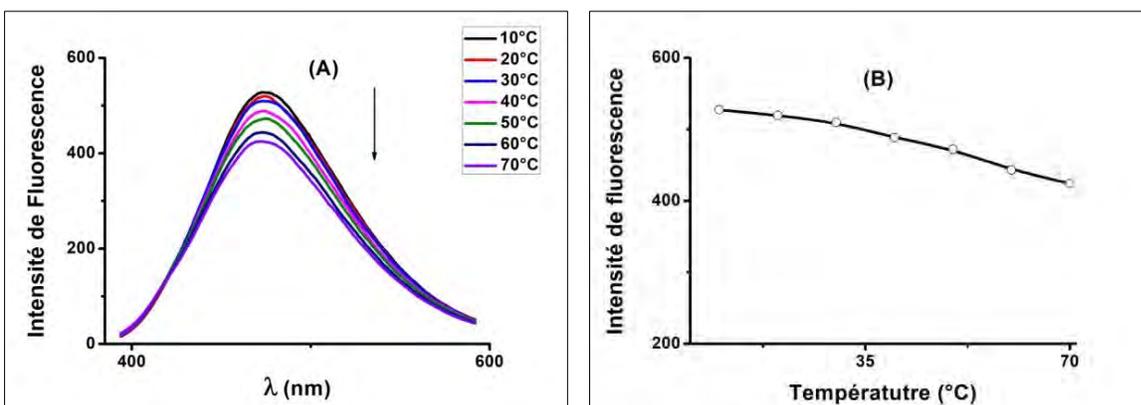


**Figure V.6:** Effet du pH sur la fluorescence du complexe OPA-AGM : (A) sur les spectres et (B) sur l'intensité

### V.2.2.3 Effet du chauffage sur la stabilité du complexe OPA-AGM

La température est un facteur très important qui peut influencer sur la fluorescence des composés organiques. Pour cette raison nous avons étudié l'effet de la température sur l'intensité du complexe OPA-AGM en milieu aqueux.

Pour ce faire, nous avons fixé la concentration du complexe en solution à  $8.10^{-5}$  M. Cette solution a été chauffée à l'aide d'un thermostat couplé au spectrofluorimètre. Un temps d'attente de 5 minutes après 20 minutes d'agitation a été observé afin de porter la solution à la température qui convient. La figure V.7A représente le spectre d'émission du complexe en fonction de la température une fois la stabilité atteinte. Cette figure ne montre aucun changement de la forme du spectre au cours du chauffage. Cependant l'intensité d'émission du pic diminue régulièrement quand on augmente la température (Figure V.7B).



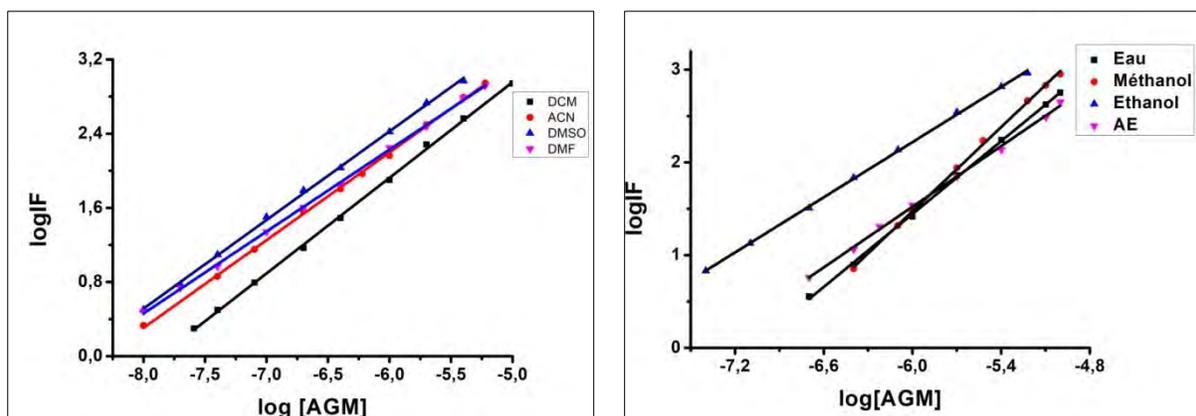
**Figure V.7:** Effet de la température sur le spectre (A) et sur l'intensité (B) de fluorescence du complexe OPA-AGM ( $[OPA-AGM] = 8.10^{-6}$  M)

### V.3 Droite de calibration et Performances analytiques

#### V.3.1 Droites de calibrations

Pour mieux évaluer l'intérêt de cette méthode, nous avons établi une droite de calibration du complexe OPA-AGM dans l'eau, dans les conditions optimales données (température ambiante et pH 13). Nous avons établi également des droites de calibrations dans les autres solvants organiques. L'agmatine n'étant pas soluble dans la plupart des solvants organiques, nous préparons d'abord dans l'eau une solution mère du complexe OPA-AGM ( $10^{-2}$  M). Ensuite on procédait par dilution avec le solvant organique (1/100 proportion en volume eau/solvant) afin d'obtenir une gamme de concentrations variant de  $10^{-8}$  M à  $10^{-5}$  M. Dans ces conditions, « l'effet eau » était donc négligeable dans tous ces solvants organiques utilisés. Le domaine de linéarité étant très grand pour l'ensemble des solvants, toutes les droites de calibration ont été établies en traçant la courbe  $\log I_F = \log [AGM]$  (Figure V.8). Pour l'ensemble des calibrations, nous avons obtenu des coefficients de corrélation de l'ordre de 0,999, proche de l'unité indiquant la bonne précision de nos mesures. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le tableau V.1.

**CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE  
SPECTROFLUORIMÉTRIQUE**



**Figure V.8:** Droites d'étalonnages de l'agmatine dans différents solvants

**Tableau V.1:** Caractéristiques des droites de calibration en fonction du solvant

Solvants	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	Pentes	Ordonnées à l'origine	$r^2$
Eau	333/473	1,212	9,306	0,9992
Méthanol	333/465	1,514	10,556	0,9989
Ethanol	333/463	0,991	8,166	0,9994
AE	337/457	1,130	8,315	0,9989
DCM	337/455	1,031	8,111	0,9991
DMF	342/470	0,884	7,533	0,9994
ACN	336/463	0,964	7,877	0,999
DMSO	342/475	0,956	8,161	0,9991

Dans ce tableau, on constate que les pics d'excitation varient peu avec le solvant (333-342 nm). En revanche, la variation est beaucoup plus importante pour les maxima d'émission de fluorescence (455-475 nm). Cependant, nous constatons que les pentes des droites sont moyennement plus élevées dans les solvants protiques (eau et alcool) par rapport à celles trouvées dans les solvants aprotiques.

A partir de ces courbes nous avons également pu déterminer les paramètres analytiques.

**CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE  
SPECTROFLUORIMÉTRIQUE**

**V.3.2 Performances analytiques**

Nous avons fait une étude exhaustive sur la détermination de la limite de détection et de quantification (LOQ) de l'agmatine dans l'eau. Pour cela, nous avons commencé par déterminer l'écart-type correspondant aux essais répétitifs de l'intensité de la ligne de base du solvant à la longueur d'onde d'excitation et d'émission du complexe. Nous avons trouvé un écart-type = 0,025 (Tableau V.2). A partir de cette valeur, nous avons déterminé la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ).

**Tableau V.2:** Détermination de l'écart-type des intensités de fluorescence

$I_F$	1,33	1,25	1,16	1,21	1,28	1,45	1,18	1,17	1,08	0,88
$\bar{I}_F$	1,20									
$I_F - \bar{I}_F$	0,13	-0,05	-0,04	0,01	0,08	0,25	-0,02	-0,03	-0,12	-0,32
$\sigma^2 = \frac{\sum(I_F - \bar{I}_F)^2}{10}$	0,022									
	0,15									

Puisque nous avons utilisé les fonctions  $\log I_F = f(\log C)$  pour établir la courbe de calibration dans tous les solvants, le tableau V.1 nous donne la pente et l'ordonnée à l'origine qui sont respectivement égales à 1,212 et 9,306 à pH 13.

Ainsi, à partir de la pente et l'ordonnée à l'origine, nous avons pu déterminer respectivement les limites de détection et de quantification selon les équations 14 et 15 (chapitre II).

L'équation 14 donne :  $LOD = \left(\frac{3s}{10\beta'}\right)^{1/\alpha'}$

Et l'équation 15 donne:  $LOQ = \left(\frac{10\sigma_s}{10\beta'}\right)^{1/\alpha'}$

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

---

Dans ces relations  $\alpha'$  représente la pente de la droite de calibration dans l'eau et  $\beta'$  l'ordonnée à l'origine de cette même droite.

En remplaçant  $\alpha'$  et  $\beta'$  par leur valeur avec l'écart-type  $s = 0,15$  on trouve:

$$\text{LOD} = 1,09 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L} \Leftrightarrow 2,488 \text{ ng/mL}$$

$$\text{LOQ} = 2,93 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L} \Leftrightarrow 6,691 \text{ ng/mL}$$

Ainsi, pour les autres solvants nous avons utilisé le même procédé pour déterminer les LOD et LOQ. Tous les résultats sont regroupés dans le tableau V.3. Ce tableau montre que les limites de détection obtenues sont comprises entre 0,038 ng/mL et 2,488 ng/mL et les limites de quantification entre 0,133 ng/mL et 6,691 ng/mL. En moyenne, les LOD et les LOQ sont plus faibles dans les solvants aprotiques. C'est d'ailleurs dans l'eau que nous avons trouvé les limites de détection et de quantification les plus élevées. Néanmoins, ces valeurs trouvées sont quand même faibles, elles sont plus faibles que celles trouvées dans la littérature [12-14]. Les solvants utilisés sont dans la famille des protiques polaires (eau, méthanol et éthanol) et des aprotiques polaires (AE, DCM, DMF ACN et DMSO). Dans la première famille les limites de détection et de quantification diminuent quand on passe de l'eau vers le méthanol : la diminution va dans le même sens que la polarité du solvant. En revanche, dans la seconde famille (solvants aprotiques polaires), les limites de détection et de quantification augmentent généralement dans le sens inverse de la polarité. La différence serait due à l'existence possible de liaisons hydrogène dans les solvants protiques qui augmentent de l'éthanol vers l'eau. Les valeurs de déviations standards relatives (DRS) ont été calculées à partir de l'équation 16 (chapitre III). Ces valeurs calculées sont regroupées dans le tableau V.3. Ces valeurs très faibles sont comprises entre 0,08 et 2, indiquant une bonne reproductibilité de la méthode.

Ces faibles valeurs des paramètres analytiques trouvés montrent que la méthode développée au cours de cette étude peut être appliquée à l'analyse des échantillons contenant de l'agmatine même à l'état de trace.

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

**Tableau V.3:** Paramètres analytiques du complexe OPA-AGM dans différents solvants

Solvants	Écart-type	LOD* (ng/mL)	LOQ *(ng/mL)	DRS* (%)
Eau	0,022	2,488	6,691	0,08
Méthanol	0,030	0,496	1,620	1,50
Ethanol	0,041	0,158	0,540	1,13
AE	0,039	1,280	3,871	1,00
DCM	0,060	0,669	2,101	2,00
DMF	0,125	0,226	0,846	1,40
ACN	0,012	0,038	0,133	0,50
DMSO	0,048	0,087	0,308	1,70

\* LOD : Limite de Détection ; LOQ : Limite de Quantification ; DRS : Déviation Relative Standard.

### V.4 Étude d'interférence d'espèces étrangères ajoutées

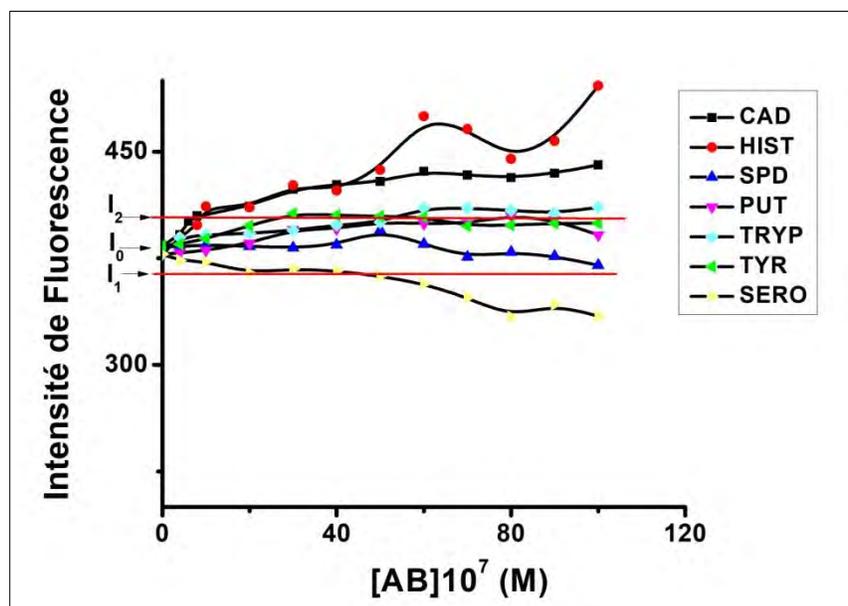
#### V.4.1 Interférence avec les amines biogènes

Plusieurs études ont montré la présence simultanée de plusieurs amines biogènes dans les aliments, particulièrement dans les crevettes et les raisins [15-21]. Parmi celles-ci nous pouvons citer : la cadavérine, l'histamine, la putrescine, la spermidine, l'agmatine et la tyramine. Leurs présences simultanées dans les matrices alimentaires peuvent entraîner donc des effets d'interférences notoires lors de l'analyse de l'agmatine. C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet de leur présence lors de la détermination de l'agmatine. Pour cela, nous avons fixé la précision  $\Delta F$  à  $\pm 5\%$ .

Puisque la plupart des amines donnent des complexes fluorescents avec l'OPA, nous avons utilisé une grande quantité d'OPA ( $10^{-4}$  M) et fixé celle de l'agmatine à  $4 \cdot 10^{-6}$  M. Cependant, les concentrations de chaque amine interférente variaient entre  $4 \cdot 10^{-7}$  M et  $10^{-5}$  M correspondant à une certaine gamme variante de concentrations massiques ( $\mu\text{g/mL}$ ) selon la

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

masse molaire de l'amine. Ainsi, nous avons représenté la variation du signal de fluorescence du complexe OPA-AGM en fonction de la concentration de l'amine ajoutée à la figure V.9. Cette figure montre qu'en présence de l'histamine et de la cadavérine on note une augmentation plus ou moins importante du signal de fluorescence du complexe OPA-AGM. En revanche, avec la dopamine et la sérotonine une diminution de l'intensité de fluorescence plus marquée a été observée. Sinon avec toutes les autres amines on note une faible variation de l'intensité de fluorescence.



**Figure V.9:** Effet des amines biogènes sur l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM

A partir de cette variation, nous avons déterminé les limites de tolérance pour chaque amine ajoutée. Avec cette précision de  $\pm 5\%$ , la limite de tolérance (LT) est définie comme étant la concentration limite pour laquelle le pourcentage de variation du signal de fluorescence ne dépasse pas  $\pm 5\%$ . Elle est obtenue à partir de l'équation 17 (chapitre III) :

$$\Delta F (\%) = [(I_0 - I) / I_0] \times 100$$

**CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE  
SPECTROFLUORIMÉTRIQUE**

On rappelle que dans cette expression,  $I_0$  et  $I$  indiquent respectivement le signal de fluorescence du complexe en l'absence et en présence de l'espèce interférante. Pour notre cas la valeur de  $I_0$  est égale à 383,86 unité relative d'intensité de fluorescence.

A partir de cette expression, comme en absorption on peut en déduire les valeurs de  $I$  qui correspondent à cette précision. On peut donc avoir deux valeurs de  $I$ .

si la précision est égale à 5% on aura :  $I_1 = \frac{95F_0}{100} = 364,67$

si la précision est égale -5% on aura  $I_2 = \frac{105F_0}{100} = 403,05$

Comme en absorption, l'intersection entre les droites  $y=I_1$  ou  $y=I_2$  et la courbe  $I= f([AB])$  permettent de déterminer les limites de tolérance respectives. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le tableau V.4.

