

SOMMAIRE

DÉDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
SOMMAIRE	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS	V
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	VIII
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PARTIE I : GÉNÉRALITÉS SUR LA SPERMINE	4
I-1. Présentation de la spermine	5
I-2. Propriétés physico-chimiques de la spermine	5
I-3. Synthèse et dégradation de la spermine	6
I-3-1. Synthèse chimique	6
I-3-2 Dégradation de la spermine	7
I-4. Le niveau de spermine dans les aliments	10
I-5. Les effets physiologiques de la spermine	12
I-5-1. Chez les animaux	12
I-5-2. Chez les plantes.....	12
I-5-3. Chez l'homme	13
I-6. Spermine et cancer	13
I-7. Méthodes d'analyse de la spermine	14
I-7 -1. Les méthodes chromatographiques	14
I-7 -1-1. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	14
I-7-1-2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)	16
I-7-1-3. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	16
I-7-1-4. La chromatographique liquide ultra haute performance (CLUHP)	17
I-7-2. Électrophorèse capillaire (CE)	18
I-7-3. Les capteurs électrochimiques	18

I-7-4. Les méthodes colorimétriques	19
I-7-5. Les méthodes fluorimétriques	20
PARTIE II : Mise en évidence de la formation du complexe OPA-spermine en milieux aqueux	22
A) PARTIE EXPERIMENTALE.....	23
II-A.1. Produits utilisés.....	23
II-A.2. Instrumentation	23
II-A.3. Méthodologie pour la préparation des solutions.....	23
II-A.4. Détermination de la stœchiométrie du complexe OPA-SPM	24
II-A.4.1. Méthode des réactifs limitants	24
II-A.4.2. Méthode de JOB.....	24
II-A.5. Méthode de calcul des performances analytiques	25
B) RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	26
II-B.1 Mise en évidence du complexe OPA-SPM.....	26
II-B.2. Détermination de la stœchiométrie du complexe entre OPA et SPM.....	26
II-B.2.1. Par la méthode des réactifs limitants	26
II-B.2.2. Par la méthode de JOB	27
II-B.3. Étude de l'effet du pH sur l'absorbance du complexe OPA-SPM.....	28
II-B.4. Droite de calibration	29
II-B.5 Détermination des performances analytiques	30
CONCLUSION	31
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	33

LISTE DES ABREVIATIONS

- [1]** : référence bibliographique N°1
- OPA** : orthophtalaldéhyde
- SPM**: spermine
- ARG1**: arginase1
- ODC**: ornithine décarboxylase
- SPDSY**: spermidine synthase
- SPMSY**: spermine synthase
- dcAdoMet**: S-adénosylméthionine décarboxylée
- AdoMetDC**: S-adénosylméthionine décarboxylase
- AMD1** : Adenosylmethionine Decarboxylase 1
- SSAT** : N1-acétyltransférase
- PAOX**: N1-acétylpolyamine oxydase
- A** : ampérométrie
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- HPH** : hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie
- MAO** : monoamine oxydase
- pH** : potentiel d'hydrogène
- IMAO** : inhibiteur de la monoamine oxydase
- SWV** : voltampérométrie à onde carrée
- CLHP** : chromatographie liquide à haute performance
- CPG** : chromatographie en phase gazeuse
- MS** : spectrométrie de masse
- CI** : chromatographie ionique
- CCM** : chromatographie sur couche mince
- CLUHP** : chromatographie liquide ultra-haute performance
- CE** : électrophorèse capillaire
- UV** : ultra-violet
- LD** : limite de détection
- LQ** : limite de quantification
- PR** : pourcentage de récupération
- DP** : détecteur photométrique
- DF** : détecteur de fluorescence

Pt : platinum electrode
Au : electrode en or
SPE : électrode sérigraphiée
PAO : polyamine oxidase
DAO : diamine oxidase
MEDLL : mico-extraction liquide-liquide dispersive
SMO: spermine oxidase
IPAD: détection ampérométrique pulsée intégrée
CA : chronoampérométrie
CV : voltamétrie cyclique
DSR : déviation standard relative
SM/SM : spectrométrie de masse en tandem
ATP : adénosine-triphosphate
AAP : fluorescence induite par laser
MECK : chromatographie capillaire electrocinétique micellaire
AuNCs: nanoclusters d'or
CdTe: copolymères induits
P₁QD:points quantiques
I_F : Intensité de fluorescence

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Biosynthèse de la spermine	7
Figure 2: Dégradation de la spermine	9
Figure 3: Spectres d'absorption électronique : (a) OPA seul ; (b) SPM seule ; (c) OPA+ SPM et (a+b) spectre OPA + spectre SPM (calculé)	26
Figure 4: Evolution de l'absorbance du complexe OPA-SPM en fonction de la concentration de l'OPA (a) et effet de la concentration de l'OPA sur le spectre d'absorption du complexe OPA-SPM (b)	27
Figure 5: Courbe de JOB.....	28
Figure 6: Effet du pH sur le spectre d'absorption (a) et sur l'absorbance (b) du complexe OPA-SPM	29
Figure 7: Droites de calibration du complexe OPA-SPM dans de l'eau à pH 4	29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les caractéristiques physico-chimiques de la spermine	6
Tableau 2: Teneur moyenne en polyamines dans les matrices alimentaires	10
Tableau 3: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par CLHP	15
Tableau 4: Résultats d'analyse de la spermine dans le vin par CPG	16
Tableau 5: Résultats d'analyse de la spermine dans le poisson par CCM	16
Tableau 6: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par CLUHP	17
Tableau 7: Résultats d'analyse de la spermine dans plusieurs matrices par les techniques électrophorétiques	18
Tableau 8: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par les techniques électrochimiques	19
Tableau 9: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par les techniques colorimétriques	20
Tableau 10: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par les techniques fluorimétriques	20
Tableau 11: Les paramètres analytiques de la méthode spectrophotométrique	30

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les amines biogènes constituent un groupe de composés organiques très présentes dans l'alimentation. À forte dose, elles peuvent causer des intoxications alimentaires [1,2]. Donc la détermination du taux d'amines biogènes dans les aliments participe au renforcement de la sécurité alimentaire qui préoccupe de plus en plus la majeure partie des pays.

Au cours des dernières décennies, notre laboratoire a beaucoup contribué au développement de nouvelles méthodes spectrofluorimétriques et spectrophotométriques de dosage des amines biogènes [3-5]. C'est dans le même contexte que s'inscrit ce travail de recherche sur la spermine.

La spermine est une polyamine aliphatique qui existe sous forme de polycation à l'état physiologique et provient essentiellement de la décarboxylation enzymatique de l'ornithine. Elle intervient dans diverses voies biochimiques dans les cellules notamment dans la régulation génétique, l'inhibition des dommages à l'ADN, la stabilisation de la chromatine et la prévention de l'effritement de l'ADN [6]. Elle contribue à améliorer la maturation des cellules immunitaires intestinales [7], à réduire le stress de sevrage précoce des porcelets [8]. Elle a un effet sur le vieillissement des souris en diminuant le taux de mortalité [7]. Elle peut également agir comme un biomarqueur potentiel pour le diagnostic du cancer. En effet, des taux de spermine très bas ont été trouvés dans les échantillons sanguins de malades souffrant d'insuffisances rénales chroniques ou d'accidents vasculaires cérébraux, alors que des taux élevés ont été retrouvés dans l'urine, la salive et le foie de patientes atteintes d'un cancer du sein [6].

Plusieurs méthodes analytiques, à majorité chromatographiques, ont été élaborées pour la détermination quantitative et qualitative de la spermine dans différentes matrices [9-11]. Cependant, ces techniques nécessitent un équipement coûteux, des procédures compliquées et des opérateurs formés. Face à cette situation, il est impératif de mettre sur pied de nouvelles méthodes sensibles, peu couteuses et présentant une opérationnalité facile et simple.

Notre objectif principal est de développer et de valider une nouvelle méthode spectrophotométrique de dosage de la spermine dans les aliments et dans les liquides physiologiques. Donc nos travaux préliminaires qui font l'objet de ce mémoire servent surtout à mettre en évidence la formation du complexe orthophtalaldéhyde-spermine par la méthode spectrophotométrique UV-visible.

Notre mémoire est structurée en deux parties :

- la première partie est réservée aux généralités sur la spermine ; une revue bibliographique sur les méthodes d'analyse de la spermine y sera présentée ;
- la deuxième partie est consacrée aux résultats expérimentaux et discussions sur le complexe OPA- spermine. Une conclusion terminera ce mémoire.

PARTIE I : GÉNÉRALITÉS SUR LA SPERMINE

I-1. Présentation de la spermine

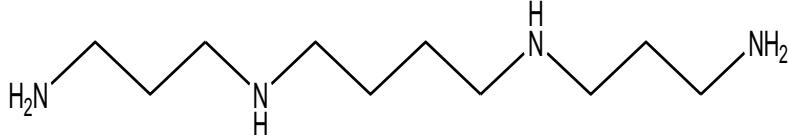
En 1678, Antoni van Leeuwenhoeck découvrit dans le sperme humain la présence de cristaux qui furent nommés spermines en 1888 par A. Landenburg et J. Abel [7]. La spermine est une polyamine :

- que l'on retrouve dans toutes les cellules eucaryotes comme les cellules végétales et animales [12] ;
- qui est l'un des composants naturels du sperme [13] ;
- qui joue un rôle important dans la croissance et la prolifération des cellules [14] ;
- qui agit comme un biomarqueur potentiel pour le diagnostic du cancer en raison de sa concentration élevée dans l'urine des patients cancéreux [6] ;
- à qui, on attribue des effets antioxydants, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques dans différents modèles de lésions tissulaires [13] ;
- qui a été considérée comme l'un des agents causant des intoxications alimentaires et donc pouvant être utilisée comme indicateur de la qualité des aliments [14].

I.2. Propriétés physico-chimiques de la spermine

En raison de sa structure chimique (**Tableau 1**), la spermine, est relativement stable en milieu acide et en milieu alcalin ; elle peut établir une liaison hydrogène avec des solvants hydroxylés tels que l'eau et l'alcool [7].

Tableau 1 : Les caractéristiques physico-chimiques de la spermine

Formule chimique	C ₁₀ H ₂₆ N ₄
Nom commercial	Spermine
Nom IUPAC	N,N'-bis(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine
Masse molaire	202,34 g.mol ⁻¹
Etat physique	Solide
Densité	0,937
Intervalle de fusion	28 à 30 °C
Température d'ébullition	130 °C
Aspect	Cristaux blanc
Structure Chimique	
Solubilité	Soluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques

I-3. Synthèse et dégradation de la spermine

I-3-1. Synthèse chimique

La spermine provient essentiellement de la décarboxylation enzymatique de l'ornithine selon le mécanisme suivant (**Figure 1**) :

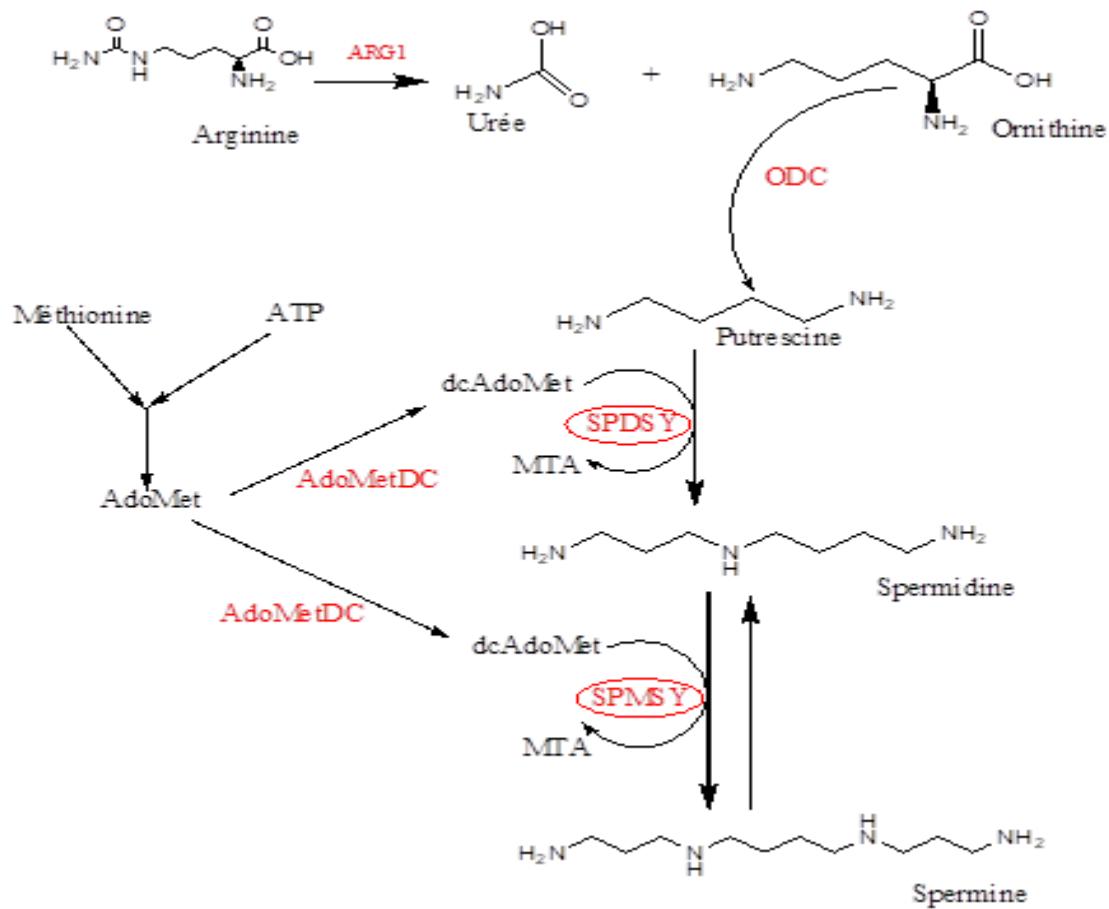


Figure 1: Biosynthèse de la spermine [15]

Dans la **figure 1**, nous notons que l'arginase 1 (ARG1), qui intervient dans le cycle de l'urée, catalyse la réaction donnant l'ornithine et l'urée à partir de l'acide aminé arginine. Puis, l'ornithine décarboxylase (ODC) produit, à partir de l'ornithine, de la putrescine. Cette dernière est convertie en spermidine puis en spermine par deux aminopropyltransférases spécifiques, la spermidine synthase (SPDSY) et la spermine synthase (SPMSY), respectivement. Le donneur d'aminopropyl pour ces réactions est la S-adénosylméthionine décarboxylée (dcAdoMet), produite par la S-adénosylméthionine décarboxylase (AdoMetDC) codée par le gène AMD1 [16].

I-3-2 Dégradation de la spermine

La spermine et la spermidine intracellulaires sont dégradées respectivement par la spermidine / spermine N1-acétyltransférase (SSAT) et la N1-acétylpolyamine oxydase (PAOX) [17]. Ce processus se déroule en deux temps (**Figure 2**) :

- ✓ la spermine et la spermidine sont tout d'abord acétylés en N1-acétylspermine et N1-acétyl-spermidine respectivement par la SSAT qui catalyse le transfert du groupe acétyle de l'acétyl-CoA ;
- ✓ dans un second temps, la PAOX, une enzyme peroxysomale, catalyse l'oxydation des polyamines N1-acétylées aboutissant à la formation d'une polyamine (putrescine ou spermidine selon le substrat initial) avec libération du 3-acétylaminopropanal (3-AAP) et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 [15].

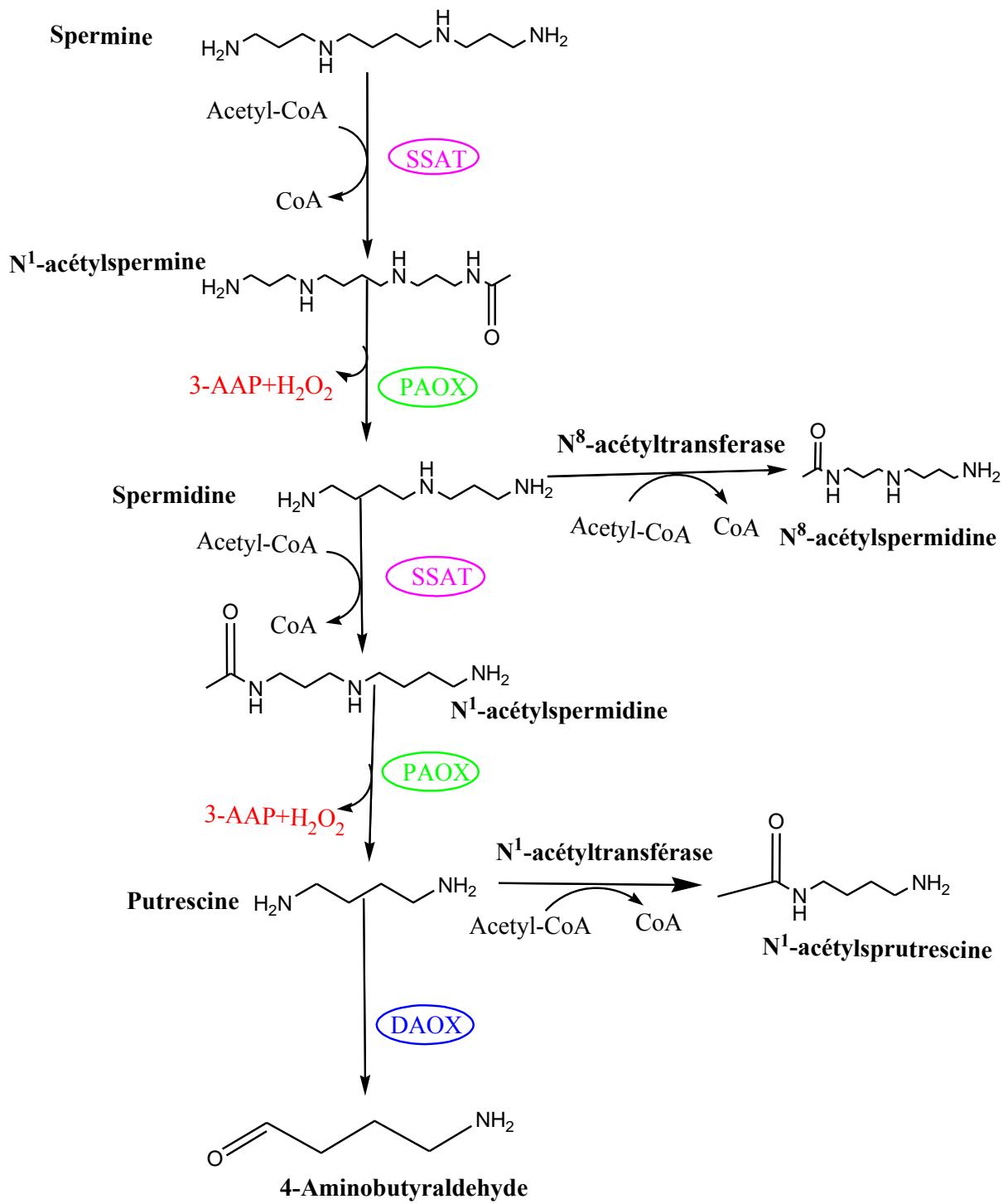


Figure 2: Dégradation de la spermine [15,17]

I-4. Le niveau de spermine dans les aliments

La spermine peut être trouvée dans les aliments d'origines animale et végétale, ainsi que dans le lait maternel et les préparations pour nourrissons [7]. Certains aliments sont riches en spermine notamment : les pois verts ($52,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), le brocoli ($9,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) et l'aneth ($8,7 \text{ mg.kg}^{-1}$). De même que certains fruits comme la pêche ($2,57 \text{ mg.kg}^{-1}$), l'ananas ($2,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) et le citron ($1,8 \text{ mg.kg}^{-1}$) [18].