**Tableau V.4:** Valeurs des limites de tolérance des amines biogènes susceptibles d'interférer avec l'agmatine

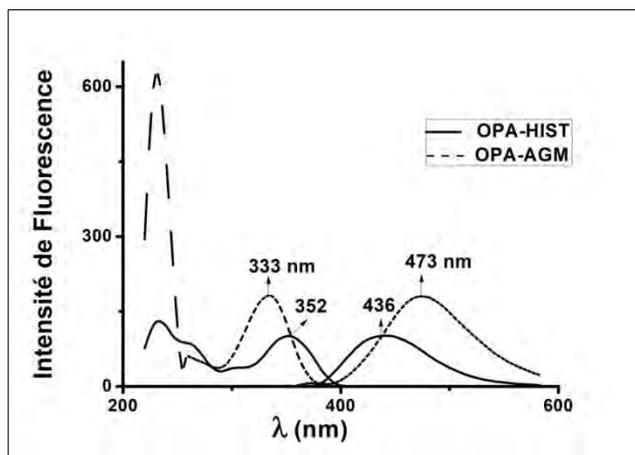
Amines biogènes	Gamme de concentration testée ( $\mu\text{g/mL}$ )	Limite de Tolérance ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\tau$ (% <i>massique</i> ) *
Tryptamine	0,064-1,60	0,85	93,10
Histamine	0,074-1,84	0,16	27,52
Tyramine	0,055-1,372	0,36	39,43
Dopamine	0,076-1,706	0,46	50,38
Putrescine	0,064-1,84	1,22	133,63
Cadavérine	0,074-1,750	0,12	13,14
Spermidine	0,102-2,55	$\infty$	$\infty$
Sérotonine	0,085-2,127	0,49	53,66

\*  $\tau$ (% *massique*) =  $\frac{[AB]}{[AGM]_0} \cdot 100$  Concentration fixée = 0,913  $\mu\text{g/mL}$  pour l'agmatine

Ainsi, ces résultats montrent que la présence d'une de ces amines dans un échantillon peut entraîner des effets d'interférences plus ou moins importants dans le dosage de l'agmatine. Parmi toutes ces amines, nous notons que l'histamine et la cadavérine interfèrent plus dans le dosage de l'agmatine. Cette grande interférence entre l'histamine et l'agmatine était prévisible car

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

l'histamine et l'agmatine forment respectivement avec l'OPA un complexe très fluorescent en milieu très basique [22]. En plus, un recouvrement assez important aussi bien en excitation qu'en émission des deux complexes OPA-AGM et OPA-HIST a été noté (Figure V.10).



**Figure V.10:** Spectres des complexes OPA-AGMA et OPA-HIST (pH 13 à 25°C)

De même, en présence de la cadavérine on note une limite de tolérance très faible (0,12  $\mu\text{g/mL}$ ) correspondant à un taux égal à 13,14% par rapport à l'agmatine. Ainsi, la cadavérine est l'amine biogène qui interfère le plus sur la fluorescence du complexe OPA-AGM. Pourtant en milieu basique (pH 13), les travaux de Traoré et al. ont montré que le complexe OPA-CAD n'est pas fluorescent du moins pour notre gamme de concentration utilisée [23]. Ainsi, cette grande interférence observée pourrait donc être due à un quenching qui serait dû à une forte interaction entre les deux complexes (OPA-AGM et OPA-CAD). En revanche, la putrescine avec un taux de 133,63% par rapport à l'agmatine, s'est montrée l'une des amines les moins interférentes lors de l'analyse de l'agmatine. En réalité, la putrescine n'est pas naturellement fluorescente. Cependant, on sait qu'il existe un complexe entre l'OPA et la putrescine, avec une cinétique de formation trop lente dépassant largement le temps de mesure. Ceci explique pourquoi elle fait partie des amines les moins interférentes du moins dans le dosage de l'agmatine.

En ce qui concerne la spermidine, aucune interférence notable dans la détermination de l'agmatine n'a été observée. En effet, la spermidine n'est pas naturellement fluorescente ; en plus, en milieu alcalin, l'émission du complexe OPA-spermidine se situe à des longueurs d'onde

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

---

totalemment différentes de celles du complexe OPA-AGM [24]. Ceci explique l'interférence zéro observée en présence de spermidine.

Quant à la tryptamine, naturellement fluorescente en milieu basique, elle présente des longueurs d'onde d'excitation et d'émission très éloignées de celles du complexe OPA-AGM [25]. Ceci explique pourquoi la présence de la tryptamine dans le milieu a une d'influence très faible sur l'analyse de l'agmatine même avec un taux de 93,10% par rapport à l'agmatine.

La comparaison des deux tableaux IV.3 et V.4 montre que l'interférence avec les amines biogènes est beaucoup plus marquée en absorption qu'en fluorescence. Dans le cas du dosage de l'agmatine les amines les plus interférentes en absorption sont la sérotonine suivie de la spermidine puis de la cadavérine ensuite la putrescine et la dopamine. En fluorescence, la séquence interférentielle par ordre décroissant est la suivante : cadavérine > histamine > tyramine. Pour éviter les effets d'interférence, il serait donc préférable d'analyser l'agmatine en absorption si l'amine interférente est la tyramine ou l'histamine. En revanche, il serait plus intéressant de doser l'agmatine en fluorescence si les amines interférentes sont la sérotonine, la putrescine, la dopamine et surtout la spermidine qui n'interfère pas du tout en fluorescence. Il est à noter que la cadavérine interfère aussi bien en absorption qu'en fluorescence. Cependant, il serait plus intéressant d'analyser l'agmatine en présence de cadavérine en fluorescence compte tenu de son taux massique par rapport à l'agmatine.

### V.4.2 Interférence avec les sels

Plusieurs travaux ont montré la présence de différents cations dans les produits alimentaires [26, 27]. En effet, parmi les sels minéraux présents en grande quantité dans les produits alimentaires, nous pouvons citer les sels de sodium, de potassium, de phosphore, de calcium, de magnésium et de fer. La présence de ces sels peut donc entraîner des effets d'interférences plus ou moins importants lors de l'analyse de l'agmatine. C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet de ces sels ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaPO}_4$  et  $\text{FeCl}_2$ ) sur la détermination de la teneur de l'agmatine. Leur influence sur l'intensité de fluorescence du complexe est notée sur la

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

figure V.11. Cette figure montre qu'à l'exception du  $\text{FeCl}_2$  et du  $\text{NaCl}$  les autres sels influent peu sur l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM.

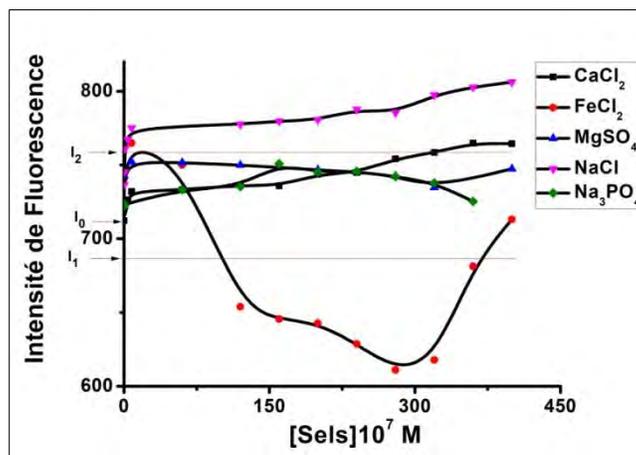


Figure V.11: Effet des sels sur l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM

Pour déterminer les limites de tolérances, les calculs ont été faits de la même façon qu'en absorption. Les valeurs de ces limites de tolérances ont été déterminées avec une précision de  $\pm 5\%$ . L'ensemble des résultats sont notés dans le tableau V.5.

Ainsi, les résultats obtenus dans ce tableau ne montrent aucune interférence de la part de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  et de  $\text{MgSO}_4$  sur la détermination de l'agmatine dans la gamme de concentrations testées. En revanche, une forte interférence est notée pour le  $\text{NaCl}$  avec une limite de tolérance de  $7,3 \cdot 10^3$   $\mu\text{g/mL}$ . Par ailleurs, pour conserver les crevettes on utilise très souvent du  $\text{NaCl}$  [28, 29]. Aussi est-il important de tenir compte de la présence de  $\text{NaCl}$  dans l'analyse de l'agmatine en fluorescence, du moins dans les crevettes conservées. Il est donc vivement recommandé de tremper longtemps les échantillons de crevettes dans l'eau avant toute extraction pour le dosage de l'agmatine.

Le sel  $\text{FeCl}_2$  comprend trois limites de tolérance sur la gamme de concentration testée en présence de l'agmatine dont l'une correspond à un point tangentiel à  $I_2$ . La totalité de la courbe  $I = f([\text{FeCl}_2])$  est en dessous de la droite  $y = I_2$ . Nous avons uniquement pris en considération dans le calcul des limites de tolérance les deux valeurs  $x_1$  et  $x_2$ , points sécants avec la courbe  $y = I_1$ . Les

**CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE  
SPECTROFLUORIMÉTRIQUE**

limites de tolérance représentées par  $x_1$  et  $x_2$  sont respectivement égales à  $2,75\mu\text{g}/\text{mL}$  et  $9,97\mu\text{g}/\text{mL}$ . Entre ces deux valeurs, la précision est supérieure à 5% (Tableau V.5), on obtient une précision inférieure à  $\pm 5\%$  pour des concentrations de  $\text{FeCl}_2$  inférieures à  $2,75\mu\text{g}/\text{mL}$  et supérieures à  $9,97\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ce tableau montre également qu'on peut doser l'agmatine dans une matrice contenant au plus 276% de  $\text{CaCl}_2$  par rapport à l'agmatine avec une précision de  $\pm 5\%$ . Également, pour  $\text{FeCl}_2$  on a deux limites 150% et 545%. Compte tenu de la précision de  $\pm 5\%$  il est possible de doser l'agmatine dans un échantillon contenant du  $\text{FeCl}_2$  avec un taux inférieur à 150% ou paradoxalement quand son taux dépasse 545% par rapport à l'agmatine. Entre les deux proportions la précision est supérieure à  $\pm 5\%$ .

Parmi tous ces sels, le  $\text{NaCl}$  est le plus interférent. En effet, pour avoir une précision de  $\pm 5\%$  au plus, il suffit que le taux du  $\text{NaCl}$  par rapport à l'agmatine soit seulement égal à 0,4%. Ainsi, contrairement en absorption, le sel  $\text{NaCl}$  est un grand interférent dans le dosage de l'agmatine en fluorescence. En revanche, les sels  $\text{MgSO}_4$  et  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  n'interfèrent pas du tout dans le dosage de l'agmatine en fluorescence compte tenu de leur taux à l'infini.

**Tableau V.5:** Valeurs des limites de tolérance avec les sels susceptibles d'interférer avec l'agmatine

Sels	Gamme de concentrations testées ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Limite de Tolérance ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\tau$ (% <i>massique</i> ) *
$\text{CaCl}_2$ ( $\text{Ca}^{2+}$ , $2\text{Cl}^-$ )	0,0014-6,762	5,058	276
$\text{FeCl}_2$ ( $\text{Fe}^{2+}$ , $2\text{Cl}^-$ )	0,0027-12,42	2,75; 9,97	150; 545
$\text{MgSO}_4$ ( $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ )	0,0024-7,872	$\infty$	$\infty$
$\text{NaCl}$ ( $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ )	0,00058-2,668	0,0073	0,4
$\text{Na}_3\text{PO}_4$ ( $3\text{Na}^+$ , $\text{PO}_4^{3-}$ )	0,0038-7,636	$\infty$	$\infty$

\*  $\tau$  (% *massique*) =  $\frac{[\text{Sel}]}{[\text{AGM}]_0} \cdot 100$ , Concentration de l'agmatine fixée =  $1,83\mu\text{g}/\text{mL}$

La comparaison des deux tableaux IV.4 et V.5 montre que les sels  $MgSO_4$  et  $Na_3PO_4$  n'interfèrent pas lors du dosage de l'agmatine aussi bien en absorption qu'en fluorescence. Si les autres sels interfèrent plus ou moins, le NaCl est peu interférent en absorption et beaucoup trop en fluorescence. Dans tous les cas il est préférable de faire l'analyse de l'agmatine dans un échantillon contenant ces sels en fluorescence à l'exception du NaCl qui interfère beaucoup moins en absorption.

## **V.5 Applications**

### **V.5.1 Dosage de l'agmatine dans les crevettes**

#### **V.5.1.1 Choix des crevettes**

Le Sénégal, par sa position géographique (700 km de côtes) avec des conditions météorologiques avantageuses, possède des eaux maritimes riches en ressources halieutiques. Parmi ces ressources on peut citer les poissons mais également les crevettes. La pêche industrielle des crevettes en fleuve a débuté sur le Casamance en 1959 ; elle se trouve actuellement en pleine extension dans plusieurs régions au Sénégal avec trois usines dont une à Ziguinchor et deux autres sur le Sine Saloum (Kaolack et Foundiougne). Ces crevettes pêchées au Sénégal sont souvent exportées à l'étranger. Dans notre travail, nous nous sommes servis en un premier temps des crevettes géantes tigrées (*Penaeus monodon*) appelées « gambas » avant d'étudier le cas des crevettes roses (*alaemon serratus*) appelées « bouquets » (Figure V.12). Ces espèces vivent le plus souvent dans les eaux chaudes. Ces types de crevettes ont leur peau recouverte de carapaces et une taille qui varie en fonction de l'espèce. Le bouquet a une taille qui varie entre 6 cm et 10 cm de long pendant que la gambas peut mesurer 20 cm (Figure V.12) [30]. Ainsi, la pêcherie crevette est très intéressante avec un apport économique qui évolue positivement au cours des années. En effet, au-delà de leur apport croissant dans l'économie du Sénégal, les crevettes sont

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

---

souvent utilisées dans les foyers pour des repas familiaux. En réalité, ces crevettes ont un intérêt particulier sur la santé humaine :

- elles contiennent une substance antioxydante puissante qui peut protéger contre plusieurs sortes de maladies du cœur en renforçant le système immunitaire ;
- elles contiennent d'autres nutriments tels que la coenzyme Q10 et les acides gras Omega 3 qui contribuent au maintien d'une bonne santé cardio-vasculaire [31] ;
- sur le plan nutritionnel, les crevettes sont riches en protéines, pauvres en graisses et en calories. Elles ont une saveur neutre [32] ;
- elles ont également été identifiées comme une source riche en vitamine B12 pouvant participer à la synthèse de neurotransmetteurs du cerveau ; de sélénium et d'astaxanthine, antioxydant pouvant réagir contre la vieillesse [33].

Cependant, les consommateurs sont prudents car les crevettes s'altèrent très vite si elles ne sont pas cuites ou conservées au froid (congélation ou réfrigération). En effet, ces produits altérés sont très toxiques et leur consommation peut causer de graves cas d'intoxications alimentaires. Cette toxicité est due en partie à la présence des amines biogènes qui sont généralement produites par les bactéries [34-36] ou par des protéines qui représentent en moyenne 20 g pour 100 g de chair de crevette. Ces protéines renferment aussi une très grande diversité d'acides aminés (glutamique, aspartique, lysine, arginine, leucine...) qui sont précurseurs d'amines biogènes [37]. C'est pourquoi, le taux d'amines biogènes dans les aliments est souvent utilisé comme indice de fraîcheur ou d'altération. Parmi ces amines, l'agmatine a été qualifiée d'indicateur de fraîcheur des aliments [38]. En effet, pour vérifier la fraîcheur des crevettes pendant le temps de conservation, il est important de trouver et de déterminer le taux de l'agmatine dans l'aliment.

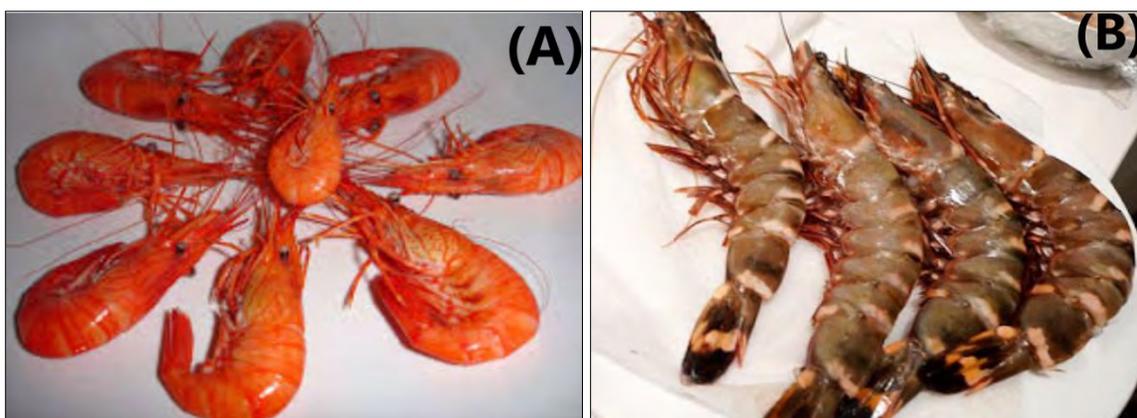


Figure V.12: Photographie des crevettes : bouquets (A) et gambas (B)

#### V.5.1.2. Mise en évidence de l'agmatine dans les crevettes

L'existence d'agmatine dans les extraits de crevette a été prouvée en comparant dans les mêmes conditions (pH 13) les spectres d'excitation et d'émission des deux solutions standard et extraits (bouquet séché, bouquet frais et gambas). La figure V.13 montre respectivement une quasi-superposition des spectres d'excitation et d'émission. Ceci confirme avec certitude la présence d'agmatine dans les crevettes.