La viande et ses dérivés peuvent contenir des niveaux élevés de spermine. Par exemple, de la spermine, à des teneurs supérieures à 148 nmol.g^{-1} , a été trouvée dans des échantillons de bœuf, de porc, de poulet, de jambon cru et de saucisse. Dans le poisson et ses dérivés, les teneurs en spermine sont généralement inférieures à celles dans les produits à base de viande, et nettement plus élevées dans le lait et les œufs. Dans la plupart des fromages, les niveaux de spermine sont inférieurs à 10 nmol.g^{-1} . Dans les viandes soumises à un processus de cuisson impliquant une grande quantité d'eau (ragoût et ébullition), aucune perte significative de spermine n'a été observée. Dans le cas de certaines techniques de cuisson qui impliquent des températures plus élevées ($> 53^\circ$), le rôtissage, le grillage ou la friture, des pertes allant jusqu'à 60% de spermine dans la viande de poulet sont observées [7].

Tableau 2: Teneur moyenne en polyamines dans les matrices alimentaires [7]

Matrice	Teneur (en nmol/g)	Réf
Fruits Pomme, avocat, banane, cerise, kiwi, mandarine, orange, poire, pêche, ananas, fraise, jus de fruits	nd–25	
Légumes Brocoli, chou, chou-fleur, carotte, céleri-rave, courgette, concombre, aubergine, haricots verts, poivron vert, laitue, champignon, oignon, pomme de terre, épinards, tomate.	nd–54	
Légumineuses et produits à base de soja Pois chiches, lentilles, pois, haricots blancs, haricots rouges, soja, pousses de soja, lait de soja, tofu, sauce soja, miso	nd–341	
Noix et oléagineux Amandes, châtaignes, pistaches, graines	63–165	
Céréales Riz, germe de blé, pain blanc	nd–722	
Viande fraîche Bœuf, veau, agneau, porc, poulet, lapin, dinde, canard.	1–342	
Dérivés de viande cuite Jambon cuit, mortadelle, saucisse, saucisse de Francfort, botifarra	11–99	[7]
Dérivés de viande séchés et fermentés Jambon sec, saucisse fermentée à sec	11–177	
Produits de poisson et de fruits de mer frais Poisson blanc, morue, merlu, saumon, thon, sardine, crevette, crabe, calamars, huîtres, pétoncles	nd–111	
Poisson semi-conservé et en conserve Thon en conserve, anchois	12–53	
Œuf	nd–1	
Lait et produits laitiers Lait, yaourt	nd–4	
Fromage Fromage affiné, fromage à pâte dure, fromage de chèvre, roquefort, gorgonzola, fromage bleu, camembert, brie, comté, emmental suisse, fromage jaune	nd–17	
Lait maternel (Sein à terme)	Teneur (en en nmol/ml) 0,104 – 5,080	

nd : données non disponibles

I-5. Les effets physiologiques de la spermine

La spermine est impliquée dans diverses fonctions telles que la croissance et la différenciation cellulaires, la synthèse et la stabilité de l'ADN, la régulation de la transcription, la régulation des canaux ioniques et la phosphorylation des protéines [17].

I-5-1. Chez les animaux

La spermine contribue de manière significative au rôle essentiel que jouent les polyamines intestinales sur la croissance, la maturation et la régénération de la petite muqueuse intestinale et colique [19]. Une étude a montré que l'administration orale de spermine chez la souris augmente l'activité de la phosphatase alcaline et de la disaccharidase, et altère par la suite la maturation intestinale [7]. L'administration de spermine et de spermidine à des rats nouveau-nés a suscité une augmentation de leur poids et de la longueur de leur intestin et a accéléré leur maturation [7]. En ce qui concerne la réponse immunitaire au niveau intestinal, diverses études chez l'animal ont indiqué que l'administration orale de spermine et de spermidine dans la période postnatale améliore la maturation des cellules immunitaires intestinales et augmente les taux d'immunoglobuline A dans les villosités et les cryptes de l'intestin [7]. De plus, la spermine peut favoriser la réduction du stress de sevrage précoce des porcelets [8]. La spermine aurait également un effet sur le vieillissement. En effet, dans une étude chez des souris vieillissantes, un régime avec des niveaux élevés de spermine (374 nmol.g^{-1}) et de spermidine (1540 nmol.g^{-1}) augmente les concentrations de ces composés dans le sang et réduit les taux de marqueurs pro-inflammatoires, la méthylation de l'ADN associée à l'âge, l'atrophie glomérulaire rénale et la mortalité [7].

I-5-2. Chez les plantes

La putrescine, la spermidine et la spermine sont les principales polyamines des plantes. Ces composés polycationiques sont impliqués dans les processus cellulaires fondamentaux comme la croissance, la différenciation et la morphogenèse [20]. Dans les feuilles sénescentes, la spermine empêche la dégradation de la chlorophylle b et de certaines protéines, et augmente l'activité de l'enzyme TGase, produisant plus de conjugués polyamines-protéine [21]. Des études ont montré que la pulvérisation du mélange de spermine et d'acide gibbérellique (GA3) permet de réduire la sénescence des fleurs coupées d'anthurium

conservées à 20°C et d'améliorer la qualité commerciale des inflorescences [22]. Les goyaves vertes mûres fraîchement récoltées et traitées avec de la spermine (100 ppm) conservent une qualité moyennement acceptable pendant plus de 24 jours de conservation au froid. Cela semble être la meilleure option si les fruits doivent être transportés vers des marchés éloignés ou stockés plus longtemps [23].

I-5-3. Chez l'homme

La molécule de spermine, du fait de sa charge, de sa longueur, de la flexibilité de sa chaîne et de sa symétrie, joue un rôle spécifique dans l'organisation structurale et la réactivité de la chromatine. In vitro, on peut, en présence de spermine, condenser l'ADN en particules sphéroïdes. Cette propriété est à l'origine de l'utilisation de « lipo-polyamines » comme vecteur synthétique dans des méthodes de transfert de gènes. La spermine est capable aussi de protéger l'ADN de l'action des endonucléases responsables de la fragmentation de l'ADN [7]. La spermine pourrait également servir d'agent thérapeutique, spécifique et attractif pour le traitement de l'HPH (hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie) [24].

I-6. Spermine et cancer

La spermine agit comme un biomarqueur potentiel pour le diagnostic du cancer. En effet il a été remarqué que les taux de spermine sont très faibles dans les échantillons sanguins de maladies rénales chroniques et d'accidents vasculaires cérébraux, alors que des niveaux élevés de spermine sont trouvés dans l'urine, la salive et le foie des patientes atteintes d'un cancer du sein [6]. Par conséquent, la quantification de la spermine dans les biofluides (urine, salive et sang) peut fournir des informations utiles pour le diagnostic rapide d'une maladie cancéreuse [6]. Les concentrations élevées de spermine dans l'urine peuvent indiquer la présence de tumeurs malignes. C'est la raison pour laquelle la surveillance de la spermine dans l'urine a été proposée comme un outil de diagnostic précoce du cancer afin d'évaluer l'efficacité du traitement anticancéreux et de détecter la rémission et la rechute du cancer [14].

I-7. Méthodes d'analyse de la spermine

La détermination de la teneur en spermine dans les aliments et dans les plasmas pourrait aider à prévenir certaines pathologies comme les intoxications alimentaires ou le cancer. En effet, la spermine a été considérée comme responsable d'intoxications alimentaires et aussi un outil de diagnostic du cancer. Son taux dans les aliments pourrait être un indicateur de la qualité de ces derniers [14]. Ainsi plusieurs méthodes d'analyses pour doser la spermine ont été proposées

I-7 -1. Les méthodes chromatographiques

I-7 -1-1. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

De toutes les méthodes d'analyse, la **CLHP** est la plus populaire et la plus fréquemment utilisée pour la séparation et la quantification des amines biogènes. Elle offre l'avantage d'analyser plusieurs amines biogènes simultanément. Elle a permis de quantifier la spermine dans plusieurs matrices alimentaires. Nous avons donné dans le **tableau 3** les résultats sur la détermination de la spermine dans les matrices alimentaires par CLHP. Les limites de détection et de quantification des échantillons solides, exprimées en mg/kg, sont comprises, respectivement, entre 0,06 et 0,1 mg.kg⁻¹ et 0,19 et 0,31 mg.kg⁻¹. Celles des échantillons liquides sont exprimées en masse par volume (ng.mL⁻¹, µg.mL⁻¹, µg.L⁻¹ et µg.dL⁻³). Les taux de récupération obtenus montrent que la méthode CLHP serait appropriée pour la détermination de la spermine dans les matrices alimentaires.

Tableau 3: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par CLHP

Matrice	Technique - Détecteur	LD	LQ	% DSR	% PR	Ref
Vin	CLHP -UV	0,30 mg.L ⁻¹	1,00 mg.L ⁻¹	1,44- 3,16	Nd	[25]
	CLHP - MS/MS	12 µg.dL ⁻³	40 µg.dL ⁻³	Nd	Nd	[26]
Bière	CLHP - MS/MS	12 µg.dL ⁻³	40 µg.dL ⁻³	Nd	Nd	[27]
	CLHP-DF	7,8 µg.L ⁻¹	26,1 µg.L ⁻¹	2,1	92,8	[27]
Fromage	CLHP -DF	0,67 ng.mL ⁻¹	Nd	2,74	95,17	[28]
	CLHP -DF	0,67 ng.mL ⁻¹	Nd	1,76	100,52	[27]
Poisson frais	CLHP -DF	7,8 µg.L ⁻¹	26,1 µg.L ⁻¹	3,1	104,1	[28]
Viande de volaille	CLHP -DF	0,06 µg.L ⁻¹	0,50 µg.L ⁻¹	Nd	90 -106	[29]
Viande de poulet	CLHP -UV	0,06 µg.L ⁻¹	0,50 µg.L ⁻¹	Nd	64,40 -95,89	[30]
Saucisse	CLHP -DF	0,67 ng.mL ⁻¹	Nd	3,04	96,53	[28]
	CLHP -DF	7,8 µg.L ⁻¹	26,1µg.L ⁻¹	2,7	108,3	[27]
Yaourt	CLHP -DF	7,8 µg.L ⁻¹	26,1µg.L ⁻¹	3,7	104,7	
Vin de riz	CLHP -DF	7,8 µg.L ⁻¹	26,1µg.L ⁻¹	2,6	95,6	
L'huile de maïs	CLHP - UV	0,07 mg.kg ⁻¹	0,21 mg.kg ⁻¹	2,20-4,51	94,51-105,29	[9]
Jus	CLHP - UV	0,10mg.kg ⁻¹	0,31mg.kg ⁻¹	2,84-5,40	102,05-107,01	
Beurre d'arachide	CLHP - UV	0,06 mg.kg ⁻¹	0,19mg.kg ⁻¹	2,47-5,31	94,35-107,37	
Saucisse au jambon	CLHP -DF	7,8 µg.L ⁻¹	26,1 µg.L ⁻¹	2,7	108,3	
Le juk (bouillie traditionnelle coréenne à base de riz)	CLHP - UV	0,08mg.kg ⁻¹	0,24mg.kg ⁻¹	2,58-4,96	96,39-98,96	

Nd : données non disponibles

I-7-1-2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Dans la littérature, nous avons rencontré peu de travaux sur la détermination de la spermine par la chromatographie en phase gazeuse. Nous proposons ci-dessous les données obtenues sur la quantification de la spermine par CPG à partir d'un extrait de vin maison à base de fruits.

Tableau 4: Résultats d'analyse de la spermine dans le vin par CPG

Matrices	Technique - Détecteur	Extraction	LD	LQ	% PR	%DSR	Ref
Boissons alcolisées	CPG –MS	MEDLL	1,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	3,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	89	11	[10]
			1,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	3,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	96	7	

I-7-1-3. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique chromatographique utile pour séparer les composés organiques. En ce qui concerne la méthodologie et les exigences en matière d'équipement, la CCM est beaucoup plus simple et moins automatisée que la chromatographie liquide haute performance (CLHP) [31]. Nous avons donné dans le tableau suivant les résultats d'analyse de la spermine par CCM.

Tableau 5: Résultats d'analyse de la spermine dans le poisson par CCM

Matrice	Technique – Dectecteur	Extraction	LD	LQ	%PR	%DSR	Ref
La morue	CCM-PF	TCA	0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Nd	73,5	0,13 -4,50	[32]
Calamar	CCM-PF	TCA	0, 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Nd	24,1	0,13 -4,50	

Nd : non déterminé

I-7-1-4. La chromatographie liquide ultra haute performance (CLUHP)

La chromatographie liquide à ultra haute pression (**CLUHP**) est une nouvelle génération de technique chromatographique. Comparée à la CLHP, elle fonctionne à des pressions plus élevées (jusqu'à 15 000 psi), nécessite moins de volume d'échantillon à utiliser et un temps d'analyse plus court [11].

Tableau 6: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par CLUHP

Matrices	Techniques - Dectecteurs	LD	LQ	%PR	Ref
Fromage	CLUHP-UV	0,0981 µg.L ⁻¹	0,321 µg.L ⁻¹	Nd	[33]
Fromage	CLUHP-DF	1,62 mg/100g	6,09 mg/100g	Nd	[34]
Vin	CLUHP-DF	<0,2 mg.L ⁻¹	<0,3 mg.L ⁻¹	98,40-100,44	[11]
Poisson	CLUHP-DF	<0,2 mg.L ⁻¹	<0,3 mg.L ⁻¹	87,93-88,80	
Fromage	CLUHP-DF	<0,2 mg.L ⁻¹	<0,3 mg.L ⁻¹	91,47- 94,79	
Saucisses sèches	CLUHP-DF	<0,2 mg.L ⁻¹	<0,3 mg.L ⁻¹	93,64-92,99	
Champignons	CLUHP-UV	0,032-0,098 µg.L ⁻¹	Nd	Nd	[33]
Viande	CLUHP-UV	0,032-0,098 µg.L ⁻¹	Nd	Nd	
Fromage	CLUHP-UV	0,098 µg.L ⁻¹	0,32 µg.L ⁻¹	Nd	

Nd : données non disponibles

Le tableau 6 ci-dessus montre les résultats obtenus après analyse de quelques matrices alimentaires pour la détermination de la spermine. On observe des LD et LQ très faibles avec un taux de récupération variant de 87,93 à 100,44 %.

I-7-2. Électrophorèse capillaire (CE)

La méthode est rapide, nécessite une petite quantité d'échantillon à analyser et produit une faible quantité de déchets. Dans le tableau ci-dessous nous avons relevé plusieurs matrices alimentaires qui ont été analysées pour la détermination de la spermine par CE.

Tableau 7: Résultats d'analyse de la spermine dans plusieurs matrices par les techniques électrophorétiques

Matrices	Méthodes électrophorétiques	Détec-teurs	LD	LQ	%PR	%DSR	Réf
Viande	CE	DP	0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Nd	2,64	[35]
Saucisse	CE	DP	0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Nd	2,43-2,72	
Bière	CE	MS/MS	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	95-109	0,1-5,5	[36]
Vin	CE	MS/MS	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	94-108	0,1-5,5	
	MECK	LIF	12 nM	Nd	Nd	Nd	[37]
Poisson	MECK	LIF	12 nM	Nd	Nd	Nd	
	CE	DP	0, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Nd	2,57-2,79	[35]
Sauce de soja	MECK	LIF	12 nM	Nd	Nd	Nd	[37]
Poisson	MECK	LIF	12 nM	Nd	Nd	Nd	

Nd : données non disponibles

I-7-3. Les capteurs électrochimiques

Les capteurs électrochimiques ou biocapteurs sont une alternative aux procédures analytiques décrites ci-dessus. Ils sont moins coûteux, plus simples à mettre en œuvre, moins longs sur le plan analytique. Les biocapteurs électrochimiques sont généralement constitués d'amino-oxydases immobilisées, qui catalysent l'amination oxydée des polyamines présentes dans les aliments, et d'une électrode de travail qui détecte la production ou la consommation des espèces redox produites par l'activité enzymatique. Différents capteurs électrochimiques développés pour la détermination rapide des polyamines dans les aliments ont montré de faibles limites de détection, une bonne sélectivité envers ces composés [7], un faible coût, une analyse automatique avec une faible consommation de réactifs [38].

Cette technique caractérisée par l'utilisation de capteur fluorescent pour la détection de la spermine comme biomarqueur est souvent utilisée pour le diagnostic du cancer, par exemple dans les biofluides (urine et sang).

Tableau 8: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par les techniques électrochimiques

Matrices	Electrode	Enzyme	Technique	LD	Ref
Poissons	Pt	DAO	A	0,5 nM	
Echantillons de plantes	Pt	DAO	A	1 nM	[38]
		PAO	A	1 nM	
	Au	-	SWV	0,11 nM	
Les produits laitiers	Au	-	PAD	0,4 µM	
Viande	Au	-	IPAD	0,5–10 mg.L ⁻¹	
Boissons alcoolisées	Au	-	IPAD	0,18 µM	
Fluides corporels humains	Pt	PAO	A	4 pM	
	Pt	-	CV, A	0,06 µM	
	Graphite SPE	SMO	CA	1 µM	

I-7-4. Les méthodes colorimétriques

La détection colorimétrique peut également convenir pour mesurer la spermine dans diverses matrices en raison de plusieurs avantages tels qu'une opération facile et simple, et une détection visuelle sans instruments coûteux. Certains des chimiocapteurs optiques pour les polyamines ont été explorés en utilisant l'agrégation de petits colorants organiques anioniques, de polymères conjugués ou de nanoparticules par le biais d'interactions électrostatiques avec les polyamines dans la mesure où l'agrégation entraîne des changements dans l'absorption et dans la fluorescence par rapport aux espèces monomères [39]. Des capteurs sensibles et sélectifs pour la détection de la spermine ont été proposés en utilisant des réactifs de préférence disponibles dans le commerce comme le zincon, un colorant chromogène chélatant pour la détection des ions cuivre et zinc.

Tableau 9: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par les techniques colorimétriques

Matrices	Méthodes	Détecteur s	LD	LQ	%PR	%D RS	Réf
Plasma et urine	colorimétrique avec biomarqueurs	Tyr-Au NPs biosensor	136 pM	Nd	99,3-101,6	Nd	[40]
Urine	colorimétrique avec biomarqueurs	Zincon	25,1 nM	Nd	Nd		[39]
Le bœuf Chrysant hème	détection biochimique	assemblage ctDNA-AuNPs,	11,6 nM	49,4 ng..mL ⁻¹	95,0-103,0	3,35	[41]
					96,0-108,0	4,66	

Nd : données non disponibles

I-7-5. Les méthodes fluorimétriques

Les méthodes fluorimétriques se révèlent être une stratégie analytique facile et rentable pour la détection de la spermine comme biomarqueurs dans les échantillons d'urine et de sang en utilisant par exemple :

- des nanomètres (NSET) par l'intermédiaire des nanorods d'or (AuNRs) chargés positivement [42].
- des biocapteurs spécifiques comme les pepsin-AuNCs, méthode basée sur l'extinction de la fluorescence induite par la spermine des P-Au NCs [6],
- de nouveaux optocapteurs "à activer" basés sur des copolymères de thiophène amphiphiles recouverts de points quantiques CdTe (P1QD et P2QD) [44].

Les résultats (Tableau 10) obtenus avec des limites de détection très faibles et des pourcentages de récupération satisfaisant prouvent que les méthodes fluorimétriques sont des méthodes très appropriées pour l'analyse de la spermine.

Tableau 10: Résultats d'analyse de la spermine dans différentes matrices par les techniques fluorimétriques

Matrices	Méthodes	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	LD	LQ	% PR	% DSR	Réf
Plasma femelle	Fluorescence avec biomarqueurs	416/655	1,75nM	Nd	99,79-100,08	0,22-0,54	[6]
Plasma male	Fluorescence avec biomarqueurs	416/655	1,75nM	Nd	99,62-99,89	0,11-0,73	
Urine femelle	Fluorescence avec biomarqueurs	416/655	1,75nM	Nd	99,93-100,78	0,14-0,44	
Urine male	Fluorescence avec biomarqueurs	416/655	1,75nM	Nd	99,94-100,75	0,04-0,91	
Plasma et urine	Fluorescence avec biomarqueurs	346/410	6,2 nM	Nd	99,3-101,6	Nd	[40]
Urine	Fluorescence avec biomarqueurs	434/680	0,04nM	26,99 $\mu\text{g.m.L}^{-1}$	Nd	4,72-8,91	[42]
Urine	Fluorescence		4,73nM		Nd	Nd	[43]
sérum humain	Fluorescence avec biosenseur	350/425	2,90nmol.L ⁻¹	Nd	96,88- 106,90	1,06-2,13	[44]
		380/510	1,66nmol.L ⁻¹	Nd	96,88- 106,90	1,06-2,13	

Nd : données non disponibles

PARTIE II : MISE EN ÉVIDENCE DE LA FORMATION DU COMPLEXE OPA-SPERMINE EN MILIEUX AQUEUX

A) PARTIE EXPERIMENTALE

II-A.1. Produits utilisés

Nous avons utilisé de la spermine de pureté 99% et de l'orthophtalaldéhyde de pureté 97%. Ces deux produits ont été achetés chez Sigma Aldrich (Taufkirchen, Allemagne) et utilisés sans purification supplémentaire.