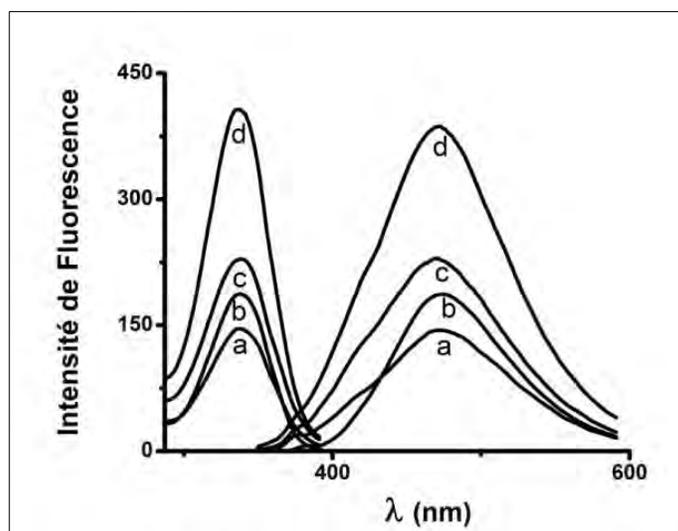
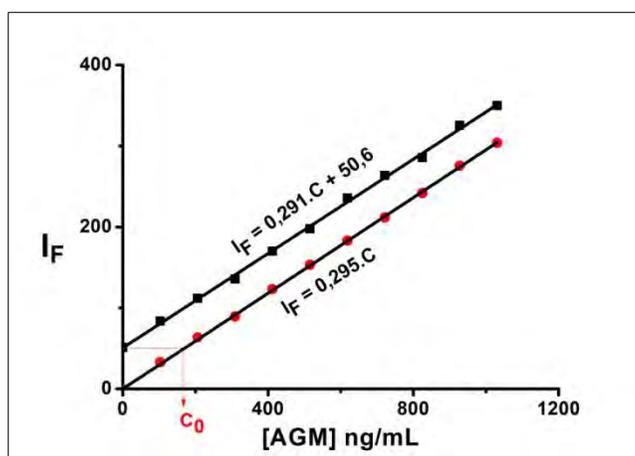


Figure V.13: Spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM : (a) *Palaemon serratus* frais; (b) solution standard ; (c) *Penaeus monodon* frais; (d) *Palaemon serratus* séché

### V.5.1.3 Caractéristiques des droites d'étalonnage et d'addition standard dans les différents extraits

Pour le cas de la gambas, la figure V.14 représente les droites de calibration et d'addition standard avec des coefficients de corrélation respectifs de 0,9999 et 0,9986 très proches de l'unité ; ceci indique la bonne précision des mesures. De même, les pentes sont respectivement égales à 0,295 et 0,291. Ceci montre que les deux droites de calibration et d'addition standard sont quasi parallèles. Ce parallélisme étroit entre la droite d'étalonnage de l'agmatine et celle d'addition standard de l'extrait de gambas montre la non existence d'effet de matrice, c'est à dire aucune interférence gênante lors du dosage de l'agmatine n'a été remarquée. Ainsi, on peut quantifier l'agmatine contenue dans les gambas avec une bonne exactitude à partir de la droite d'addition standard et de la courbe de calibration. Pour déterminer la concentration ( $C_0$ ) de l'agmatine contenue dans l'extrait on a projeté horizontalement l'ordonnée à l'origine de la courbe d'addition standard sur la droite de calibration. L'intersection de cette droite horizontale sur la droite de calibration a pour abscisse  $C_0$  qui correspond relativement à la concentration de l'agmatine contenue dans l'échantillon. Après extrapolation on trouve  $C_0 = 168,2$  ng/mL (Figure V.14).



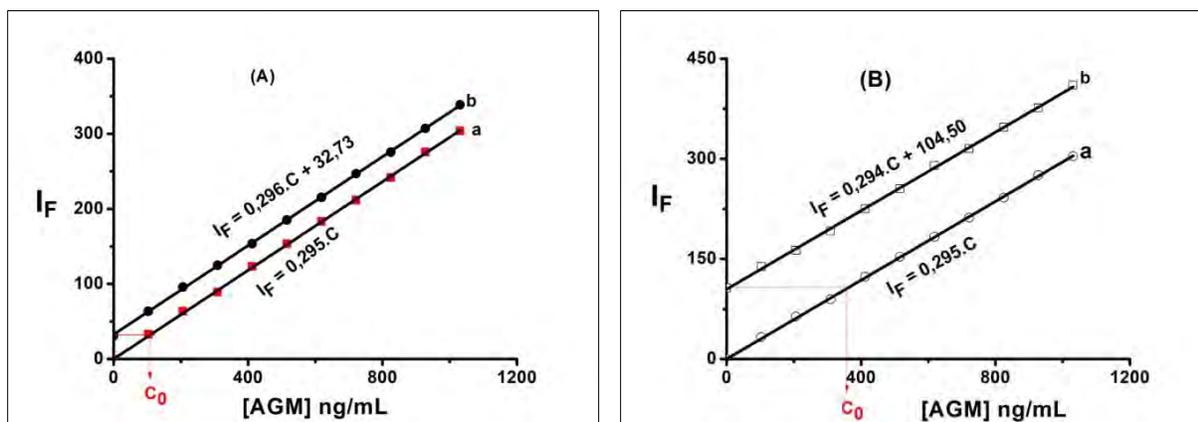
**Figure V.14:** Détermination de  $C_0$  à partir des droites de calibration et d'addition standard dans l'extrait de gambas ( $\lambda_{ex}=333$  nm,  $\lambda_{em}=473$  nm)

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

Pour le bouquet frais, les pentes des droites d'addition standard et de calibration sont respectivement égales à 0,296 et 0,295 avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,999. Ainsi, les droites sont quasi parallèles ; ce qui nous a permis de trouver la concentration de l'agmatine dans cet étalon qui est de 104 ng/mL (Figure V.15A)

De même, pour les bouquets séchés les pentes sont respectivement égales à 0,294 et 0,295 avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,999. A partir de ces résultats nous avons déterminé la concentration de l'agmatine dans cet étalon qui est de 363,3 ng/mL (Figure V.15B).

L'ensemble de tous les résultats sont regroupés dans le tableau V.6.



**Figure V.15:** Détermination de  $C_0$  à partir des courbes de calibration (a) et d'addition standard (b) de l'agmatine dans l'extrait de bouquet : (A) bouquet frais, (B) bouquet séché ( $\lambda_{ex}=333$  nm,  $\lambda_{em}=473$  nm)

Pour les trois échantillons (gambas fraîche, bouquet frais et bouquet séché), le tableau V.6 montre que les droites d'addition standard sont très parallèles à la courbe de calibration avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,999 à quelques exceptions près. Ceci implique que les interférences sont très négligeables sur les résultats de mesures ; d'ailleurs toutes les pentes sont identiques au centième près.

La grande différence des valeurs de la concentration de l'agmatine entre le bouquet frais et le bouquet séché est normale car les 2 g prélevés pour le premier étaient humides et pour l'autre le bouquet était à sec. Cette grande différence du simple au triple dénote donc la présence

d'une grande humidité dans le bouquet frais. De même, en comparant les concentrations d'agmatine obtenues dans la gambas fraîche et le bouquet frais, tout porte à croire que le taux d'agmatine est plus élevé dans la gambas que dans le bouquet.

#### **V.5.1.4 Détermination du pourcentage massique (g/Kg)**

Pour déterminer le pourcentage massique de l'agmatine dans l'échantillon de crevette, on a appliqué l'équation 18 (chapitre III) :  $\tau = \frac{m \times 10^{-9}}{m_T} \times 100$

où m (ng) représente la masse de l'agmatine pure contenue dans une masse totale ( $m_T$ ) de 2 g d'extrait. On rappelle que la masse m est calculée à partir de  $C_0$  qui est égale à la concentration de l'agmatine dans un volume V de 5 mL dans lequel on a dilué 10  $\mu$ L de la solution mère. Après extrapolation, on peut déterminer le taux massique  $\eta$  représentant la masse d'agmatine pure dans un Kg de crevette selon l'équation 19 (chapitre III) :

$$\eta = 10 \times \tau$$

Ainsi, les résultats regroupés sur le tableau V.6 montrent que les 2 g d'échantillon contiennent :

pour les gambas:  $\eta = 0,41$  g/Kg,

pour les bouquets frais:  $\eta = 0,26$  g/Kg

pour les bouquets séchés:  $\eta = 0,95$  g/Kg.

Ainsi, pour un kilogramme (Kg) de gambas consommé, 0,41 g d'agmatine pure est ingurgité. Ceci montre également que la masse d'agmatine pure dans un Kg de crevette est plus importante pour les bouquets séchés suivi des gambas puis les bouquets frais. Cette différence entre ces deux types de bouquets s'explique par le fait que la crevette fraîche est humide donc moins concentrée en agmatine. Par ailleurs, la masse d'agmatine dans un Kg de gambas fraîche est plus élevée que celle contenue dans le bouquet frais. Ces résultats montrent que la quantité d'agmatine trouvée dans ces crevettes est inférieure à celle utilisée par Keynan et al. [39] quand ils ont testé les effets secondaires de l'agmatine dans le corps humain.

Ainsi, ces crevettes étudiées peuvent être consommées à grande échelle sans se soucier des effets secondaires dus à la présence de l'agmatine quand elles sont bien conservées.

**CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE  
SPECTROFLUORIMÉTRIQUE**

**Tableau V.6:** Masse massique et caractéristiques des droites d'étalonnage et d'addition de l'agmatine dans les crevettes

Echantillon	Type de droite	r <sup>2</sup>	Pentes	C <sub>0</sub> (ng/mL)	m <sub>j</sub> (g/Kg)
Agmatine standard	Etalonnage	0,9999	0,295	-	-
<i>Penaeus monodon</i> (Gambas) fraiche	Addition standard	0,9985	0,291	168,2	0,41
<i>Palaemon serratus</i> (Bouquet) frais	Addition standard	0,9999	0,296	104,0	0,26
<i>Palaemon serratus</i> (Bouquet) séché	Addition standard	0,9999	0,294	363,3	0,95

r<sup>2</sup> : Coefficient de corrélation ; C<sub>0</sub> : Concentration de l'agmatine dans l'échantillon ; m<sub>j</sub> : masse d'agmatine pure dans un Kg de crevette.

#### V.5.1.5 Détermination du pourcentage de recouvrement

A partir des droites de calibration et d'addition standard (Figure V.14 et V.15), le pourcentage de recouvrement (% R) de l'agmatine a été déterminé en utilisant l'équation 20 (chapitre III) :

$$\%R = \frac{C_t}{C_0 + C_a} \times 100.$$

Dans tous les trois échantillons étudiés, des pourcentages de recouvrement très satisfaisants ont été trouvés. En effet, les intervalles de recouvrement sont compris entre : 97,8% et 101,4% pour la gamba, 99,6% et 103,4% pour le bouquet frais et entre 96,3% et 101,3% pour le bouquet séché (Tableau V.7).

**CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE  
SPECTROFLUORIMÉTRIQUE**

**Tableau V.7:** Résultats statistiques par la méthode d'addition standard : pourcentage de recouvrement et déviation relative standard

Matrices	C <sub>a</sub> Ajoutée (ng/mL)	C <sub>t</sub> Trouvée (ng/mL)	% de recouvrement	Intervalle de recouvrement (%)	DRS (%)
<b>Penaeus monodon (Gambas) fraiche</b>	0	168,2	-		
	103,1	275,0	101,4		
	206,2	379,9	98,0		
	412,4	571,7	98,4	97,8-101,4	0,5
	515,5	671,0	97,8		
	618,6	796,6	100,2		
	721,6	889,2	99,9		
<b>Palaemon serratus (Bouquet) frais</b>	0	104,0	-		
	103,1	206,2	99,6		
	206,2	320,9	103,4		
	309,3	424,7	102,7	99,6-103,4	0,2
	412,4	515,5	99,8		
	515,5	618,5	99,8		
	618,6	732,9	101,4		
<b>Palaemon serratus (Bouquet) séché</b>	0	363,3	-		
	103,1	472,5	101,3		
	206,2	558,8	98,1		
	309,3	647,8	96,3	96,3-101,3	0,5
	412,4	763,6	98,4		
	515,5	862,8	98,2		
	618,6	978,5	99,6		

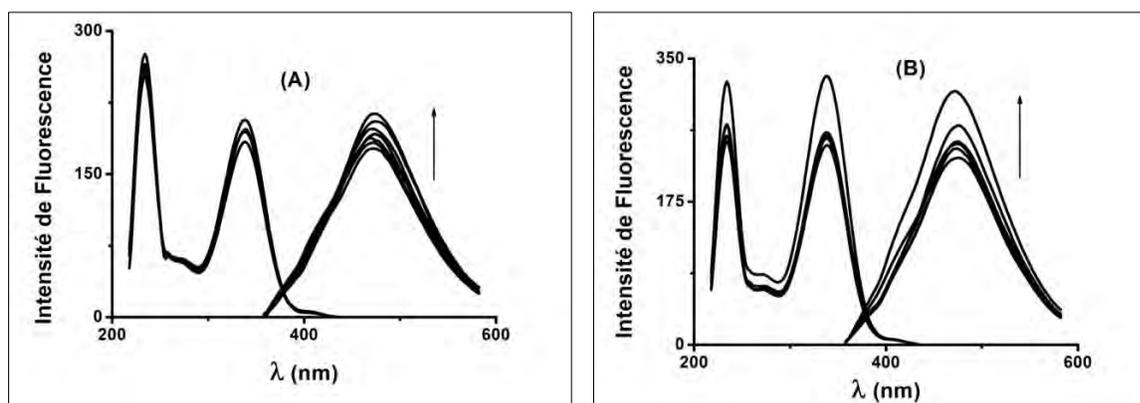
Ces valeurs proches de 100% montrent l'efficacité de la méthode d'extraction de l'agmatine dans les crevettes. Ces résultats montrent également que l'effet d'interférence est négligeable lors du dosage de l'agmatine dans les crevettes. De même, les très faibles déviations relatives standard comprises entre 0,2 et 0,5% montrent la bonne reproductibilité des mesures (Tableau V.7). Toutes ces valeurs trouvées sont ainsi conformes aux normes internationales de validation des méthodes analytiques [40].

### V.5.1.6 Evolution de la teneur d'agmatine pure dans les crevettes en fonction du temps de conservation à différentes températures

Cette étude a été faite par le suivi de l'évolution du taux massique de l'agmatine au cours du temps pour chaque échelle de température. Ce taux massique est exprimé en g d'agmatine par Kg de crevette (g/Kg). En tenant compte des températures de conservation (congélateur, réfrigérateur), l'étude a été menée pendant 9 jours pour les températures de conservation respectives de -10 °C et +4°C. Cependant, pour la température ambiante (25 °C), l'étude a été faite seulement pendant 5 jours. Pour chaque cas, nous avons commencé par représenter les spectres de fluorescence avant toute étude.

#### - conservation à -10 °C

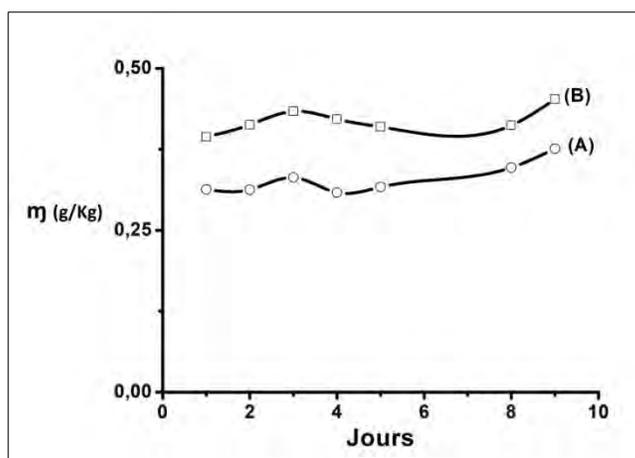
La figure V.16 représente les spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM dans les extraits de bouquet et de gambas en fonction de temps. Pendant les 9 jours d'expérience, nous n'avons observé aucun changement de forme du spectre de fluorescence ni de déplacement de pic aussi bien en excitation qu'en émission. A partir des intensités du pic et de la droite de calibration nous avons pu déterminer le taux massique de l'agmatine connaissant la masse de l'étalon initiale.



**Figure V.16:** Différents spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM dans les extraits de crevettes en fonction du temps de conservation à -10 °C : (A) bouquet et (B) gambas

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

La figure V.17 représente les variations de taux d'agmatine en fonction du temps de conservation pour ces deux types de crevettes. On note un étroit parallélisme de la variation du taux d'agmatine en fonction du temps de conservation pour les deux types de crevette. Durant tout le temps de conservation, on remarque que le taux d'agmatine est plus élevé dans la gambas que dans le bouquet. Dans tous les cas l'agmatine est toujours présente dans les deux échantillons à des quantités assez importantes du moins pendant les 9 jours d'expérience. Ainsi, durant les 9 jours d'expérience nous avons affaire à des crevettes fraîches aussi bien pour les bouquets que les gambas d'autant plus qu'une augmentation progressive du taux d'agmatine a été noté pendant ces 9 jours [41].



**Figure V.17:** Evolution du taux d'agmatine en fonction du temps de conservation à  $-10^{\circ}\text{C}$  : (A) bouquet et (B) gambas

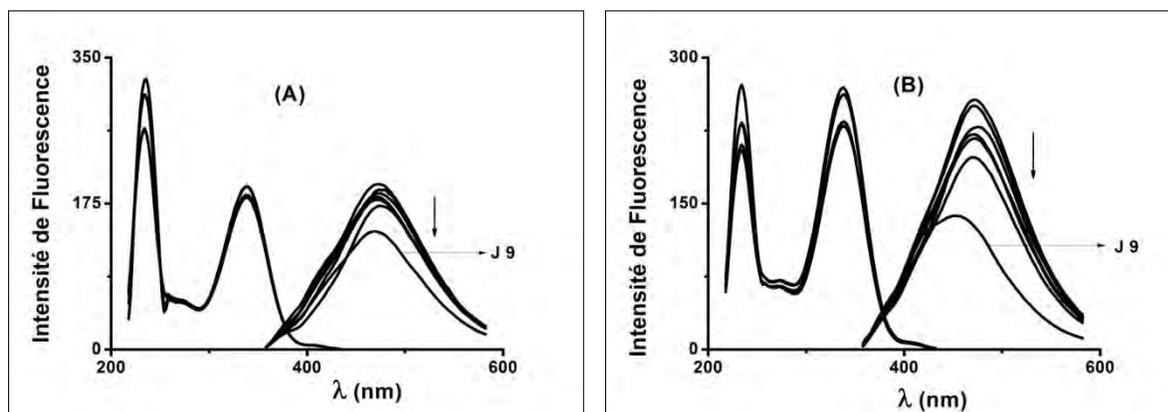
À  $-10^{\circ}\text{C}$  l'augmentation du taux d'agmatine montre que la chair est toujours fraîche car aucun changement d'aspect physique et chimique n'a été observé. En réalité, la théorie de Ozyurt et al. [41] ont montré que la présence de l'agmatine dans les produits halieutiques caractérise leur état de fraîcheur. C'est pourquoi d'autres auteurs tels que Ruiz-Capillas et Moral tout comme Gulsun et al. ont proposé la présence de l'agmatine comme indice de qualité dans les produits halieutiques. En effet, l'agmatine pourrait fournir des informations sur les changements autolytiques des produits de mer [42]. Ainsi, l'augmentation du taux d'agmatine pendant ces 9

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

jours d'expérience pourrait être due aux changements autolytiques avant la croissance microbienne [43].

### - conservation à +4 °C

La figure V.18 représente respectivement les spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM dans les extraits de bouquet et de gambas en fonction de temps. Dans ce cas également, pendant 8 jours d'expérience, nous n'avons observé aucun changement de forme du spectre de fluorescence ni de déplacement de pic aussi bien en excitation qu'en émission. Cependant, au 9<sup>ième</sup> jour on note un important déplacement hypsochrome du pic d'émission, ce qui montre la formation d'un autre produit au détriment de l'agmatine. La formation de ce nouveau produit est plus prononcée pour la gambas.

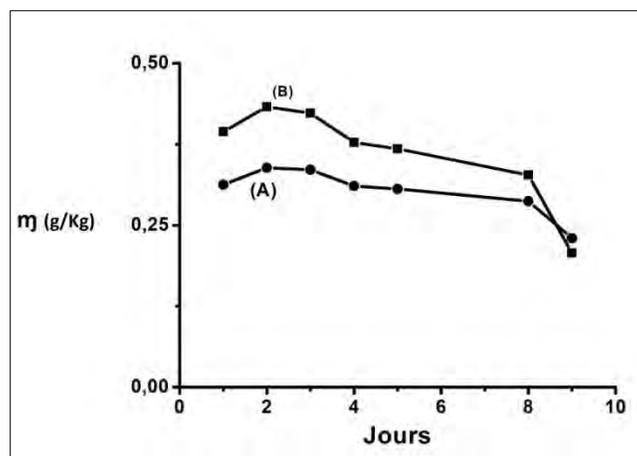


**Figure V.18:** Différents spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM dans l'extrait de crevettes en fonction du temps de conservation à +4 °C : (A) bouquet et (B) gambas

La figure V.19 montre la variation du taux d'agmatine en fonction du temps de conservation à 4 °C aussi bien pour le bouquet que la gambas. A cette température on note une faible augmentation du taux d'agmatine entre le premier et le deuxième jour suivi d'une décroissance. Jusqu'au 8<sup>ième</sup> jour, nous notons un bon parallélisme de la variation du taux d'agmatine au cours du temps pour des deux espèces de crevette. Cependant, si le taux

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

d'agmatine dans la gambas était toujours supérieur à celui du bouquet, au 9<sup>ième</sup> jour on note une disparition plus importante au niveau de la gambas. Ceci se traduit par la formation d'autres produits qui est plus nette dans le cas de la gambas avec un déplacement hypsochrome plus visible du spectre d'émission par rapport au pic du complexe OPA-AGM.



**Figure V.19:** Evolution du taux d'agmatine en fonction du temps de conservation à +4 °C : (A) bouquets et (B) gambas

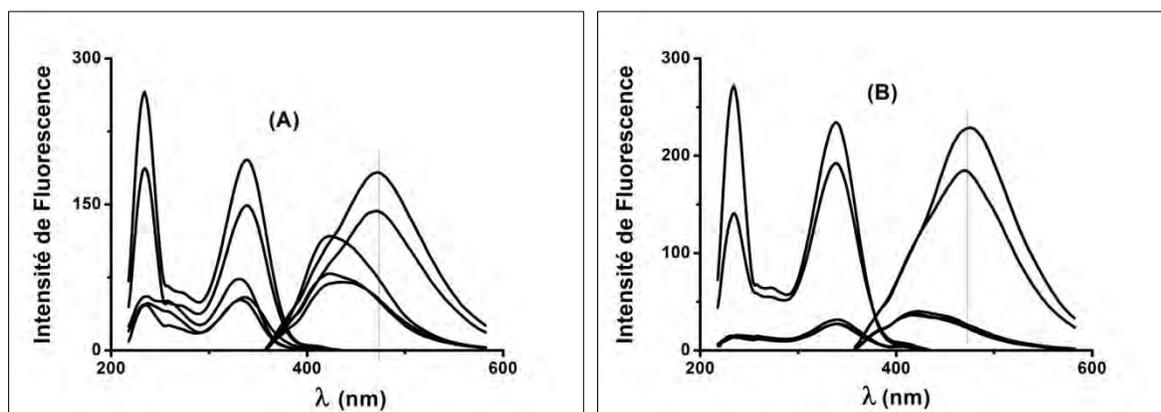
Ainsi, pour les échantillons conservés à 4°C la diminution du taux d'agmatine au 9<sup>ième</sup> jour serait due à la phase de décomposition de la chair. Cette diminution de la quantité d'agmatine devrait certainement s'accompagner de la formation d'autres amines biogènes. Notre étude confirme les travaux de Degnon et al. [44] attestant qu'entre 4°C et 6 °C les crevettes restent dans un bon état organoleptique pendant 3 jours avant l'apparition visible d'altération. Dans tous les cas, Radanielli et al. [45] ont montré que la prolifération microbienne dans les crevettes n'est entièrement inhibée qu'en dessous de la température de 1°C.

### - conservation à +25 °C

Les spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM dans les extraits de crevettes sont représentés sur la figure V.20. Entre le premier et le deuxième jour on ne note aucun changement de la forme des spectres de fluorescence aussi bien en excitation qu'en émission. De même aucun

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

déplacement de pic n'a été constaté. Toutefois, on observe alors une grande diminution de l'intensité d'émission entre ces deux jours de conservation. Ceci se traduit par une forte disparition de l'agmatine entre le premier et le deuxième jour en faveur de la formation d'autres produits. Ainsi, à partir du 3<sup>ème</sup> jour on note un grand changement qui se traduit par une disparition du spectre du complexe OPA-AGM avec apparition d'une nouvelle bande vers le bleu par rapport au pic d'émission du complexe OPA-AGM. Les crevettes fraîches conservées à 25 °C ne contiennent donc plus du tout d'agmatine au bout de 3 jours, sinon très faiblement.



**Figure V.20:** Différents spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM dans les extraits de crevettes en fonction du temps de conservation à 25 °C : (A) bouquet et (B) gambas

A 25 °C la diminution du taux d'agmatine dans les crevettes est beaucoup plus significative. On assiste donc à une forte décomposition de la chair dès le troisième jour. Ainsi, la diminution observée à cette température se traduirait par la formation d'autres amines biogènes. Parmi ces amines formées on peut citer : la tyramine, la cadavérine, l'histamine, la spermidine la spermine et la putrescine qui sont des indices d'altération des produits halieutiques [46-49]. En effet, nos crevettes stockées à la température ambiante présentaient des signes remarquables d'altération à savoir une décoloration modérée, un céphalothorax qui se détache facilement, une carapace écrasée, une chair de couleur opaque et une odeur très prononcée que l'on associe à une putréfaction. Ces remarques sont vérifiées par les travaux de Laghmari et al. [50].

Aussi est il conseillé de ne pas dépasser deux 2 jours pour consommer les crevettes conservées à la température ambiante. Il est donc recommandé de conserver les crevettes fraîches au réfrigérateur ou mieux encore au congélateur, avant consommation.

## **V.5.2 Application sur les raisins**

### **V.5.2.1 Choix du raisin**

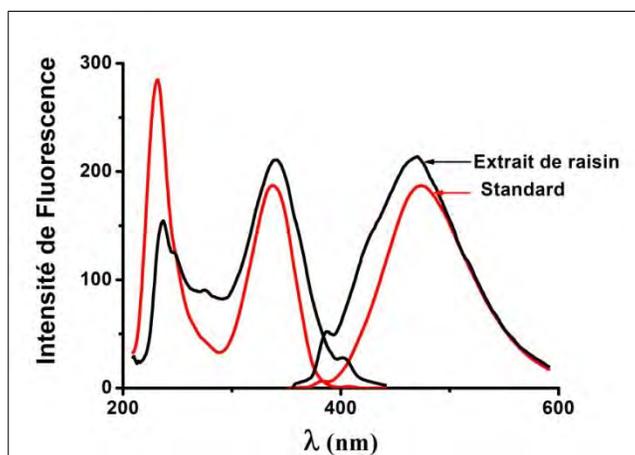
La figure V.21 représente la photographie du raisin vert. En effet, les raisins sont utilisés dans la fabrication du vin. Ils sont également consommés comme boissons et fruits. Le raisin frais a de nombreuses qualités diététiques et gustatives. Ainsi, on peut citer ses effets antioxydants qui sont une voie d'avenir dans le traitement des cancers et des maladies cardiovasculaires. Le raisin consommé de manière régulière aide à lutter contre le cholestérol, les effets du vieillissement, la constipation, la fatigue et la rétention d'eau [51-56]. Sa forte consommation suscite un grand intérêt qui oblige les chercheurs à déterminer avec précision la quantité d'amines biogènes présentes dans les raisins. En effet, la présence de l'agmatine dans le raisin caractérise sa qualité en fraîcheur.



**Figure V.21:** Photographie du raisin utilisé

### V.5.2.2. Mise en évidence de l'agmatine dans le raisin

Dans ce présent travail nous avons utilisé le raisin vert pour éviter les effets de coloration. Pour montrer la présence de l'agmatine dans le raisin après extraction, nous avons comparé dans les mêmes conditions (pH 13) les spectres d'excitation et d'émission de la solution standard avec ceux de l'extrait. La figure V.22 montre une quasi superposition des spectres d'excitations et d'émissions. Cela confirme la présence d'agmatine dans le raisin avec certitude.



**Figure V.22:** Comparaison des spectres d'excitation et d'émission du complexe OPA-AGM dans la solution standard et dans l'extrait de raisin

### V.5.2.3 Caractéristiques des droites d'étalonnage et d'addition standard

La figure V.23 représente les droites de calibration et d'addition standard avec des coefficients de corrélation respectifs de 0,999 et 0,997, très proches de l'unité ; ce qui indique la bonne précision des mesures. Le bon parallélisme noté entre ces droites montre que l'effet de matrice est négligeable. Ainsi, on peut donc déterminer la teneur de l'agmatine dans les raisins avec certitude. Comme précédemment, la concentration  $C_0$  de l'agmatine dans l'échantillon est

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

obtenue en projetant l'ordonnée à l'origine de la droite d'addition standard sur la droite de calibration. Nos calculs montrent que  $C_0$  est égale à 410,53 ng/mL.

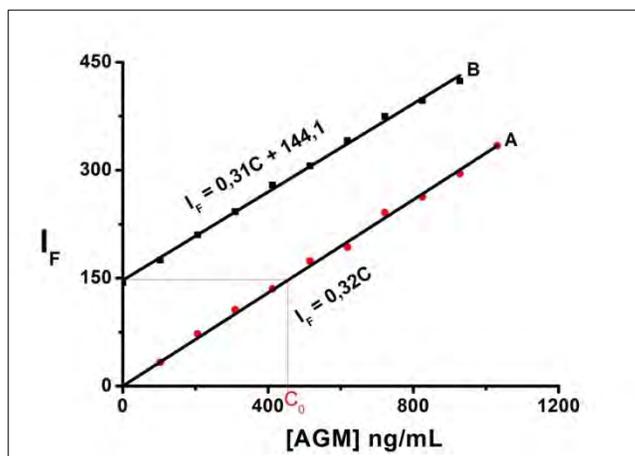


Figure V.23: Droites de calibration (A) et d'addition standard (B)

### V.5.2.4 Détermination du pourcentage massique (g/Kg)

Après extrapolation on a pu déterminer la masse d'agmatine contenue dans les 2g de raisin. Cette masse est égale à 0,0004 g. A partir de l'équation 18 (chapitre III), nous avons pu calculer la fraction massique qui est de 0,02% correspondant à 200 mg/Kg. Cette valeur montre que pour un Kg de raisin consommé, on ingurgite 200 mg d'agmatine pure. D'autres chercheurs ont effectué les travaux sur la détermination de l'agmatine dans les raisins en utilisant la CLHP couplée à un détecteur de fluorescence. C'est ainsi, que Galgano et al. [57] ont trouvé des taux supérieurs à 100 mg/Kg dans les raisins et 5 mg/Kg dans la pulpe, la tige et la peau de raisin. Pourtant, Sass-Kiss et al. [58] ont détecté la présence de beaucoup d'amines biogènes telles que la tyramine, l'histamine, la cadaverine, la putrescine, la spermidine et la phényléthylamine dans le raisin sans y trouver une trace d'agmatine.

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

### V.5.2.5 Détermination du pourcentage de recouvrement

Le pourcentage de recouvrement (% R) de l'agmatine dans le raisin a été déterminé en utilisant l'équation 20 (chapitre III). Les valeurs sont représentées dans le tableau V.8. Ce tableau montre que les pourcentages de recouvrement sont compris entre 102,18% et 105,29%. Ces valeurs du pourcentage proches de 100% montrent l'efficacité de la méthode d'extraction. Ceci justifie l'implication quasi-nulle de l'effet de matrice dans l'analyse de notre échantillon.

**Tableau V.8:** Evaluation du pourcentage de recouvrement de l'agmatine dans le raisin par une procédure d'extraction en phase solide (EPS)

[AGM] ajoutée (ng/mL)	[AGM] Trouvée (ng/mL)	% R	Intervalle de recouvrement	DSR
0	410,53	-		
103,09	533,56	103,88		
206,18	649,37	105,29		
309,28	738,12	102,54	102,18% -105,29%	0,4
412,37	857,48	104,20		
515,46	946,23	102,18		
618,56	1055,30	102,54		

### V.5.3 Application sur les boissons alcoolisées (après fortification)

#### V.5.3.1 Choix des boissons

Les boissons utilisées sont représentées sur la figure V.24. A faible dose les boissons comme le vin peuvent avoir aussi des effets bénéfiques sur la santé humaine, tout dépend de la fréquence. Ainsi, Aymé [59] a montré qu'une consommation modérée de vin est favorable à la santé. En effet, lors du processus de maturation biochimique, la physiologie du raisin est

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

---

modifiée, y compris les changements de couleur, de texture, d'arôme, de saveur et de caractéristiques nutritionnelles [60]. Lors de la maturation du raisin, il est noté une forte augmentation de la teneur en acides aminés précurseurs des amines biogènes [60]. C'est pourquoi, certains chercheurs ont remarqué la présence de plusieurs amines biogènes dans le raisin [61] ou dans les produits à base de raisin tels que le vin et la bière [62, 63]. Ainsi, la présence en grande quantité de ces amines biogènes dans le vin cause parfois d'énormes problèmes aux consommateurs. Aussi est-il important de déterminer la teneur de l'agmatine dans ces boissons pour avoir des renseignements sur leur qualité, par exemple leur état de fraîcheur. Pour cette étude, les vins et la bière utilisés (un vin rouge, un vin blanc et une bière blonde) ont été achetés dans le tas au marché de Dunkerque (Figure V.24).



Figure V.24: Photographie des vins et bière utilisés

### V.5.3.2. Mise en évidence de l'agmatine dans les boissons

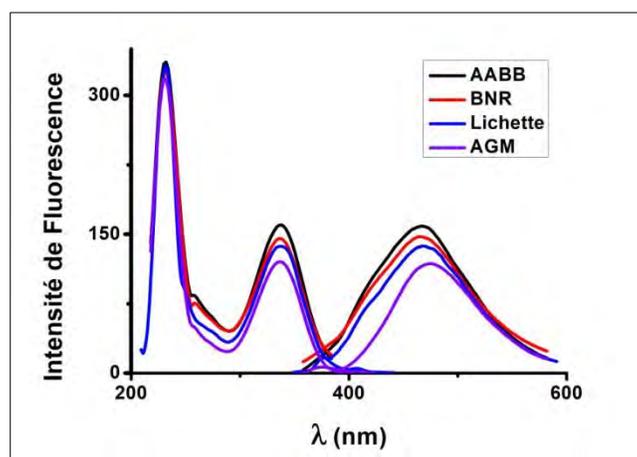
La présence de l'agmatine dans le vin et la bière a été prouvée par certains chercheurs [64-66]. Cependant, la quantité d'agmatine présente dans nos vins et bière achetés était très faible. C'est pourquoi, les échantillons de vin et de bière ont été fortifiés avant analyse.