Nous avons également utilisé de l'hydroxyde de sodium (97% m/m), de l'acide chlorhydrique (37% m/m). De l'eau distillée a aussi été utilisée pour préparer toutes les solutions aqueuses nécessaires.

II-A.2. Instrumentation

Pour l'acquisition des spectres d'absorption électronique UV-visible, nous avons utilisé un spectrophotomètre Evolution 300 piloté depuis un ordinateur HP grâce à un logiciel **VisionPro**. Pour l'ensemble de nos mesures nous avons fixé une vitesse de balayage à 600 nm par minute.

Pour les mesures, deux cuves parallélépipédiques en quartz comprenant deux faces polies (trajet optique 1 cm) ont été utilisées.

Pour les pesées, nous avons utilisé une balance **PPS213 fisher scientific** de précision 1 mg.

Les mesures de volumes ont effectuées à l'aide de **fioles** de 10 mL à 100 mL et une **micropipette** (pipetman) de 1000 µL.

Pour la dissolution des produits et l'homogénéisation des solutions, nous avons utilisé un agitateur magnétique VELP ARE Scientifica muni d'un chauffage thermostaté. Un **pH-mètre Consort model C6010** nous a servi de mesure de pH.

II-A.3. Méthodologie pour la préparation des solutions

Des solutions mères de spermine (SPM) et d'orthophtalaldéhyde (OPA) de concentration 10^{-2} M chacune ont été préparées dans des fioles de 100 mL avec de l'eau distillée. Cependant, il était nécessaire de chauffer légèrement le mélange OPA-eau distillée afin d'obtenir un mélange homogène. A partir de chaque solution mère nous avons procédé à des dilutions successives 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.

II-A.4. Détermination de la stœchiométrie du complexe OPA-SPM

Pour déterminer la stœchiométrie du complexe OPA-SPM, nous avons utilisé la méthode des réactifs limitants et celle de Job.

II-A.4.1. Méthode des réactifs limitants

Cette méthode consiste à fixer la concentration d'un des réactifs et faire varier celle de l'autre dans une gamme de concentrations couvrant la concentration fixée. Après chaque mélange, nous avons enregistré le spectre d'absorption du complexe et nous avons noté la valeur de l'absorbance maximale. Ceci nous a permis d'établir la courbe de variation de l'absorbance (A) du complexe OPA-SPM en fonction de la concentration du réactif variant. Cette courbe nous donne deux droites de pentes différentes et la stœchiométrie est déterminée à partie de l'intersection des droites.

II-A.4.2. Méthode de JOB

Pour vérifier la stœchiométrie de la réaction, nous avons aussi utilisé la méthode de Job. Cette dernière est également connue sous le nom de méthode de variation continue et a été proposée pour la première fois en 1928 [45]. Elle consiste d'abord à préparer des solutions mères d'OPA et de SPM de même concentration. Pour toutes les mesures, la condition principale requise est que le volume du total mélange des solutions équimolaires d'OPA et de SPM doit rester fixe : $V_{OPA} + V_{SPM} = V_t$. Seuls V_{OPA} et V_{SPM} varient en sens inverse, mais leur somme V_t reste constante. Nous avons défini le rapport r_i pour chaque mélange i :

$$r_i = \frac{V_{OPA(i)}}{V_t} \text{ ou } r_i = \frac{V_{SPM(i)}}{V_t}$$

Pour chaque valeur de r_i , nous avons noté l'absorbance correspondante A_i du complexe OPA-SPM. Les résultats obtenus, nous ont permis de tracer la courbe de Job : $A_i = f(r_i)$. L'allure de ce graphe donne toujours une courbe en cloche. Le centre de cette courbe nous permet d'avoir la stœchiométrie de la réaction.

Par exemple, si la courbe de Job donne une cloche centrée à la valeur de $r = 0,5$, la stœchiométrie du complexe est de type 1:1.

II-A.5. Méthode de calcul des performances analytiques

Pour déterminer les performances analytiques, nous avons établi la droite de calibration dans l'eau. Les caractéristiques de cette droite, nous ont permis de déterminer la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) définies comme suit :

- **la limite de détection (LD)** est définie comme étant la concentration obtenue à partir de l'absorbance correspondant à 3 fois l'écart-type du solvant = 3 s .

- **la limite de quantification (LQ)**, elle est définie comme étant la concentration correspondant à l'absorbance égale à 10 fois cet écart-type = 10 s .

Dans notre cas l'équation de la droite s'écrit de la forme: $A = \alpha C$.

A est l'absorbance du complexe, α la pente de la droite et C la concentration de la spermine.

Pour $A = 3 \text{ s} \Rightarrow LD = C$, on peut donc écrire dans ce cas: $3 \text{ s} = LD$

$$\Leftrightarrow LD = \frac{3}{\alpha} \text{ s} \quad (\text{Eq.1})$$

$$\text{Dans ce cas } LQ = \frac{10}{\alpha} \text{ s} \quad (\text{Eq.2})$$

Dans toutes ces relations 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 **déviation 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 :

$$DSR = \frac{\sigma_A}{A_m} \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

où σ_A est l'écart type obtenu à partir de l'absorbance du complexe pour une concentration fixée.

A_m est l'absorbance moyenne obtenue pour au moins six mesures de cette même concentration.

B) RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

II-B.1 Mise en évidence du complexe OPA-SPM

La spermine (SPM) en milieu aqueux absorbe faiblement dans l'UV-visible. En revanche, le spectre d'absorption de l'OPA dans l'eau présente deux pics d'absorption à 279 nm et à 299 nm. La solution obtenue en mélangeant OPA et SPM donne un spectre d'absorption avec une seule bande dont le maximum est situé vers 284 nm (Figure 3). Ce spectre correspond à celui du complexe OPA-SPM car en comparant le spectre du complexe (courbe a) et celui obtenu (courbe d) à partir de la somme des deux spectres d'absorption pris isolément (spectre OPA + spectre SPM) et calculé à l'aide du logiciel OriginPro, on remarque qu'ils sont totalement différents. Donc, en milieu aqueux, la spermine réagit avec l'OPA à l'état fondamental pour donner le complexe OPA-SPM qui absorbe dans l'UV.

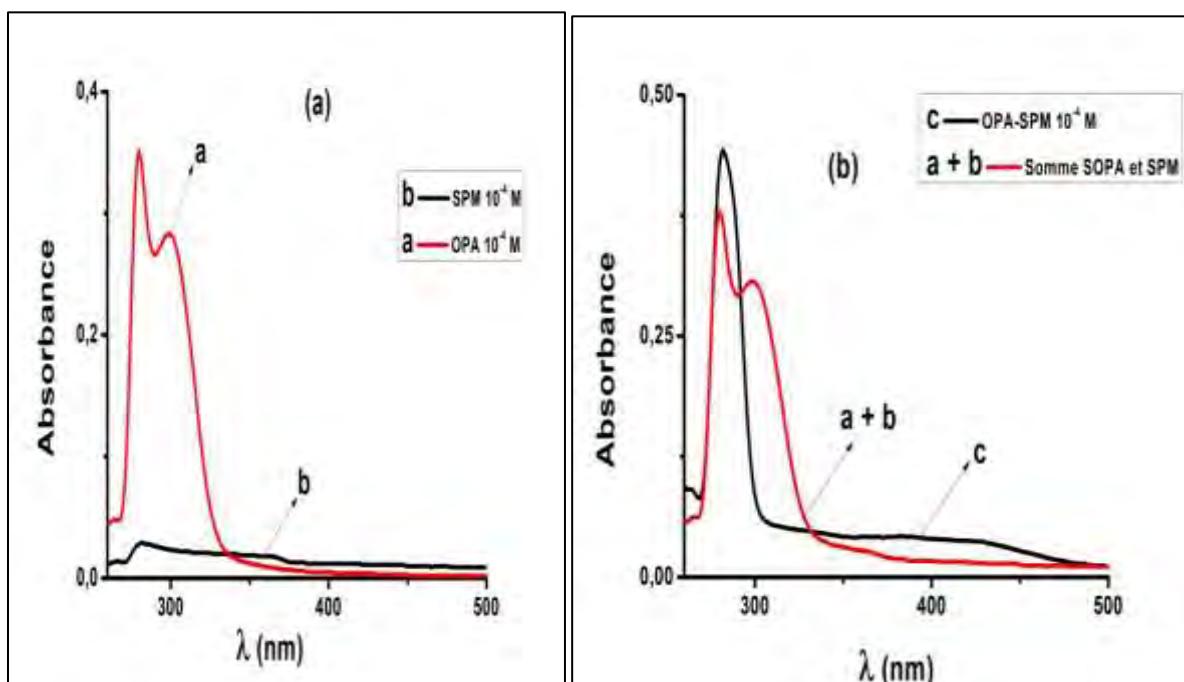


Figure 3: Spectres d'absorption électronique : (a) OPA seul ; (b) SPM seule ; (c) OPA+ SPM et (a+b) spectre OPA + spectre SPM (calculé)

II-B.2. Détermination de la stœchiométrie du complexe entre OPA et SPM

II-B.2.1. Par la méthode des réactifs limitants

La stœchiométrie du complexe OPA-SPM a été étudiée en milieu aqueux (pH 4). Pour ce faire, nous avons fixé la concentration de la spermine à 15×10^{-5} M et nous avons fait varier celle de l'OPA de 2×10^{-5} M à 68×10^{-5} M. La figure 4a représente la variation de

l'absorbance du complexe en fonction de la concentration de l'OPA. Cette figure montre deux droites sécantes de pentes distinctes. La première droite traduit la formation progressive du complexe OPA-SPM. Le point d'intersection des deux droites correspond à la fin de la réaction. A ce point, la concentration de l'OPA est égale au double de celle de la spermine fixée ; ce qui indique que la stœchiométrie du complexe est de type 2:1. Nous ne notons aucun changement de forme des spectres et de déplacement des longueurs d'absorption au cours de cette étude (figure 4b).