Ainsi pour confirmer la présence d'agmatine dans le vin la *bonne nouvelle rouge* (BNR) et la *Lichette* et dans la bière *Abbaye Alveringem Bière Blonde* (AABB), à chaque fois nous avons

## CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

---

superposé les spectres de fluorescence du complexe OPA-AGM et ceux des vins et bière fortifiés (Figure V.25). Cette figure montre une nette superposition des spectres de fluorescence. Ainsi l'agmatine contenue dans le vin ou dans la bière peut bien être dosée par voie spectrofluorimétrique.

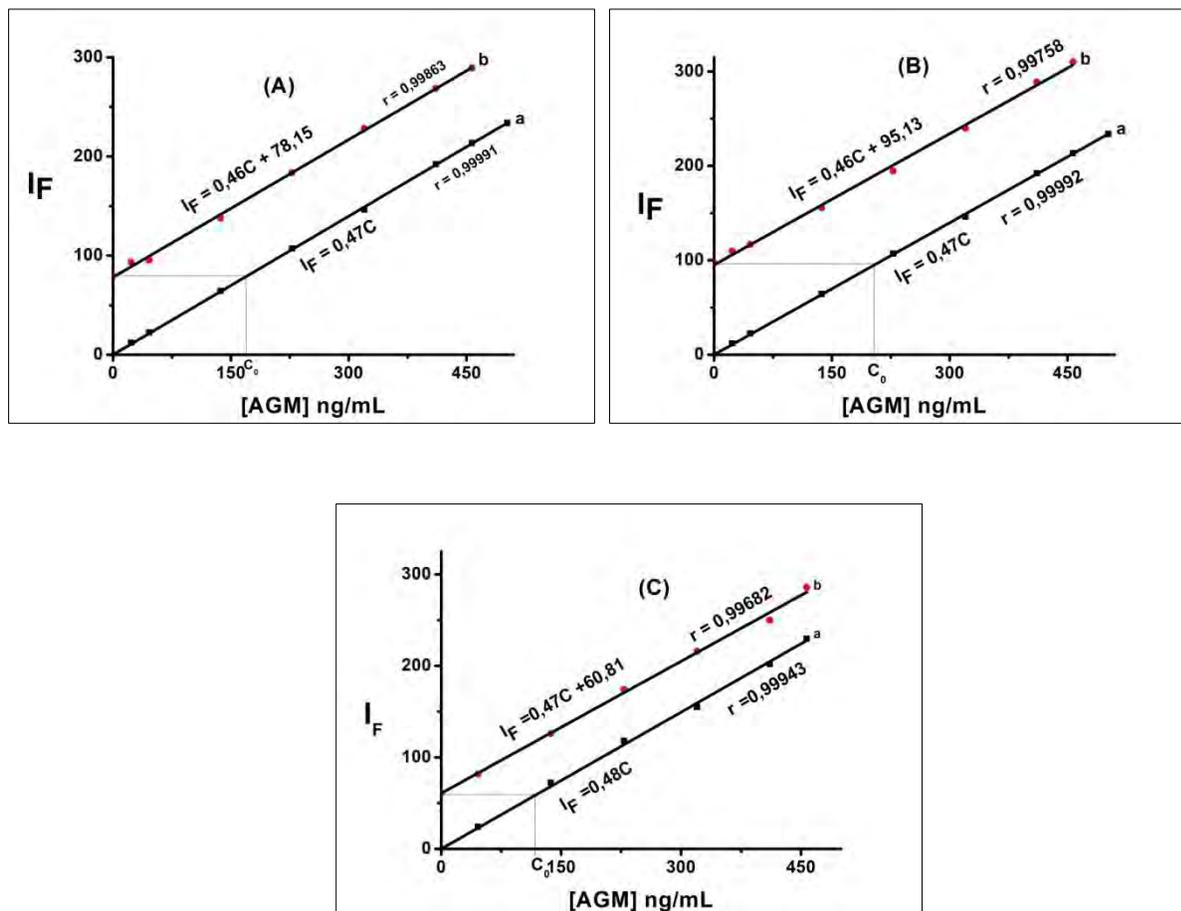


**Figure V.25:** Comparaison des spectres d'excitations et d'émissions du complexe OPA-AGM provenant de la solution standard, des vins et de la bière

### V.5.3.3 Caractéristiques des droites d'étalonnage et d'addition standard

La figure V.26, représente les droites de calibration et d'addition standard avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,99. Cette figure montre un net parallélisme respectivement entre la droite de calibration et les droites d'addition standard. Ce parallélisme noté indique la non implication d'effet de matrice sur l'analyse de l'agmatine dans les boissons étudiées.

**CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE  
SPECTROFLUORIMÉTRIQUE**



**Figure V.26:** Droites de calibration (a) et d'addition standard (b) dans les boissons : (A) Abbaye Alveringem Bière Blonde, (B) Bonne nouvelle rouge et (C) Lichette

**V.5.3.4 Détermination du pourcentage de récupération d'agmatine dans les vins et la bière.**

Les divers pourcentages de récupération (% R) de l'agmatine dans les boissons analysées ont été déterminés en utilisant l'équation 20 (chapitre III). Les résultats sont notés dans le tableau V.9. Ce tableau montre que le pourcentage de récupération de l'agmatine dans la *lichette* est compris entre 98% et 103%. Dans la *bonne nouvelle rouge* il varie entre 102% et 105% et dans la Bière *Abbaye Alveringem Blonde* entre 94% et 99%. Ces valeurs proches de 100% montrent que

**CHAPITRE V : MÉTHODE D'ANALYSE DE L'AGMATINE PAR LA VOIE  
SPECTROFLUORIMÉTRIQUE**

la méthode est précise pour la détermination de l'agmatine dans ces vins et bière sans effet de matrice. De même, la déviation relative standard inférieure à 5% sur toutes les mesures atteste aussi de la bonne reproduction des résultats.

**Tableau V.9:** Pourcentage de récupération de l'AGM dans les boissons

Matrices	$C_{aj}$ (ng/mL)	$C_t$ (ng/mL)	%R	Intervalle de Récupération	DSR
Lichette	0	117	-		
	46	160	98		
	137	254	100		
	228	350	101	98%-103%	2,9%
	320	440	101		
	457	589	103		
Bonne nouvelle rouge	0	136	-		
	26	166	102		
	137	287	105		
	228	380	104	102%-105%	1,8%
	320	471	103		
	411	564	103		
Abbaye Alveringem Bière Blonde (AABB)	0	171	-		
	46	203	94		
	137	298	97		
	228	396	99	94%-99%	2,1%
	320	485	99		
	411	574	99		

$C_{aj}$  : concentration d'agmatine ajouté dans l'échantillon (extrait),  $C_t$  : concentration d'agmatine trouvé, DRS : Déviation relative standard

## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET L'AGMATINE

---

### CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET L'AGMATINE

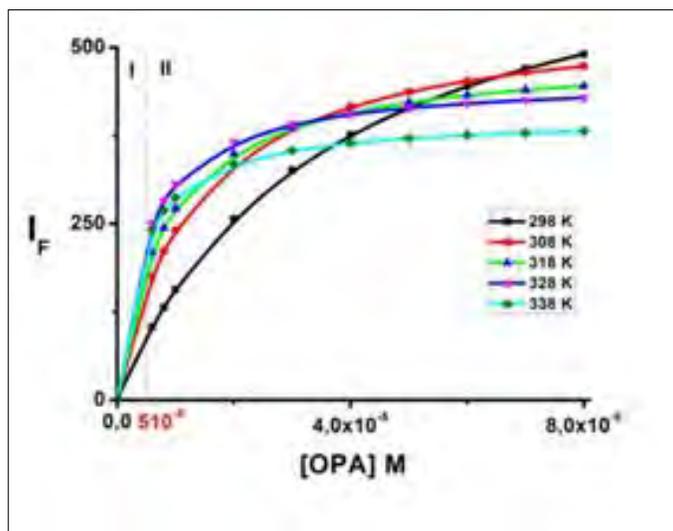
#### VI.1 Etude thermodynamique de la réaction entre OPA et AGM

##### VI.1.1 Effets de la température et de l'OPA sur la fluorescence du complexe OPA-AGM

Pour étudier l'effet de l'OPA sur la fluorescence du complexe, on a fixé la concentration de l'agmatine à  $5.10^{-6}$  M et fait varier celle de l'OPA de  $6.10^{-6}$  M à  $8.10^{-5}$  M pour chaque température donnée. A partir de la méthode du dosage répétitif, nous avons déterminé successivement toutes les mesures.

La figure VI.1 représente la variation de l'intensité de fluorescence ( $I_F$ ) du complexe en fonction de la concentration d'OPA à différentes températures entre 298 K et 328 K. Cette figure présente deux parties I et II : la première  $0 < [OPA] \leq 5.10^{-6}$  M, correspondant à la formation du complexe qui est linéaire (calibration de l'OPA) et la seconde  $[OPA] > 5.10^{-6}$  M due à l'effet de l'OPA sur l'intensité du complexe qui est non linéaire. Dans tous les cas, on observe une exaltation du signal de fluorescence du complexe en fonction de la concentration de l'OPA. Au-delà de  $[OPA] = 5.10^{-6}$  M on a une interaction (liaison d'hydrogène, transfert de charge...) entre le complexe formé et l'OPA qui exalte plus ou moins la fluorescence du complexe. Au fur et à mesure que l'on augmente la quantité d'OPA, on obtient un changement de forme d'agrégats qui pourrait influencer cette exaltation. Ce signal se stabilise à partir d'une certaine concentration d'OPA appelée concentration optimale ( $[OPA]_{max}$ ). La valeur de cette concentration optimale varie en sens inverse avec l'augmentation de températures. Ainsi, la concentration optimale d'OPA à 338 K est beaucoup plus faible que celle qu'on devrait obtenir à 298 K (Figure VI.1).

## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET L'AGMATINE



**Figure VI.1:** Variation de  $I_F$  du complexe OPA-AGM en fonction de la concentration d'OPA. ( $[AGM]_0 = 5.10^{-6}$  M,  $\lambda_{ex}=333$  nm et  $\lambda_{em}=473$  nm)

### VI.1.2 Détermination de la constante d'association $K_a$ entre l'OPA et l'AGM à différentes températures

A partir de l'équation 10 (chapitre III), on a représenté les graphes de Benesi-Hildebrand (Figure VI.2). Cette figure montre qu'à chaque température une corrélation linéaire a été observée avec un coefficient de corrélation ( $r^2$ ) supérieur à 0,9999 presque l'unité ; ceci implique la bonne précision de nos mesures (Tableau VI.2). A partir de la pente et l'ordonnée à l'origine, la constante d'association  $K_a$  a été déterminée pour chaque température. D'ailleurs cette constante  $K_a$  varie dans le même sens que la variation de température. Ceci montre que la réaction est favorisée par une élévation de températures.

## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET L'AGMATINE

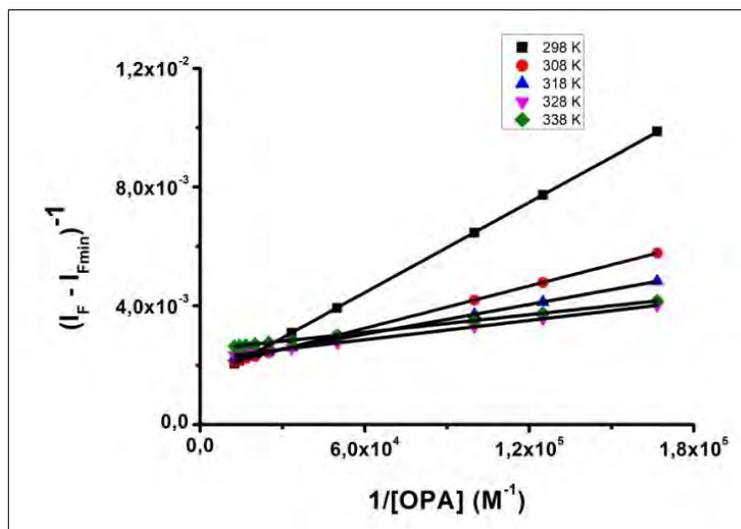
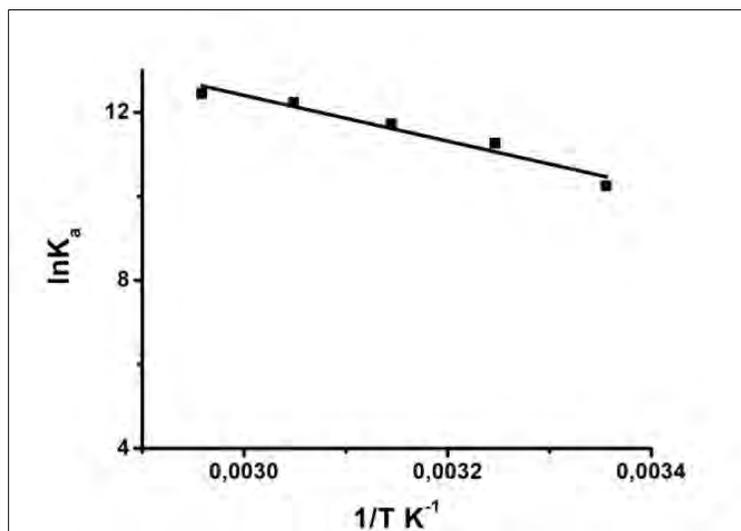


Figure VI.2: Courbes de Benesi-Hildebrand à partir de la complexation entre l'AGM et l'OPA

### VI.1.3 Détermination des paramètres thermodynamiques

Afin d'avoir une meilleure compréhension thermodynamique de la réaction de complexation entre l'OPA et l'AGM, on a déterminé les paramètres thermodynamiques à savoir l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), l'enthalpie ( $\Delta H^\circ$ ) et l'entropie ( $\Delta S^\circ$ ) de la réaction. A partir des valeurs de  $K_a$  on a pu tracer la courbe  $\ln K_a$  en fonction de  $1/T$  (Figure VI.3). Cette courbe donne une droite linéaire avec un coefficient de corrélation de 0,94 (Figure IV.3). L'ordonnée à l'origine et la pente de cette droite nous ont permis de déterminer respectivement  $\Delta S^\circ$  et  $\Delta H^\circ$ ; de même l'équation 23 (chapitre III) nous a permis de déterminer  $\Delta G^\circ$ . Enfin, à partir de l'équation 26 (chapitre III) on a pu calculer  $\Delta G$  correspondant aux différentes températures. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le tableau VI.1.

**CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA  
REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET  
L'AGMATINE**



**Figure VI.3:** Variation de la constante de formation du complexe OPA-AGM en fonction de la température

**Tableau VI.1:** Constante d'association et paramètres thermodynamiques du complexe OPA-AGM

T (K)	r <sup>2</sup>	K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> )	ΔG (kJ.mol <sup>-1</sup> )	ΔH <sup>0</sup> (kJ.mol <sup>-1</sup> )	ΔS <sup>0</sup> (kJ.K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
298	0,99998	27819	-26,02	45,5	0,24
308	1	76681	-28,42	-	-
318	1	122885	-30,82	-	-
328	1	203743	-32,35	-	-
338	1	252396	-35,62	-	-

T : Température en kelvin, r<sup>2</sup> : coefficient de corrélation, ΔG : Energie libre de Gibb, ΔH<sup>0</sup> : Variation d'enthalpie standard, ΔS<sup>0</sup> Variation d'entropie standard.

## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINÉTIQUE DÉTAILLÉE DE LA RÉACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDÉHYDE ET L'AGMATINE

---

Les valeurs négatives de  $\Delta G$  montrent que le processus est spontané. Elles caractérisent la stabilité du complexe OPA-AGM. Ces valeurs négatives de  $\Delta G$  montrent également que la formation du complexe fait appel à des interactions électrostatiques du type de Van Der Waals-London [67]. En revanche, l'enthalpie  $\Delta H^0$  est positive, ce qui indique que la réaction est endothermique, donc favorisée par une augmentation de température. La valeur positive de l'entropie  $\Delta S^0$  traduit une augmentation de désordre du système pendant la formation du complexe OPA-AGM.