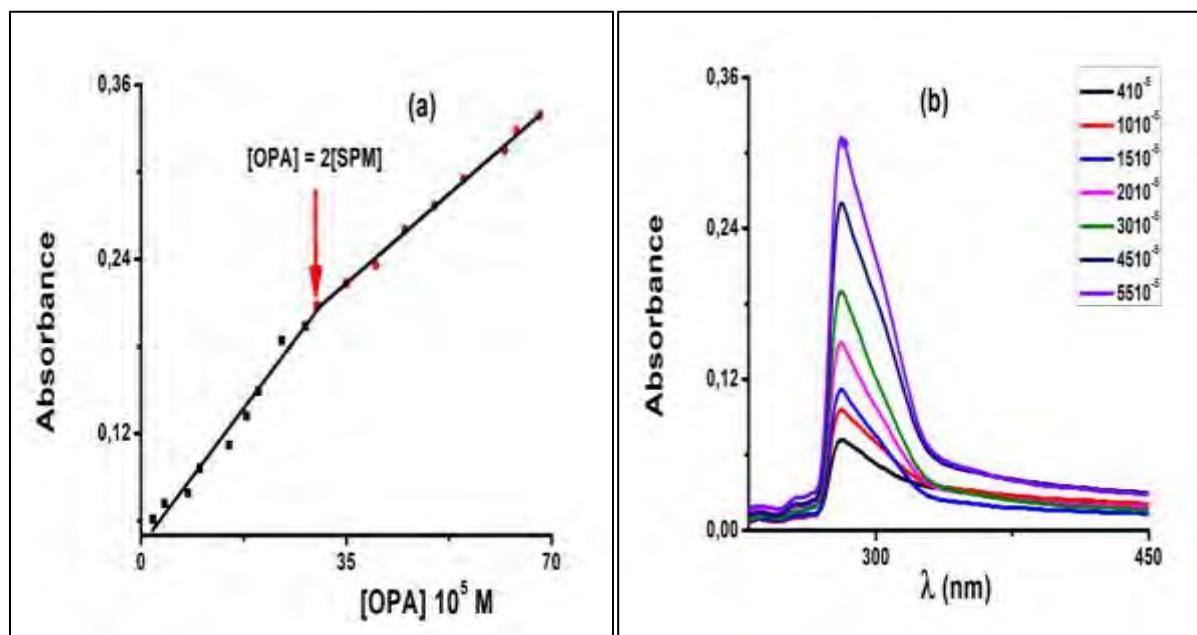


Figure 4: Evolution de l'absorbance du complexe OPA-SPM en fonction de la concentration de l'OPA (a) et effet de la concentration de l'OPA sur le spectre d'absorption du complexe OPA-SPM (b)

II-B.2.2. Par la méthode de JOB

Nous avons appliqué la méthode de Job décrite dans la partie expérimentale. Pour cela, des solutions équimolaires d'OPA et de SPM 10^{-3} M ont été utilisées. Le tableau suivant regroupe les données utilisées dans cette partie pour la détermination de la stœchiométrie.

Nous représentons sur la figure 5 la courbe obtenue. Cette figure montre une courbe en forme de cloche centrée au tour de l'abscisse r égale à 0,7 environ. Ce résultat montre que la stœchiométrie du complexe OPA-SPM est bien de type 2 :1. Ce qui confirme les résultats trouvés avec la méthode des réactifs limitants.

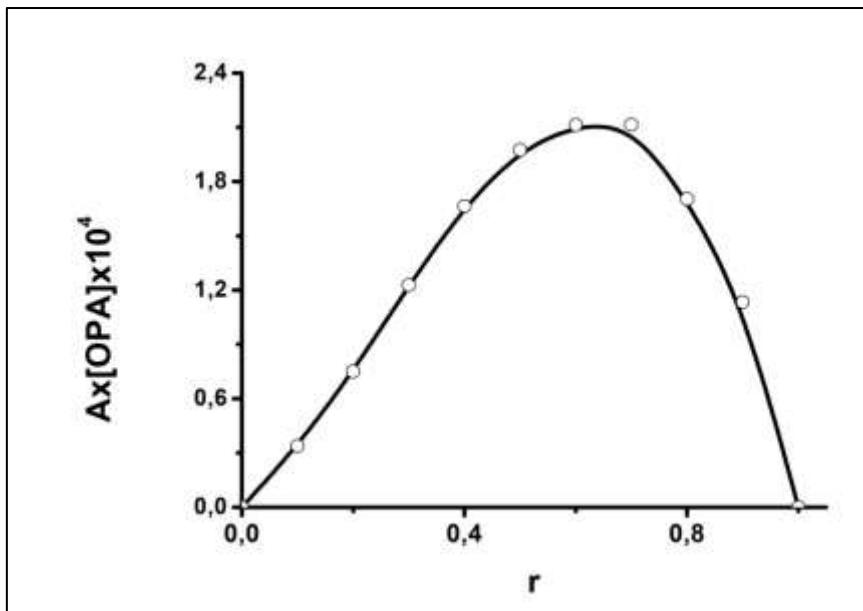


Figure 5: Courbe de JOB

II-B.3. Étude de l'effet du pH sur l'absorbance du complexe OPA-SPM

Nous avons préparé dans différentes fioles jaugées un mélange en quantités égales des solutions d'OPA et d'SPM de même concentration 10^{-4} M. Le pH de la solution de chaque fiole a été ajusté à la valeur désirée à l'aide de solutions concentrées de NaOH et de HCl. Nous avons travaillé dans la gamme de pH allant 1 à 14. Nous avons enregistré et superposés les spectres d'absorption du complexe (Figure 6a). En dehors d'un faible déplacement de longueur d'onde des maxima d'absorption quand on passe de pH 11 à pH 14, aucun changement de forme des spectres n'a été observé. Nous avons relevé les valeurs de l'absorbance (A) du complexe en suivant la longueur d'onde à 284 nm, puis nous avons tracé la courbe $A = f(pH)$ (Figure 6b). Nous observons une faible diminution de l'absorbance du complexe lorsque le pH du milieu passe de 1 à 12. Au-delà de pH 12, l'absorbance chute considérablement.

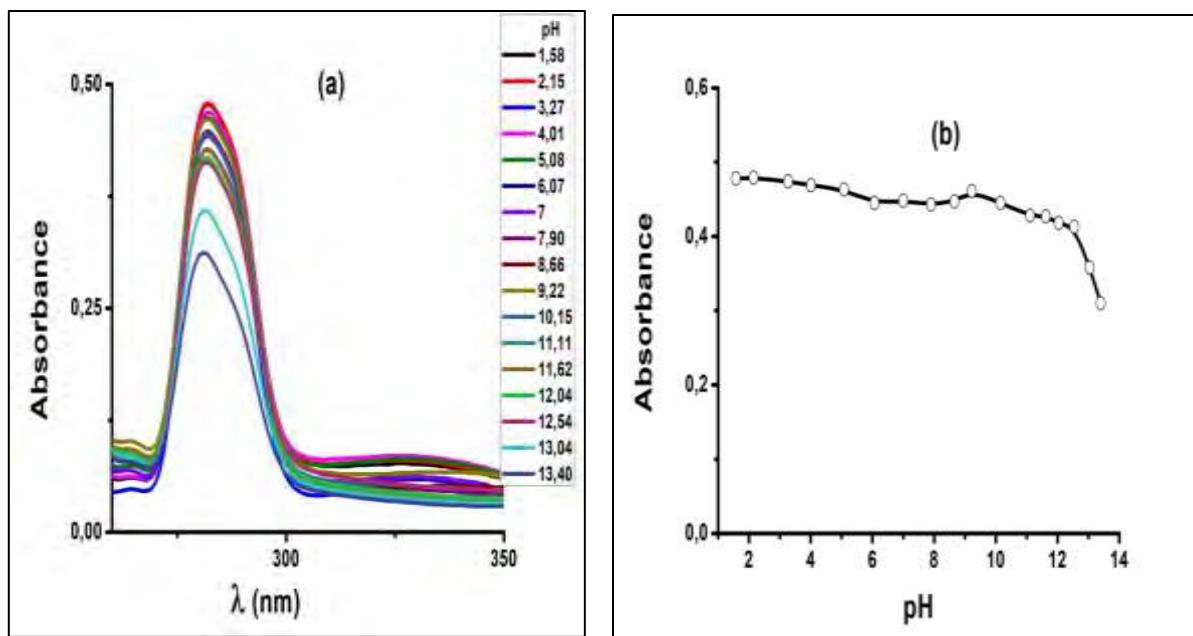


Figure 6: Effet du pH sur le spectre d'absorption (a) et sur l'absorbance (b) du complexe OPA-SPM

II-B.4. Droite de calibration

Pour mieux évaluer l'intérêt de cette méthode par voie spectrophotométrique, nous avons établi la droite de calibration du complexe OPA-SPM dans l'eau à pH égale à 4 et à la température ambiante (Figure 7). Pour cela, nous avons tenu compte de la stœchiométrie du complexe OPA-SPM qui est de type 2:1. À partir des caractéristiques de la droite obtenue, nous avons déterminé les performances analytiques.