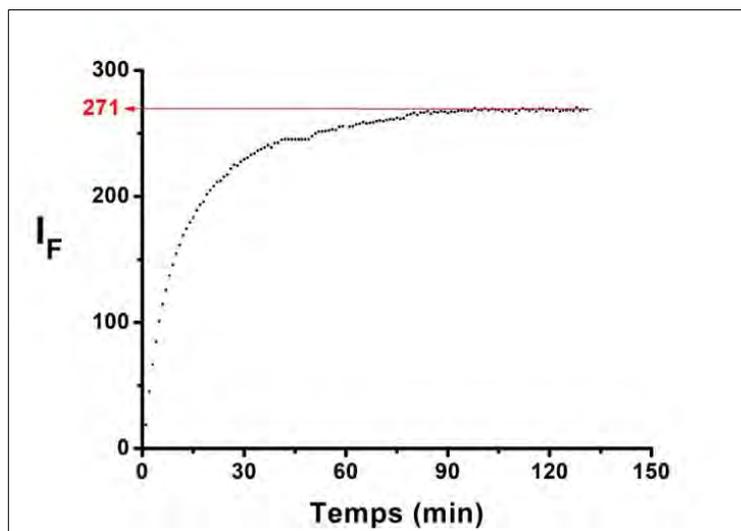
Ainsi, on peut doser l'agmatine à partir du complexe OPA-AGM à la température ambiante sans soucis de refroidissement même dans les pays chauds car la réaction de complexation entre l'OPA et l'AGM est endothermique donc favorisée par une élévation de température. En plus  $\Delta G$  est négative, on n'a donc pas besoin d'utilisation d'un catalyseur pour complexer l'AGM avec l'OPA.

### VI.2 Etude cinétique de la réaction de formation du complexe OPA-AGM

#### VI.2.1 Détermination de l'ordre global de la réaction

A l'instant initial  $t_0$  des concentrations équimolaires ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) d'OPA et d'AGM ont été prises. Ensuite, on a enregistré l'évolution de l'intensité de fluorescence du complexe en fonction du temps et le résultat est illustré par la figure VI.4. Cette figure montre que l'intensité de fluorescence augmente progressivement au cours du temps avant d'atteindre son maximum au bout de 90 min correspondant à la fin de la réaction.

## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET L'AGMATINE



**Figure VI.4:** Variation de l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM en fonction du temps ( $[AGM]=[OPA]=[OPA-AGM]=510^{-6}$  M),  $\lambda_{ex}=333$  nm,  $\lambda_{em}=473$  nm

A partir de cette figure, l'ordre global de la réaction entre l'OPA et l'AGM a été déterminé. A un instant  $t \neq 0$ , la concentration du complexe formé est proportionnelle à l'intensité de fluorescence ( $I_F$ ). Ainsi, l'intensité maximale de fluorescence ( $I_{Fmax}$ ) correspond à la concentration maximale du complexe. Avec la stœchiométrie (1:1) de la réaction, la concentration de ce complexe formé est égale à celle de l'AGM qui a réagi. Et par conséquent, connaissant  $I_{Fmax}$ ,  $I_F$  et  $C_0$ , il est possible d'en déduire la concentration  $C$  d'AGM restante à l'instant ( $t$ ) à partir de l'équation 28 (chapitre III).

Dans ce travail, on a commencé par vérifier si la réaction est d'ordre 0, 1 ou 2. Pour vérifier ces ordres, les équations 32, 37 et 33 du chapitre III ont été utilisées respectivement.

Si l'ordre est égal à 0 la courbe  $C_0 \left( \frac{I_{Fmax}-I_F}{I_{Fmax}} \right) = f(t)$  devrait donner une droite décroissante (Figure VI.5A). Cependant, l'allure de cette figure présente une courbe qui n'est pas une droite ce qui signifie que la cinétique de formation du complexe n'est pas d'ordre 0. En revanche, cette courbe ressemble soit à une exponentielle décroissante soit à une hyperbole. Si

## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINÉTIQUE DÉTAILLÉE DE LA REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTHALALDEHYDE ET L'AGMATINE

---

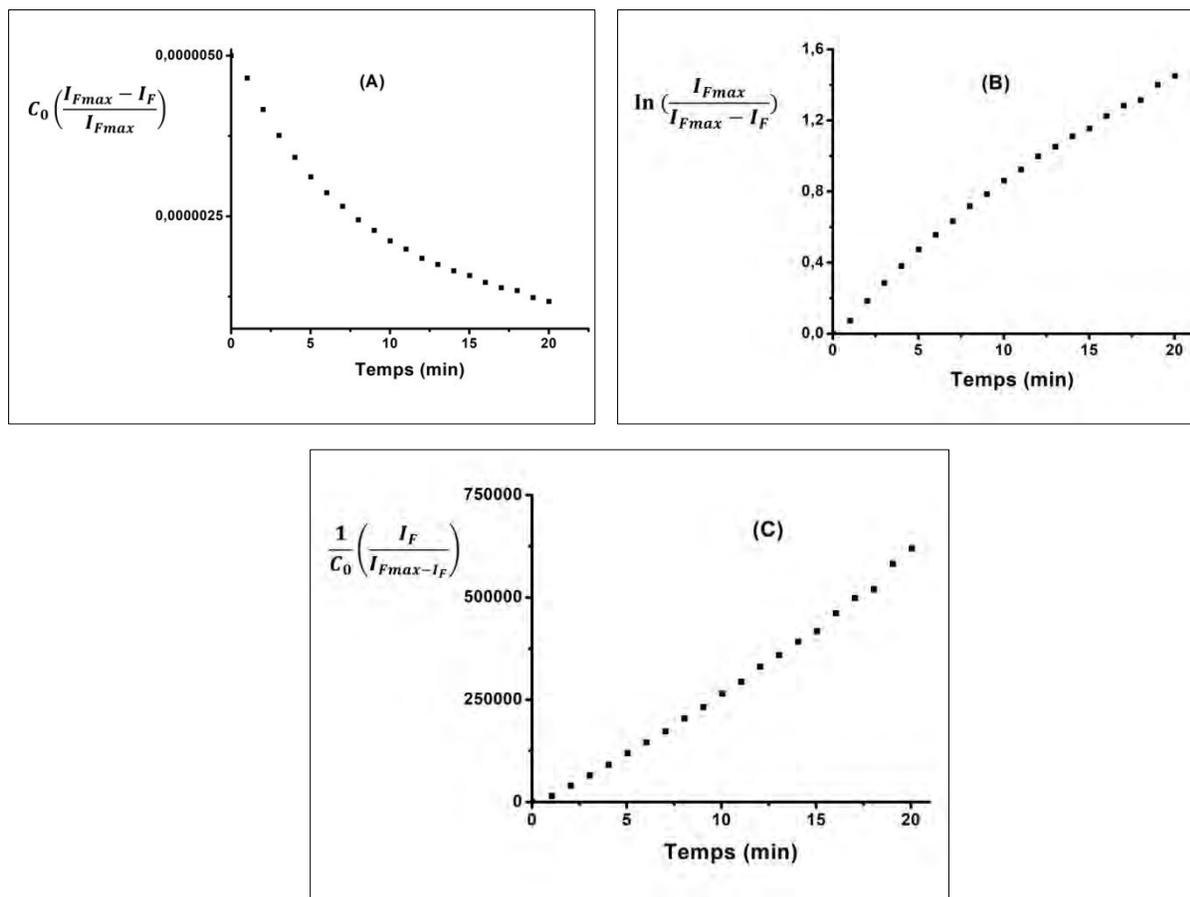
elle est une exponentielle décroissante la cinétique serait d'ordre 1 ; mais si elle est une hyperbole la cinétique serait d'ordre 2.

On peut donc vérifier si l'ordre est égal à 1 ou 2

**Si l'ordre est égal à 1** la courbe  $\ln\left(\frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax}-I_F}\right) = f(t)$  devrait donner une droite de pente positive (Figure VI.5B). L'allure de cette courbe n'étant pas totalement une droite, cela indique que la cinétique n'est pas d'ordre 1. En revanche, on constate que la courbe obtenue a une concavité dirigée vers le bas.

**En fin, si l'ordre est égal à 2** la courbe  $\frac{1}{C_0} \left( \frac{I_F}{I_{Fmax}-I_F} \right) = f(t)$  devrait donner une droite de pente positive (Figure VI.5C). De même on constate que l'allure de la courbe n'est pas totalement une droite, donc la cinétique n'est pas d'ordre 2. Cependant, on obtient une courbe dont la concavité est dirigée vers le haut.

**CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA  
REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET  
L'AGMATINE**



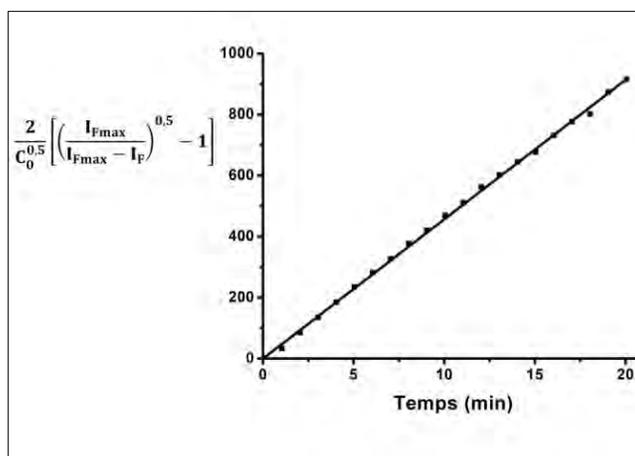
**Figure VI.5:** Vérification des cinétiques de la formation du complexe OPA-AGM : (A) d'ordre 0 ; (B) d'ordre 1 et (C) d'ordre 2

Il est constaté d'après les trois figures que la cinétique entre l'OPA et l'AGM n'est ni d'ordre 0, ni d'ordre 1 et ni d'ordre 2. Cependant, la représentation de la cinétique d'ordre 1 a une concavité dirigée vers le bas pendant que celle d'ordre 2 est dirigée vers le haut. Ceci nous a permis d'étudier les ordres compris entre 1 et 2. Pour cela on a commencé par vérifier l'ordre 1,5.

Si la cinétique est d'ordre 1,5, la courbe  $\frac{2}{C_0^{0,5}} \left[ \left( \frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax} - I_F} \right)^{0,5} - 1 \right] = f(t)$  (Eq.33) devrait donner une droite de pente positive égale à la constante de vitesse K. Effectivement cette courbe (Figure VI.6) donne une droite de pente positive avec un coefficient de corrélation supérieur à

## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINÉTIQUE DÉTAILLÉE DE LA RÉACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDÉHYDE ET L'AGMATINE

0,999, proche de l'unité. La valeur de cette constante de vitesse  $K$  (pente) est égale à  $47,28 M^{-\frac{1}{2}} \text{min}^{-1}$ . Ainsi, on peut bien noter que la cinétique de cette réaction est non loin d'ordre 1,5.



**Figure VI.6:** Vérification de l'ordre 1,5 de la cinétique de la réaction du complexe OPA-AGM

Pour plus de précision, il a été vérifié respectivement le cas où l'ordre  $n$  serait égal à 1,3 ; 1,4 ; 1,6 et 1,7 en utilisant l'équation 33 (chapitre III). Dans tous ces cas on a obtenu des droites de pentes positives avec des coefficients de corrélation proches de l'unité comme indiqué dans le tableau VI.2. Cependant, ce tableau montre que le coefficient de corrélation correspondant à 1,5 est plus proche de l'unité. En plus, ces coefficients s'éloignent de l'unité au fur et à mesure que la valeur estimée de  $n$  s'écarte de 1,5. Pour toutes ces raisons on peut conclure avec certitude à un  $10^{\text{ème}}$  près que la réaction d'association entre l'OPA et l'AGM est bien d'ordre global 1,5.

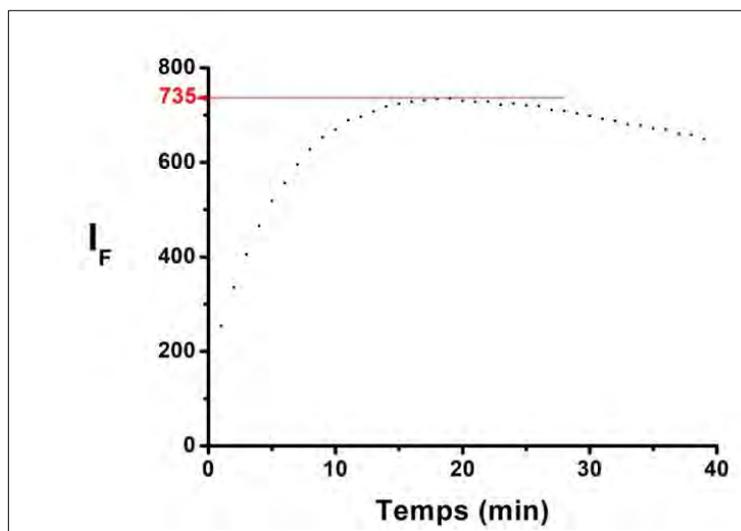
## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET L'AGMATINE

**Tableau VI.2:** Variation du coefficient de corrélation en fonction de l'ordre de réaction de la formation du complexe OPA-AGM

Coefficient de corrélation ( $r^2$ )	Ordre $n$ de la réaction
0,99860	1,3
0,99936	1,4
<b>0,99979</b>	<b>1,5</b>
0,99972	1,6
0,99927	1,7

### VI.2.2 Détermination des ordres partiels par rapport à l'AGM et l'OPA

Pour déterminer l'ordre partiel de la cinétique de formation du complexe OPA-AGM par rapport à l'agmatine ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) on a travaillé avec un grand excès d'OPA ( $10^{-3}$  M). L'évolution de l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM en fonction du temps est représentée par la figure VI.7. Il est noté que l'intensité de fluorescence augmente en fonction du temps jusqu'à atteindre un maximum au bout de 20 min pour décroître ensuite.



**Figure VI.7:** Evolution de l'intensité de fluorescence du complexe OPA-AGM en fonction du temps ( $[AGM]=5 \cdot 10^{-6}$  M,  $[OPA]=10^{-3}$  M)

**CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA  
REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET  
L'AGMATINE**

---

Ainsi, d'après l'équation 27 (chapitre III) on peut écrire :

$$V = KC_0^p C^q = K' C^q \text{ avec } C'_0 = 10^{-3} M = [OPA], C = C_0 - x = [AGM]_t \text{ et } K' = KC_0'^p.$$

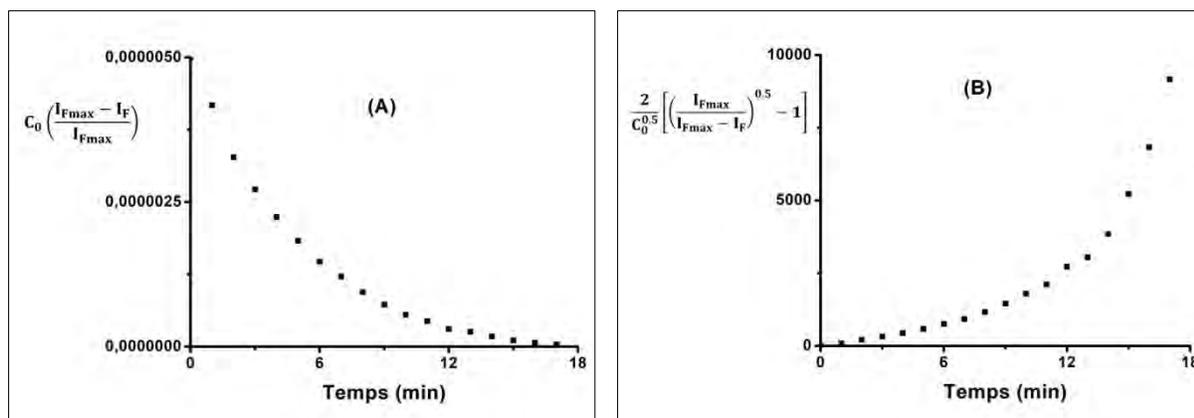
$K''$  est appelée constante apparente d'ordre  $q$ .

Les résultats précédents montrent que l'ordre global ( $n$ ) de la réaction est égal à 1,5 ; ce qui implique que l'ordre partiel  $q$  par rapport à l'agmatine est compris entre 0 et 1,5 car  $n = p + q$ .

Ainsi, on a commencé par vérifier les cas extrêmes : premier cas  $q = 0$  et deuxième  $q = 1,5$  avant de vérifier les ordres intermédiaires.

Si  $q = 0$  d'après l'équation 32 la courbe  $C_0 \left( \frac{I_{Fmax} - I_F}{I_{Fmax}} \right) = f(t)$  représentée par la figure VI.8A devrait donner une droite de pente égale à  $K''$  et d'ordonnée à l'origine égale à  $C_0$ . L'expérience montre que cette courbe n'est pas une droite ; elle ressemble plutôt à une exponentielle décroissante ou à une hyperbole. Cependant, elle ne pourrait être une hyperbole car l'ordre global est égal à 1,5. Si elle est une exponentielle décroissante l'ordre partiel par rapport à l'AGM serait égale à 1, ce qui reste à vérifier.

Si  $q = 1,5$  d'après l'équation 33, la courbe  $\frac{2}{C_0^{0,5}} \left[ \left( \frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax} - I_F} \right)^{0,5} - 1 \right] = f(t)$  représentée par la figure VI.8B devrait donner une droite de pente  $K''$ . L'expérience montre que l'allure de cette courbe ne représente pas une droite. Ceci indique que la cinétique n'est pas d'ordre 1,5.



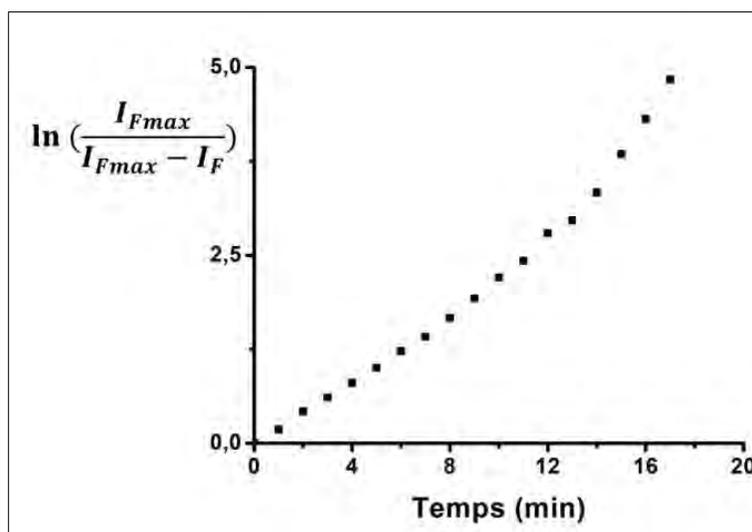
**Figure VI.8:** Vérification d'ordres de réaction de la formation du complexe OPA-AGM : (A) ordre 0 et (B) ordre 1,5

## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINÉTIQUE DÉTAILLÉE DE LA RÉACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTHALALDEHYDE ET L'AGMATINE

---

Ainsi, cette cinétique n'est ni d'ordre 0 ni d'ordre 1,5. Puisque la figure VI.8A ressemble à une exponentielle décroissante, il est judicieux de vérifier si l'ordre est égal à 1.

Si l'ordre est égal à 1, d'après l'équation 37 (chapitre III), la courbe  $\ln\left(\frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax}-I_F}\right) = f(t)$  représentée par la figure VI.9 devrait donner une droite de pente  $K''$ . Cependant, l'expérience montre que cette figure n'est pas une droite et sa concavité est dirigée vers le haut, il serait alors plus judicieux de vérifier les ordres inférieurs à 1.



**Figure VI.9:** Vérification d'ordre partiel 1 par rapport à l'AGM de la cinétique de formation du complexe OPA-AGM

En plus, la figure VI.10 représente les courbes vérifiant les différents ordres partiels étudiés (entre 0,6 et 1,1). On remarque que ces diverses courbes ont toutes une concavité dirigée soit vers le haut soit vers le bas, à l'exception de celle d'ordre 0,8 qui est linéaire. Ceci prouve que l'ordre partiel de cinétique de la formation du complexe OPA-AGM par rapport à l'AGM est proche de 0,8.

**CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA  
REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET  
L'AGMATINE**

---

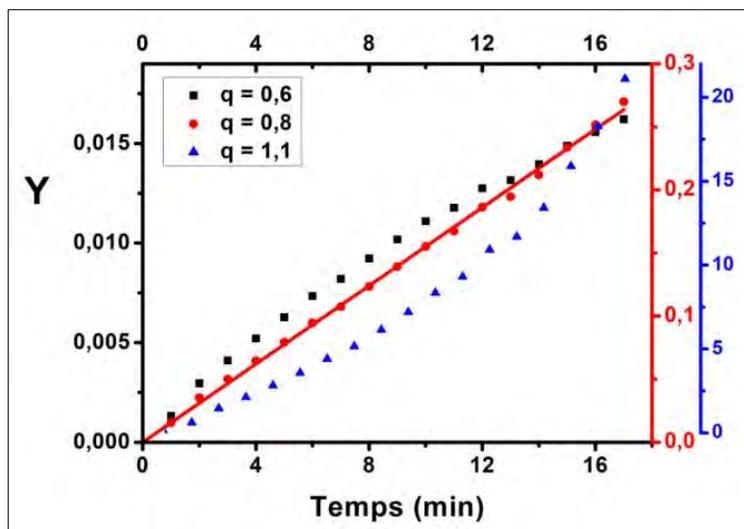
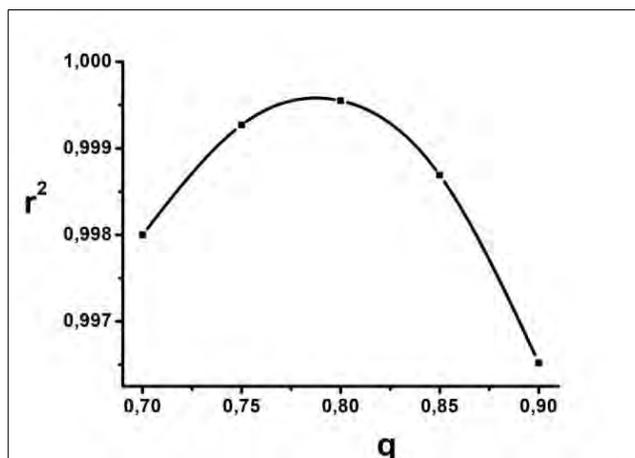


Figure VI.10: Vérification des différents ordres partiels  $q$  entre 0,6 et 1,1 de cinétique de formation du complexe OPA-AGM par rapport à l'AGM  $q = 1 : Y = \ln\left(\frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax}-I_F}\right)$ ,  $q \neq 1 : Y =$

$$\frac{1}{(q-1)c_0^{q-1}} \left[ \left( \frac{I_{Fmax}}{I_{Fmax}-I_F} \right)^{q-1} - 1 \right]$$

Pour déterminer la valeur de  $q$  avec précision on a vérifié respectivement le cas où  $q$  est égal à 0,7 ; 0,75 ; 0,8 ; 0,85 et 0,9. Pour ces valeurs de  $q$ , des droites de pentes positives avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,99 (Figure VI.11) ont été obtenues. Cependant, la courbe  $r^2$  en fonction de l'ordre  $q$  admet un maximum au point  $r^2$  supérieur à 0,999 et  $q$  sensiblement égale à 0,8. En plus on remarque que les valeurs des coefficients diminuent de part et d'autre quand on s'éloigne de la valeur 0,8 (Figure VI.11). Ainsi, on peut en conclure avec certitude à un 10<sup>ème</sup> près que l'ordre partiel de cinétique de la formation du complexe OPA-AGM par rapport à l'agmatine est bien égal à 0,8.

**CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA  
REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET  
L'AGMATINE**



**Figure VI.11:** Variation du coefficient de corrélation ( $r^2$ ) en fonction de l'ordre partiel de réaction de la formation du complexe OPA-AGM par rapport à l'AGM

Par ailleurs, l'ordre global de la réaction entre l'OPA et l'AGM étant égal à 1,5 et l'ordre partiel par rapport à l'AGM à 0,8, on en déduit l'ordre partiel par rapport à l'OPA devrait être donc égal à 0,7.

A partir des constantes de vitesse on a pu déterminer les vitesses initiales ( $V_0$ ) et les temps de demi-réactions ( $t_{1/2}$ ) en utilisant respectivement les équations 6 et 13 du chapitre III. Ainsi, pour l'ordre global 1,5, on trouve  $V_0 = 5,1 \cdot 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$  et  $t_{1/2} = 8,12$  minutes. Pour l'ordre partiel par rapport à l'AGM (excès d'OPA), on trouve  $V_0 = 8,9 \cdot 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$  et  $t_{1/2} = 3,6$  min les résultats sont regroupés dans le tableau VI.3.

**Tableau VI.3:** Résultats des paramètres de la cinétique de formation du complexe OPA-AGM

$C_r$	Ordre	$r^2$	$V_0$ ( $\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
$[OPA] = [AGM] = 510^{-6} \text{ M}$	1,5 <sup>a</sup>	0,9998	$5,110^{-7}$	8,12
$[AGM] = 510^{-6} \text{ M}; [OPA] = 10^{-3} \text{ M}$	0,8 <sup>b</sup>	0,9996	$8,910^{-7}$	3,6

$C_r$ : concentration des réactifs, <sup>a</sup>ordre global de la réaction et <sup>b</sup>ordre partiel par rapport à l'agmatine.

$V_0$ : vitesse à la concentration initiale de l'AGM et de l'OPA

## CHAPITRE VI : ETUDE THERMODYNAMIQUE ET CINETIQUE DETAILLEE DE LA REACTION DE FORMATION DU COMPLEXE ENTRE L'ORTHOPHTALALDEHYDE ET L'AGMATINE

---

Ce tableau montre que la vitesse initiale ( $V_0$ ) de la réaction entre l'OPA et l'AGM est plus élevée quand l'OPA est en excès. De même, le temps de demi-réaction ( $t_{1/2}$ ) obtenu avec un excès d'OPA est beaucoup plus faible que celui obtenu si la concentration de l'OPA est égale à celle de l'AGM. Ainsi, l'excès d'OPA accélère la réaction de formation du complexe entre l'OPA et l'AGM.

Cette grande quantité d'OPA utilisée est d'une grande importance. En effet, lors de l'analyse industrielle de l'agmatine dans différentes matrices telles que les produits halieutiques, les fruits, le vin et les liquides physiologiques, le temps joue un rôle important. Aussi est-il judicieux de travailler avec de grande concentration d'OPA pour accélérer la réaction de complexation en un temps relativement court. En plus, pour éviter les effets d'interférences avec d'autres amines il est nécessaire d'utiliser un grand excès d'OPA.

## Références

- [1] Marliere F., Fable S., Godefroy F., Marchand C., Blanque T.J.P, Granier D. Méthodologie de prélèvement et d'analyse du glyphosate dans l'air ambiant. Note du LCSQA 2012
- [2] Zuman P. Reactions of Orthophthalaldehyde with Nucleophiles. *Chemical Reviews*, 104 (2004) 3218- 3238.
- [3] Hbkanson R. and Riinnberg A.L. Improved Fluorometric Assay of Histamine: Condensation With O-phthalaldehyde at -20 °C. *Analytical Biochemistry*, 60 (1974), 560-667
- [4] Alvarer-Coque M.C.G., Medina Hernández, Camanas R.M.V. Fernández C.M. Formatin and instability of o-phthalaldehyde Derivation of Amino Acids. *Analytical Biochemistry* 178 (1989) 1-7.
- [5] Gyimesi-Forràs K., Leitner A., Akasaka K., Lindner W. Comparative study on the use of ortho-phthalaldehyde, naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and anthracene-2,3-dicarboxaldehyde reagents for  $\alpha$ -amino acids followed by the enantiomer separation of the formed isoindolin-1-one derivatives using quinine-type chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1083 (2005) 80-88.
- [6] Rosenberg N. Allergies respiratoires professionnelles chez les personnels de santé. *INRS N°132* (2012) 77-92.
- [7] Walsh S.E., Maillard J-Y., Russell A.D. Ortho-phthalaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (1999) 1039-1046.
- [8] Khonté A., Thiaré D.D., Diop C., Cissé L., Delattre F., Coly A., Gaye-Seye M.D., Sall N.D., Tine A. New Spectrofluorimetric Method for Determining Serotonin: Application to Human Urine. *International Journal of Chemistry*, 7 (2015) 1-14.
- [9] Aaron J-J., Tine A. Effect of pH on the fluorescence and phosphorescence spectra of indolecarboxylic acids. Evidence for the existence of a singlet excited-state indole acide dianion. *Journal luminescence*, 33 (1985) 33-51.
- [10] Nedeljko P, Turel M, Kosak A, Lobnik A. Synthesis of hybrid thiol-functionalized SiO<sub>2</sub> particles used for agmatine determination. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 79:3 (2016) 497-496. Doi: 10.1007/s10971-016-4030-3.

## Références partie C

---

- [11] Nedeljko P., Turel M., Lobnika A. Fluorescence-based determination of agmatine dietary supplements. *Analytical Letters*, 46:10 (2015) 1619-1628. Doi: 10.1080/00032719.2014.991962.
- [12] Gómez-Alonso S, Hermosin-Gutiérrez I, Garcia-Romero E. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 608-613.
- [13] Triki M., Jimenez-Colmenero F., Herrero A.M., Ruiz-Capillas C. Optimisation of a chromatographic procedure for determination biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system. *Journal of Food chemistry*, 130 (2012) 1066-1073. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.134.
- [14] Smit A.Y., du Toit W.J., Stander M., du Toit M. Evaluating the influence of maceration practices on biogenic amine formation in wine. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (2013) 297-307. Doi: 10.1016/j.lwt.2013.01.006.
- [15] Romano P., Capece A., Poeta C. Biogenic amine formation in alcoholic fermentation. *Bulletin de l'OIV*, 80 (2007) 914-915.
- [16] Arena M.E., de Nadra M.C. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90:2 (2001) 158-162.
- [17] Kvasnicka F., Voldrich M. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1103 (2006) 145-149.
- [18] De Borba B.M., and Rohrer J.S. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography*, 1155 (2007) 22-30.
- [19] Benner R.A.J.R., Staruszkiewicz W.F., Otwell W.S. Putrescine, Cadaverine, and Indole Production by Bacteria Isolated from Wild and Aquacultured Penaeid Shrimp Stored at 0, 12, 24, and 368 C. *Journal of Food Protection*, 67 (2004) 124-133.
- [20] Thaw M.M., Aung O., Myint A., Bisswanger H. Determination of biogenic amines in different shrimp species for export. *Journal of the Myanmar Academy of Arts and Science*, 2 (2004) 51-66.

- [21] Bueno-Solano C., Lopez-Cervantes J., Sánchez-Machado D.I., Campas-Baypoli O.N. HPLC determination of histamine, tyramine and amino acids in shrimp by products. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 23 (2012) 96-102.
- [22] Douabalé S.E., Dione M., Coly A., and Tine A. Contributions to the determination of histamine rate by measuring out the histamine-orthophthalaldehyde complex in the absorption and fluorescence. *Journal of Talanta*, 60 (2003) 581-590.
- [23] Traoré M., Kital K., Mbaye M., Mbaye O.M.A., Diop C., Camara M.K., Cissé L., Seye M.D.G., Coly A., and Tine A. New Spectrofluorimetric Method for Determining Cadaverine Following Derivation with Orthophthalaldehyde: Application in Fish Tissue. *International Journal. of Chemistry*, 9 (2017) 10-18.
- [24] Faye A. Nouvelle méthode de dosage de la spermidine par voie spectrofluorimétrique. Mémoire de master II. UCAD-FST 2014.
- [25] De Carvalho M.A., Andrade P.F., Corbi F.C.A. A simple method to synthesize fluorescent modified gold nanoparticles using tryptamine as the reducing and capping agent. *Synthetic Metals*, 185 (2013) 61-65.
- [26] <https://vinsdumonde.blog/que-contient-un-verre-de-vin/> (consulté, le 28/02/2020).
- [27] Albarrcin W., Sanchez I.C., Gau R., Barat J.M. Salt in food processing; usage and reduction: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (2011) 1329-1336.
- [28] Einarsson H., Lauzon H.L. Biopreservation of Brined Shrimp (*Pandalus borealis*) by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (2) (1995) 669-676.
- [29] Gonçalves, A.A., Ribeiro, D.J.L. Effects of phosphate treatment on quality of red shrimp (*Pleoticus muelleri*) processed with cryomechanical freezing. *Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie*, 48:8 (2009), 1435-1438.
- [30] <https://www.aufeminin.com/ingredients/l-essentiel-sur-les-crevettes-et-gambas-s638652.html> (consulté, le 09/04/2019).
- [31] <http://www.canalvie.com/recettes/savoir-cuisiner/guide-des-aliments/crevette-nordique-1.1077313> (consulté, le 09/04/2019).
- [32] Dayal J.S., Ponniah A.G., Khan H.I., Madhu Babu E.P., Ambasankar K., Vasagam K.P.K. Shrimps-a nutritional perspective. *Current Science*, 104:11 (2013) 1487-1491.

- [33] Gates K.W. In Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean, Vazhiyil Venugopal. Journal of aquatic Food Product Technology, 19 (2010) 48-54.
- [34] López-Caballero M.E., Gonçalves A., Nunes M.L. Effect of CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-containing modified atmospheres on packed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). European Food Research Technology, 214 (2002) 192-197.
- [35] Al-Harbi A.H. Bacterial Flora of Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), Cultured in Concrete Tanks in Saudi Arabia, Journal of Applied Aquaculture, 14:1-2 (2003) 113-124. Doi: 10.1300/J028v14n01-08.
- [36] Gomez-Gil B., Tron-Mayén L., Roque A., Turnbull J.F., Inglis V., Guerra-Flores A.L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus Íannamei*. Aquaculture, 163 (1998) 1-9.
- [37] Jaffrès E. Caractérisation moléculaire de l'écosystème microbien complexe de la crevette cuite et étude des flores d'altération. Thèse de doctorant, Université de Nantes, (2009).
- [38] Yamanaka H., Shiomi K., Kikuchi T. Agmatine as a Potential Index for Freshness of Common Squid (*Todarodes pacificus*). Journal of Food Science, 52:4 (1987) 936-938.
- [39] Keynan O., Mirovsky Y., Dekel S., Gilad V.H, Gilad G.M. Safety and efficacy of dietary agmatine sulfate in lumbar disc-associated radiculopathy. An open-label, dose-escalating study followed by a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Pain Medicine, 11 (2010) 356-368.
- [40] Diaw P.A., Mbaye O.M.A., Gaye-Seye M.D., Aaron J.J., Coly A., Tine A., Oturan N., Oturan M.A. Photochemically-Induced Fluorescence Properties of Two Benzoyl- and Phenylurea Pesticides and Determination in Natural Waters. Journal of Fluorescence, 24 (2014) 1319-1330. Doi: 10.1007/s10895-014-1418-8.
- [41] Ozyurt G., Kuley E., Ozkutuk S., Ozogul F. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. Food of Chemistry, 114 (2009) 505-510.
- [42] Ruiz-Capillas C., Moral A. Production of Biogenic Amines and Their Potential Use as Quality Control Indices for Hake (*Merluccius merluccius*, L.) Stored in Ice. Journal of Food Science, 66:7 (2001) 1030-1032.