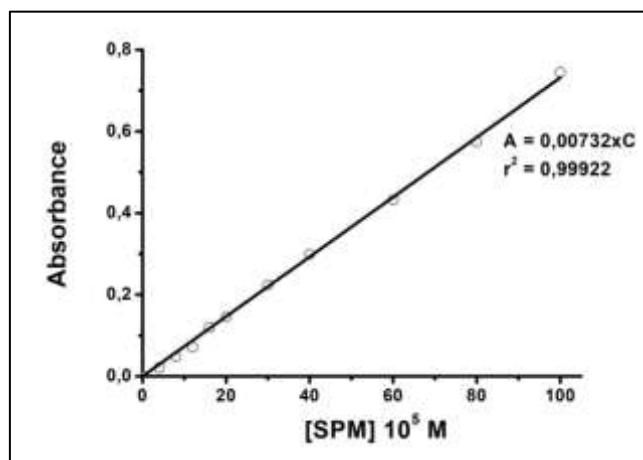


Figure 7: Droites de calibration du complexe OPA-SPM dans de l'eau à pH 4

II-B.5 Détermination des performances analytiques

Nous avons déterminé les performances analytiques de la méthode en milieu aqueux à partir de la courbe d'étalonnage. Nous avons noté une bonne linéarité sur une gamme de concentration allant de 4×10^{-5} à 16×10^{-4} M de spermine. Le coefficient de corrélation (r^2) obtenu est proche de l'unité. Ceci atteste la bonne précision des mesures. Par ailleurs, nous avons déterminé le coefficient d'extinction molaire du complexe à partir de la pente de la courbe d'étalonnage. La valeur de ce coefficient étant égale à $732 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, inférieure à 1000 montre que les transitions sont de type $n - \pi^*$.

Les limites de détection et de quantification calculées sont égales à $20,34 \mu\text{M}$ et $67,79 \mu\text{M}$, respectivement. Ces faibles limites attestent la bonne sensibilité de la méthode. La déviation relative standard calculée est égale à 5,15%. Cette faible valeur trouvée montre la bonne reproductibilité de nos mesures.

Tableau 11: Les paramètres analytiques de la méthode spectrophotométrique

	Valeurs
DL	$40 - 1000 \mu\text{M}$
Pente	0,00732
Coefficient de corrélation (r^2)	0,99922
LD	$20,34 \mu\text{M}$
LQ	$67,79 \mu\text{M}$
ϵ	$732 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
DRS (%)	5,15

DL : Domaine de Linéarité ; LD : Limite de Détection ; LQ : Limite de Quantification

Ainsi, ces performances obtenues montrent que cette méthode peut être appliquée à l'analyse de la spermine dans différentes matrices.

CONCLUSION

La spermine est une amine biogène de la famille des polyamines aliphatiques naturelles. Elle joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire. Mais à forte dose, elle est responsable d'intoxications alimentaires. En outre, sa concentration élevée dans l'urine peut indiquer la présence de tumeurs malignes. C'est la raison pour laquelle la surveillance de son niveau dans l'urine a été proposée comme outil de diagnostic précoce du cancer.

Dans la partie bibliographique de ce travail, nous avons d'abord présenté les caractéristiques de la spermine : ses origines, sa présence et son devenir dans les aliments ainsi que ses effets physiologiques et toxicologiques chez l'homme, chez l'animal et chez la plante. Nous avons ensuite présenté les différentes méthodes chromatographiques, électrochimiques, immunologiques et fluorimétriques d'analyse de la spermine dans les matrices environnementales.

Dans la partie expérimentale, nous avons utilisé une méthode basée sur la spectrophotométrie UV-Visible pour étudier les caractéristiques spectrales du complexe OPA-SPERMINE. Par la méthode des réactifs limitants et celle de JOB, nous avons trouvé une stoechiométrie de type 2:1 du complexe formé. Nous avons établi une courbe d'étalonnage en milieux aqueux à pH 4, puis déterminé les performances analytiques de la méthode. Les résultats obtenus ont donné des limites de détection et de quantification, respectivement, égales à 20,34 µM et 67,79 µM et une déviation relative standard de 5,15%. Ces performances obtenues montrent que cette méthode peut être appliquée à l'analyse de la spermine dans différentes matrices.

Nous comptons poursuivre ce travail :

- en utilisant d'autres réactifs fluorogéniques et de comparer leurs résultats avec ceux déjà établis pour l'OPA ;
- en caractérisant les dérivés spermine – marqueur fluorogénique par les techniques habituelles (RMN, IR,) ;
- en validant notre méthode par des applications analytiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **M. A. Alvarez and M. V. Moreno-Arribas.** The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*, 39 (2) (2014) 146-155. [Doi:10.1016/j.tifs.2014.07.007](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.007)
- [2] **J.-J. Zhong, N. Liao, T. Ding, X. Ye, D.-H. Liu.** Liquid chromatographic method for toxic biogenic amines in foods using a chaotropic salt. *Journal of Chromatography A*, 1406 (2015) 331–336. [Doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.048](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.048)
- [3] **R. Adamou, A. Coly, S. E. Douabalé, M. L. Ould Cheikh Ould Saleck, M. D. Gaye-Seye, and A. Tine.** Fluorimetric Determination of Histamine in Fish Using Micellar Media and Fluorescamine as Labelling Reagent. *Journal of Fluorescence*, 15 (5) (2005) 679-688. [Doi: 10.1007/s10895-005-2975-7](https://doi.org/10.1007/s10895-005-2975-7)
- [4] **K. Kital, M. Traoré, D. Sarr, M. Mbaye, M. D. Gaye Seye, A. Coly, F. Delattre et A. Tine.** Thermodynamic and detailed kinetic study of the formation of orthophthalaldehyde agmatine complex by fluorescence intensities. *Journal of Analytical Science and Technology*, 11 (41) (2020) 1-13. [Doi:10.1186/s40543-020-00238-2](https://doi.org/10.1186/s40543-020-00238-2)
- [5] **M. Traoré, K. Kital, M. Mbaye, O. M. A. Mbaye, C. Diop, M. K. Camara, L. Cissé, M. D. Gaye-Seye, A. Coly, A. Tine.** New Spectrofluorimetric Method for Determining Cadaverine Following Derivation with Orthophthalaldehyde: Application in Fish Tissue. *International Journal of Chemistry*, 9 (3) (2017) 1-18. [Doi:10.5539/ijc.v9n3p10](https://doi.org/10.5539/ijc.v9n3p10).
- [6] **J. R. Bhamore, Z.V.P. Murthy, S. K. Kailas.** Fluorescence turn-off detection of spermine in biofluids using pepsin mediated synthesis of gold nanoclusters as a probe. *Journal of Molecular Liquids*, 280 (2019) 18-24. [Doi: 10.1016/j.molliq.2019.01.132](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.01.132)
- [7] **N.C. Muñoz-Esparza, M.L. Latorre-Moratalla, O. Comas-Basté, N. Toro-Funes, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou.** Polyamines in Food. *Frontiers in Nutrition*, 6 (2019), 1-11. [Doi: 10.3389/fnut.2019.00108](https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00108)
- [8] **X. Wu ,W. Cao, G. Jia , H. Zhao, X. Chen, C. Wu, Jiayong Tang, J. Wang, G. Liu.** New insights into the role of spermine in enhancing the antioxidant capacity of rat spleen and liver under oxidative stress. *Animal Nutrition*, 3 (1) (2017) 85-90. [Doi: 10.1016/j.aninu.2016.11.005](https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.11.005)
- [9] **H. Yoon, J. H. Park, A. Choi, H.-J. Hwang and J.-H. Mah.** Validation of an HPLC Analytical Method for Determination of Biogenic Amines in Agricultural Products and

Monitoring of Biogenic Amines in Korean Fermented Agricultural Products. *Toxicological Research*, 31 (3) (2015) 299-305. [Doi:10.5487/TR.2015.31.3.299](https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.3.299)

[10] **J. Plotka-Wasylka, V. Simeonov, J. Namiesnik.** An *in situ* derivatization-dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas-chromatography-mass spectrometry for determining biogenic amines in home-made fermented alcoholic drinks. *Journal of Chromatography A*, 1453 (2016) 18-20. [Doi:10.1016/j.chroma.2016.05.052](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.052)

[11] **M.L. Latorre-Moratallaa, J. Bosch-Fustea, T. Lavizzaria, S. Bover-Cidb, M.T. Veciana-Noguesa, M.C. Vidal-Caroua.** Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7715-7720. [Doi: 10.1016/j.chroma.2009.08.072.](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.072)

[12] **Y. Wang, J. Chenb, S. Li, X. Zhang, Z. Guoc, J. Hu, X. Shao, N. Song, Y. Zhao, H. Li, G. Yang, C. Xu, C. Wei.** Exogenous spermine attenuates rat diabetic cardiomyopathy via suppressing ROS-p53 mediated downregulation of calcium-sensitive receptor. *Redox Biology* 32 (2020) 101-514. [Doi:10.1016/j.redox.2020.101514](https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101514)

[13] **N. Shahin, N. El-Nabarawy, A. Gouda, B. Mégarbane.** The protective role of spermine against male reproductive aberrations induced by exposure to electromagnetic field –An experimental investigation in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 370 (2019) 117–130. [Doi:10.1016/j.taap.2019.03.009](https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.03.009)

[14] **G. Jiang, W. Zhu, Q. Chen, X. Li, G. Zhang, Y. Li, X. Fan, J. Wang.** Selective fluorescent probes for spermine and 1-adamantanamine based on the supramolecular structure formed between AIE-activemolecule and cucurbit[n]urils. *Sensors and Actuators B*, 261 (2018) 602–607. [Doi:10.1016/j.snb.2018.01.197](https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.197)

[15] **R. A. Casero, T. Murray Stewart, A. E. Pegg.** Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nature Reviews/Cancer*. [Doi:10.1038/s41568-018-0050-3.](https://doi.org/10.1038/s41568-018-0050-3)

[16] **Y. Guo, Q. Ye, P. Deng, Y. Cao, D. He, Z. Zhou, C. Wang, Y. Zaytseva, C. E. Schwartz, E. Y. Lee, B. Mark Evers, A. J. Morris, Q-B. She.** Spermine synthase and MYC cooperate to maintain colorectal cancer cell survival by repressing Bim expression. *Nature Communications*, 11 (1) (2020) 1-16. [Doi: 10.1038/s41467-020-17067-x](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17067-x)

[17] **K. Soda.** The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30 (91) (2011) 1-9. [Doi:10.1186/1756-9966-30-95](https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-95)