- [43] Ruiz-Capillas C., Moral A. Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Journal of Food Chemistry*, 89 (2005) 347-354.
- [44] Degnon R.G., Dahouenon-ahoussi E., Adjou E.S., Ayikpe O., Tossou S., Soumanou M.M., Sohounhloue D.C.K. Impact des traitements post-capture sur la qualité microbiologique des crevettes (*penaeus spp*) du lac Ahémé au Bénin destinées à l'exportation. *Journal of Applied Biosciences*, 53 (2012) 3749-3759.
- [45] Radaniela A.T. Contribution à l'étude d'assurance qualité et détermination de la date limite de consommation des crevettes entières crues fraîches : cas de la société Aquamen E.F Morondava. Mémoire, Université d'Antananarivo Madagascar, (2004) 104.
- [46] Antoine F.R., Wep C.I., Otwell W.S., Sims C.A., Littell R.C., Hogle A.D., Marshall M.R. analysis of biogenic amines and their precursor (coryphae" eiippurus)' free amino acids in mahi-mahi. *Journal of Food Biochemistry*, 26 (2002) 131-152.
- [47] Mietz J.L., Karmas E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 61 (1978) 139-145.
- [48] Visciano P., Schirone M., Tofalo R., Suzzi G. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Food Microbiology*, 3: 188 (2012) 1-10. Doi: 10.3389/fmicb.2012.00188.
- [49] Gokoglu N., Yerlikaya P., Cengiz E. Biogenic amines formation in sardine marinade during refrigerated storage. *Journal of Food Biochemistry*, 27 (2003) 435-447.
- [50] Laghmari H. El Marrakchi A. Appréciation organoleptique et physico-chimique de la crevette rose *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) conservée sous glace et à température ambiante. *Revue Médecine Vétérinaire*, 156 : 4 (2005) 221-226.
- [51] Botineau M. *Les Plantes du Jardin médiéval*. Belin 2<sup>ème</sup> édition (2003) 192.
- [52] Buchter-Weisbrodt H. Raisins. Chantecler (2004) 79.
- [53] Cathiard-Thomas M., Pezard C. La santé par le raisin et la vinothérapie. *Medicisentre-lacs*, (1998) 122.
- [54] Lefief-Delcourt A. *Le raisin malin*. Leduc.S Edition, (2010) 207.
- [55] Mambrini C. « In vino veritas » : polyphénols du raisin et leurs applications. Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, (2004).

- [56] Toussaint G. Les vertus du raisin. *Collectorsante Abyx*, (2007) 38.
- [57] Bauza T., Kelly M.T., Blaise A. Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and Syrah grapes and wine of the Rhone Valley. *Journal of Food Chemistry*, 105 (2007) 405-413.
- [58] Sass-Kiss A., Szerdahelyi E., Hajos G. Study of biologically active amines in grapes and wines. *Chromatographia Supplement*, 51 (2000) 316-320.
- [59] Aymé M. Boire un verre de vin par jour augmente la longévité. (1999) 1-3.
- [60] Giovannoni J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16 (2004) 170-180.
- [61] Fortes A.M. and Agudelo-Romero P. Polyamine Metabolism in Climacteric and Non-Climacteric Fruit Ripening. *Polyamines: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1694 (2017) 433-447. Doi: 10.1007/978-1-4939-7398-9-36.
- [62] Leitao M.C., Marques A.P., San Romao M.V. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*, 16 (2005) 199-204.
- [63] Santos M.H.S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29 (1996) 213-231.
- [64] Bauza T., Blake A., Dumas F., Cabanis J.C. Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*. 707 (1995) 373-379.
- [65] Galgano F., Favati F., De Giorgio A., Caruso M. and Lacertosa, G. Health and consumption of wine: study of polyphenols and biogenic amines in wines of South Italy. In "Ricerche innovazioni per l'industria alimentare, A cura di S. Porretta, Chiriotti Editori Pinerolo (TO), 6 (2004) 1021-1028.
- [66] O'Byrne P. *Red Wine and Health*. Nova Science Publishers, New York. (2009) 173-203.
- [67] Dimicoli J-l., Hélène G. Interactions entre acides aminés et acide nucléiques. III-étude par absorption et résonance magnétique nucléaire de la formation de complexes entre le tryptophane et les constituants des acides nucléiques. *Journal of Biochimie*, 53 (1971) 331-345.

## CONCLUSION GENERALE

---

### CONCLUSION GENERALE

Dans ce présent travail, deux méthodes de dosage de l'agmatine ont été développées, l'une en absorption et l'autre en fluorescence. Une étude thermodynamique et la cinétique de la réaction de formation du complexe OPA-AGM ont été étudiées.

- En absorption, l'absorbance de l'agmatine dans notre domaine d'étude est très faible. En revanche, celle du complexe OPA-AGM est assez élevée, c'est pourquoi nous avons accès notre étude sur l'absorption du complexe principalement dans le domaine de l'UV. Son spectre d'absorption comprend deux bandes dont la principale admet un pic à 328 nm. Selon la stoechiométrie de type 1 :1 du complexe, les paramètres analytiques ont été optimisés au pH 11 avec un temps de stabilisation de 20 minutes après avoir agité le mélange OPA-AGM. Des droites de calibration linéaires avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,999, ont été obtenues dans tous les solvants utilisés. A partir de ces droites, les limites de détection et de quantification ont été trouvées respectivement entre 0,10 µg/mL et 0,725 µg/mL et entre 0,350 µg/mL et 9,283 µg/mL. Ces faibles limites montrent la bonne sensibilité de la méthode. Les déviations relatives standards obtenues comprises entre 1,45% et 5,3% attestent la bonne reproductibilité de nos mesures. Les résultats des limites de tolérance obtenues avec les amines biogènes montrent que la sérotonine interfère plus dans le dosage de l'agmatine en absorption. En revanche, la tryptamine est l'une des amines biogènes les moins interférentes. Les études d'interférence menées avec les sels montrent que le CaCl<sub>2</sub> est le plus interférent suivi du FeCl<sub>2</sub> puis du NaCl. En revanche, pour le MgSO<sub>4</sub> et le Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aucune interférence n'a été notée.

- En fluorescence, une nouvelle méthode d'analyse de l'agmatine par voie spectrofluorimétrique a été développée. L'analyse de l'agmatine a été faite à partir du complexe OPA-AGM. La stoechiométrie de ce complexe trouvée étant de type 1 :1, les paramètres analytiques sont optimisés au pH 13 avec un temps de stabilisation de 20 minutes à la température de 25 °C. Des droites de calibration linéaires avec des coefficients de corrélation proches de l'unité, ont été obtenues dans tous les solvants utilisés. A partir de ces droites, les limites de détection (LOD) comprises entre 0,012 ng/mL et 2,488 ng/mL et des limites quantification (LOQ) entre 0,133 ng/mL et 6,238 ng/mL ont été trouvées. Ces faibles limites de détection et de quantification indiquent la bonne sensibilité et précision de notre méthode. De

## CONCLUSION GENERALE

---

même, les faibles déviations relatives standards obtenues comprises entre 0,083% et 2% montrent la bonne reproductibilité des mesures. De même, l'étude d'interférence montre que la plupart des amines biogènes et certains sels interfèrent plus ou moins avec l'agmatine.

En application, le taux d'agmatine dans les crevettes, dans le raisin vert et dans les boissons fortifiées a été déterminé. Dans tous les cas, des droites de calibration et d'additions standards parallèles ont été obtenues. Ce grand parallélisme montre que les effets d'interférence sont négligeables durant ces différents dosages.

Des taux massiques de 0,41 g/Kg pour les gambas, de 0,26 g/Kg pour les bouquets frais et 0,95 g/Kg pour les bouquets séchés ont été obtenus à la température ambiante (première jour de prélèvement). Cependant, ces taux varient dans le temps et avec la température de conservation des échantillons. Il est montré que les crevettes sont mieux conservées à la température de -10 °C suivi de +4 °C. A la température de +25°C, les crevettes ne pourraient être conservées qu'un seul jour avant altération. Pour l'ensemble des mesures, des pourcentages de recouvrements compris entre 96,3% et 103,4% ont été trouvés, confirmant ainsi l'absence d'effet de matrice nottoire durant le dosage de l'agmatine dans les crevettes.

Pour le raisin vert un taux massique de 200 mg/Kg a été trouvé avec un pourcentage de recouvrement compris entre 102,18% et 105,29%. Ces résultats confirment également la non implication d'effet de matrice et la bonne reproductibilité des mesures dans le raisin.

L'application de cette méthode de l'analyse de l'agmatine dans les boissons fortifiées (vin et bière) a été effectuée. En moyenne, des pourcentages de récupération compris entre 94% et 105% ont été obtenus. Ces pourcentages de récupération proches de 100% montrent qu'il est possible de doser l'agmatine avec une bonne précision dans le vin ou la bière avec des effets de matrice négligeables.

- L'étude thermodynamique montre que les constantes d'association entre l'OPA et l'AGM augmentent remarquablement quand on élève la température. La valeur positive de l'enthalpie  $\Delta H$  de la réaction de complexation montre que celle-ci est endothermique. Les études ont montré que la variation d'entropie  $\Delta S$  est positive donc la formation du complexe se fait avec un désordre permanent. Cependant, la valeur négative de l'énergie libre  $\Delta G$  montre que la réaction entre

## CONCLUSION GENERALE

---

l'OPA et l'AGM est spontanée. On peut donc doser de l'agmatine à la température ambiante sans soucis de refroidissement même dans les pays chauds sans avoir besoin de catalyseur.

- La cinétique de la réaction montre que la formation du complexe entre l'OPA et l'AGM admet un ordre global de 1,5 avec un ordre partiel par rapport à l'AGM de 0,8. Il ressort de cette étude que la vitesse de cette réaction de complexation augmente avec la teneur en OPA et inversement aux temps de demi-réaction. Ainsi, l'excès d'OPA accélère la réaction ; ceci est un avantage certain au cours du dosage industrielle de l'agmatine. En effet le dosage de l'agmatine dans un échantillon alimentaire se fait avec un excès d'OPA.

Cette étude montre que les méthodes d'absorption et de fluorescence ont très précises, faciles à mettre en œuvre et moins coûteuses.

## PERSPECTIVES

Le travail ici mené, ouvre un large champ de perspectives de recherche. Ainsi, il serait opportun :

- de déterminer la structure du complexe OPA-AGM afin de pouvoir calculer ces moments dipolaires dans les états excité et fondamental par effet solvatochromique,
- d'appliquer cette nouvelle méthode à d'autres matrices susceptibles de contenir l'agmatine telles que les légumes, les céréales, la viande, les poissons et d'autres fruits de mer,
- proposer une méthode de datation pour chaque espèces d'échantillons à doser à partir de la variation du taux d'agmatine au cours du temps connaissant le taux initial,
- de valider cette méthode d'analyse de l'agmatine dans les divers extraits alimentaires et s'orienter vers la certification,
- utiliser d'autres marqueurs fluorogéniques pour quantifier l'agmatine,
- appliquer cette méthode à l'analyse d'autres amines biogènes.

## Nom et Prénom du Candidat : KITAL Khémesse DIOUF

**Titre de la thèse : Nouvelles méthodes d'analyse de l'agmatine par voies spectrophotométriques d'absorption et de fluorescence : applications sur les crevettes, les raisins et les boissons - Cinétique et étude thermodynamique de la réaction de formation du complexe orthophthalaldéhyde-agmatine**

**Date et lieu de soutenance : 31 août 2020 à l'UCAD**

**Jury :** Président : Atanasse COLY, Professeur, UCAD  
Rapporteurs : Marina KOUSSEMON, Professeur UNA-COTE D'IVOIRE  
Abdoulaye DIOP, Professeur, UCAD  
Examineurs : Mame Diabou GAYE Seye, Professeur, UCAD  
Lamine CISSE, Professeur, UCAD  
Co-directeur : François DELATTRE, Professeur, ULCO-France  
Directeur de Thèse : Alphonse TINE, Professeur, UCAD

**Résumé :** L'agmatine (AGM) appartient à la famille des amines biogènes qui sont présentes naturellement chez les animaux et certains végétaux. A faible dose, ces amines ont des fonctions physiologiques, biologiques et pharmacologiques importantes dans l'organisme. Cependant, à une dose élevée ces amines deviennent toxiques.

Dans ce présent travail, nous avons développé deux méthodes de dosage de l'agmatine par voies spectrophotométrique UV-visible et spectrofluorimétrique. Son analyse a été faite sur la base du complexe formé entre celle-ci et le marqueur orthophthalaldéhyde (OPA). Dans les deux cas, il est montré que la stœchiométrie du complexe entre l'AGM et l'OPA est de type 1 : 1. De bonnes performances analytiques ont été trouvées aussi bien en absorption qu'en fluorescence.

En absorption, de faibles limites de détection et de quantification respectivement comprises entre 0,10 µg/mL et 0,725 µg/mL et entre 0,350 µg/mL et 9,283 µg/mL ont été trouvées. A notre connaissance ce sont les premiers résultats obtenus en absorption. A quelques exceptions près, il est montré que la plupart des amines biogènes et sels interfèrent faiblement dans le dosage l'agmatine en UV.

En fluorescence, la méthode développée par voie spectrofluorimétrique a montré de bonnes performances analytiques avec de très faibles limites de détection et de quantification comprises respectivement entre 0,012 ng/mL et 2,488 ng/mL et entre 0,133 ng/mL et 6,238 ng/mL. L'application de cette méthode sur les crevettes et les raisins a donné un pourcentage de recouvrement compris respectivement entre 96,3% et 103,4%, entre 102,18% et 105,29%. Pour les boissons fortifiées, un taux de récupération compris entre 94% et 105% a été trouvé. Tous ces résultats obtenus sont plus faibles que ceux trouvés dans la littérature.

L'étude thermodynamique montre que la réaction de formation du complexe OPA-AGM est endothermique, spontanée et avec un désordre croissant.

La cinétique de la réaction de complexation est d'ordre global 1,5 et d'ordre partiel par rapport à l'agmatine de 0,8. Cette étude montre que l'excès d'OPA accélère la réaction de formation du complexe entre l'OPA et l'AGM. Cet excès exalte également son intensité de fluorescence.

Les résultats obtenus montrent que l'analyse industrielle de l'agmatine peut se faire très rapidement à la température ambiante avec un excès d'OPA.

**Mots clés :** Amines biogènes, Agmatine, Orthophthalaldéhyde, Absorption, Fluorescence, crevettes, raisins, boissons, Thermodynamique, Cinétique

**Abstract :** Agmatine (AGM) belongs to the family of biogenic amines that occur naturally in animals and some plants. At low doses, these amines have important physiological, biological and pharmacological functions in the body. However, at high doses these amines become toxic.

In this work, we have developed two methods for the determination of agmatine by UV-visible spectrophotometry and spectrofluorimetry. Its analysis was done on the basis of the complex formed between agmatine and the orthophthalaldehyde (OPA) marker. In both cases, it is shown that the stoichiometry of the complex between AGM and OPA is 1:1. Good analytical performance was found in both absorption and fluorescence.

In absorption, low detection and quantification limits of 0.10 µg/mL to 0.725 µg/mL and 0.350 µg/mL to 9.283 µg/mL, respectively, were found. To our knowledge these are the first results obtained in absorption. With a few exceptions, it is shown that most biogenic amines and salts interfere slightly in the UV assay of agmatine.

In fluorescence, the method developed in spectrofluorimetry showed good analytical performance with very low detection and quantification limits ranging from 0.012 ng/mL to 2.488 ng/mL and from 0.133 ng/mL to 6.238 ng/mL, respectively. The application of this method on shrimps and grapes gave a percentage recovery of between 96.3% and 103.4% and between 102.18% and 105.29% respectively. For fortified drinks, a recovery rate between 94% and 105% was found. All these results are lower than those found in the literature.

The thermodynamic study shows, that the reaction of formation of the OPA-AGM complex is endothermic, spontaneous with increasing disorder.

The kinetics of the complexation reaction are of global order 1.5 and of partial order with respect to agmatine of 0.8. This study shows that excess OPA accelerates the complex formation reaction between OPA and AGM. This excess also enhances its fluorescence intensity.

The results obtained show that the industrial analysis of agmatine can be done very fast at room temperature with an excess of OPA.

**Keywords :** Biogenic amines, Agmatine, Orthophthalaldehyde, Absorption, Fluorescence, Shrimps, Grapes, Beverages, Thermodynamics, Kinetics.