- [18] N. Buyukuslu, H. Hizli, K. Esin, M. Garipagaoglu. A Cross-Sectional Study: Nutritional Polyamines in Frequently Consumed Foods of the Turkish Population. *Foods*, 3 (2014) 541-557. [Doi:10.3390/foods3040541](https://doi.org/10.3390/foods3040541)
- [19] P. Kalac. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chemistry*, 161 (2014) 27–39. [Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.102](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.102)
- [20] Y. Naka, K. Watanabe, G.H.M. Sagor, M. Niitsu, M. A. Pillai, T. Kusano, Y. Takahashi. Quantitative analysis of plant polyamines including thermospermine during growth and salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (2010) 527-533. [Doi: 10.1016/j.plaphy.2010.01.013](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.013)
- [21] D. Serafini-Fracassini, A. Di Sandro, S. Del Duca. Spermine delays leaf senescence in Lactuca sativa and prevents the decay of chloro plast photosystems. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (2010) 602-611. [Doi: 10.1016/j.plaphy.2010.03.005](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.03.005)
- [22] A. Do Nascimento Simões, N. B. Diniz, M. R. da Silva Vieira, S. L. Ferreira-Silva, M. B. da Silva, I. O. Minatel, G. P. P. Lima. Impact of GA3 and spermine on postharvest quality of anthurium cut flowers (*Anthurium andraeanum*) cv. Arizona. *Scientia Horticulturae*, 241 (2018) 178–186. [Doi : 10.1016/j.scienta.2018.06.095](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.095)
- [23] V. Phani deepthi, C. Sekhar, D. Srihari .Effect of fruit maturity on efficiency of polyamines to delay the ripening of guavas under cold storage. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*, 6 (2016) 215-230
- [24] C. Wei, H-Z. Li, Y-H. Wang, X. Peng, H-J. Shao, H-X. Li, S-Z. Bai, X-X. Lu, L-Y. Wu, R. Wang, C-Q. Xu. Exogenous spermine inhibits the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells caused by chemically-induced hypoxia via the suppression of the ERK1/2- and PI3K/AKT-associated pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, 37 (2016) 39-46. [Doi: 10.3892/ijmm.2015.2408](https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2408)
- [25] A. Pineda, J. Carrasco, C. Peña-Farfal, K. Henríquez-Aedo, M. Aranda. Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC. *Food Control*, 23 (2012) 251-257. [Doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.025](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.025)
- [26] K. Nalazek-Rudnicka, A. Wasik. Development and validation of an LC–MS/MS method for the determination of biogenic amines in wines and beers. *Monatsh Chemistry.*, 148 (2017) 1685–1696. [Doi:10.1007/s00706-017-1992-y](https://doi.org/10.1007/s00706-017-1992-y)

- [27] **H. Wu, G. Li, S. Liu, Z. Ji, Q. Zhang, N. Hu, Y. Suo, J. You.** Simultaneous determination of seven biogenic amines in foodstuff samples using one-step fluorescence labeling and dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC-FLD and method optimization using response surface methodology. *Food Anal. Methods.*, 8 (3) (2014) 685-695. [Doi:10.1007/s12161-014-9943-2](https://doi.org/10.1007/s12161-014-9943-2).
- [28] **G. Li, L. Dong, A. Wang, W. Wang, N. Hub, J. You.** Simultaneous determination of biogenic amines and estrogens in foodstuff by an improved HPLC method combining with fluorescence labeling. *LWT-Food Science and Technology*, 55 (2014) 355-361. [Doi:10.1016/j.lwt.2013.06.028](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.028)
- [29] **C. A. Lázaro, C. A. Conte-Júnior, A. C. Canto, M. L. G. Monteiro, B. Costa-Lima, A. G. Cruz, R. M. Franco.** Biogenic amines as bacterial quality indicators In different poultry Meat species. *LWT-Food Science and Technology*, 60 (1) (2015) 15-21. [Doi: 10.1016/j.lwt.2014.09.025](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.025).
- [30] **C. A. Lázaro, C. A. Conte-Júnior, F. L. Cunha, E. T. Mársico, S. B. Mano, R. M Franco.** Validation of an HPLC Methodology for the Identification and Quantification of Biogenic Amines in Chicken Meat. *Food Anal. Methods*, 6 (4) (2013) 1024-1032. [Doi : 10.1007/s12161-013-9565-0](https://doi.org/10.1007/s12161-013-9565-0).
- [31] **N. Pedrol, A. F. Tiburcio.** Polyamines determination by TLC and HPLC. *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, (2001) 335–363.
- [32] **J. Lapa-Guimarães, J. Pickova.** 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](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.014)
- [33] **E. Dadakova, M. Krizek, T. Pelikanova.** Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116 (2009) 365–370. [Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.018).
- [34] **H.K. Mayer, G. Fiechter, E. Fischer.** A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of chromatography A*, 1217 (2010) 3251–3257
- [35] **J. Ruiz-Jiménez, M. D. Luque de Castro.** Pervaporation as interface between solid samples and capillary electrophoresis Determination of biogenic amines in food. *Journal of chromatography A*, 1110 (2006) 245–253. [Doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.081](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.081)

- [36] **D. Daniel, V. B. dos Santos, D. T. R. Vidal, C. L do Lago.** Determination of biogenic amines in beer and wine by capillaryelectrophoresis–tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1416 (2015) 121-128. [Doi: 10.1016/j.chroma.2015.08.065](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.065).
- [37] **N. Zhang, H. Wang, Z-X. Zhang, Y-H. Deng, H-S. Zhang.** Sensitive determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with a new fluorogenic reagent 3-(4-fluorobenzoyl)-2-quinolinecarboxaldehyde. *Talanta*, 76(2008)791-797.
[Doi:10.1016/j.talanta.2008.04.027](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.027)
- [38] **D. Baratella, E. Bonaiuto, M. Magro, J. de Almeida Roger, Y. Kanamori, G. P. P Lima, F. Vianello.** Endogenous and food-derived polyamines: determination by electrochemical sensing. *Amino Acids*, 20 (9) (2008) 1187-1203. [Doi.org/10.1007/s00726-018-2617-4](https://doi.org/10.1007/s00726-018-2617-4)
- [39] **Y. Fukushima and S. Aikawa.**Colorimetric detection of spermine and spermidine by zincon in aqueous solution. *Tetrahedron Letters*. [Doi:10.1016/j.tetlet.2019.151302](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151302)
- [40] **K. A. Rawat, J. R. Bhamore, R. K. Singhal, S. K. Kailasa.** Micro wave assisted synthesis of tyrosine protected gold nanoparticles for dual (colorimetric and fluorimetric) detection of spermine and spermidine in biological samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 88 (2016) 71-77. [Doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.069i](https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.069i)
- [41] **J. Wang, Z. L. Wu, H. Z. Zhang, Y. F. Li, C. Z. Huang.**Selective colorimetric analysis of spermine based on the cross-linking aggregation of gold nanoparticles chain assembly. *Talanta*, 167 (2017) 193-200. [Doi:10.1016/j.talanta.2017.01.085](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.085)
- [42] **D. Yuan, J. J. Liu, H. Z. Zhang, N. Wang, H. Y. Zou, C. Z. Huang, J. Wang.** Highly selective detection of spermine in human urine via a nanometal surface energy transfer platform. *Talanta*, 188 (2018) 218–224. [Doi:10.1016/j.talanta.2018.05.086](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.086)
- [43] **J. Tu, S. Sun and Y. Xu.** A novel self-assembled platform for the ratiometric fluorescence detection of spermine. *Chemistry Communications*, 52 (5) (2016) 1040-1043. [Doi: 10.1039/c5cc07861j](https://doi.org/10.1039/c5cc07861j)
- [44] **S. M. Tawfik, J. Shim, D. Biechele-Speziale, M. Sharipov, Y. Lee.** Novel “turn off-on” sensors for highly selective and sensitive detection of spermine based on heparin-quenching of fluorescence CdTe quantum dots-coated amphiphilic thiophene copolymers. *Sensors and Actuators. B*, 257 (2018) 734–74. [Doi :10.1016/j.snb.2017.10.172](https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.172)
- [45] **P. Job.** Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Annali di Chimica Applicata*, 9 (1928) 113-203.

Titre : ÉTUDE ANALYTIQUE DU COMPLEXE OPA-SPERMINE EN MILIEUX AQUEUX PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE UV-VISIBLE

Candidat : FRANCIS DIAGA NDOUR

Nature du mémoire : Mémoire de Master de Chimie Physique Appliquée à l'Energie et à l'Analyse.

Composition du jury :

Président : Pr Atanasse COLY

Membres : Pr Lamine CISSE

Dr Olivier M. A. MBAYE

Dr Khémesse KITAL

Directeur : Dr Moussa MBAYE

Résumé :

Les amines biogènes sont présentes en grande quantité dans les aliments ayant subi des processus de putréfaction. Ce taux élevé est très souvent à l'origine d'intoxication alimentaire. La mise au point de méthodes d'analyses fiables et économiques des amines biogènes constitue une préoccupation pour la communauté scientifique. Notre laboratoire s'est investi depuis plusieurs années dans ce challenge. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de recherche sur la spermine, une amine biogène qu'on retrouve dans les aliments tels que les céréales, les légumineuses, les dérivés de soja, la viande et ses dérivés le poisson et ses dérivés, etc. Nous avons présenté les caractéristiques de cette amine, ses origines, sa présence et son devenir dans les aliments ainsi que ses effets physiologiques et toxicologiques chez l'homme, chez l'animal et chez la plante. Nous avons consulté la littérature scientifique afin de passer en revue les méthodes d'analyse de la spermine dans les matrices environnementales. Nous constatons que la détermination de la spermine repose essentiellement sur des méthodes chromatographiques, électrochimiques et immunologiques. Dans ce travail, nous avons opté donc pour une nouvelle méthode basée sur spectrophotométrie UV/Visible. Pour cela nous d'abord déterminé les caractéristiques spectrales de l'orthophtaladéhyde (OPA), de la spermine et du complexe OPA-SPERMINE. Ensuite, nous avons évalué les paramètres analytiques du complexe en milieu aqueux. Pour un diagnostic rapide du cancer, nous comptons améliorer notre méthode pour une éventuelle application à la détermination de la spermine dans les biofluides (urine, salive et sang).

Mots Clés : Spermine ; Orthophtaladéhyde (OPA) ; Analyse ; Spectrophotomètre UV/Visible