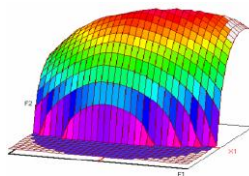




Année Universitaire : 2015-2016



Master Sciences et Techniques CAC Agiq
Chimiométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion industrielle de la qualité

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Validation de la méthode de détermination de l'histamine dans les produits de la pêche par chromatographie sur couche mince

Présenté par:

TAZI AICHA

Encadré par:

- Pr. EL ASRI MOHAMMED (FST Fès)
- Dr. EL MAADOUDI MOHAMMED (LRART-ONSSA)
- Dr. ALAHLAH NAWAL (LRART-ONSSA)

Soutenu Le 14 Juin 2016 devant le jury composé de:

- Pr. M. EL ASRI (FST Fès)
- Pr. Y. KANDRI ROUDI (FST Fès)
- Pr. A. BEN-TAMA (FST Fès)

Stage effectué à : Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de l'ONSSA de Tanger



DEDICACE

Je dédie ce travail à :

✚ Mes très chers parents,

Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte.

En témoignage, je vous offre ce modeste travail qui représente le fruit de votre soutien moral et matériel, vos sacrifices, et vos encouragements.

Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation et mon bien être.

Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !

✚ Mes chères frères et sœurs,

Que vous acceptiez ici l'hommage de ma gratitude, qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera jamais à la hauteur de votre tendresse et votre dévouement.

Puisse Dieu, le tout puissant nous unir pour toute la vie.

✚ Toute ma famille,

Aucun de mes mots ne saurait exprimer mes gratitudes et mes respects.

✚ Mes professeurs,

Mes professeurs que je remercie bien infiniment pour tous les efforts qu'ils ont fournis pour me former.

Que dieu vous préserve tous et vous procure sagesse et bonheur.

✚ Mes meilleures amies,

Pour les moments agréables et l'entraide qui a régné entre nous.



Remerciement

Je tiens à présenter mes sincères remerciements à la direction du laboratoire régionale d'analyse et de recherche de Tanger, pour sa sensibilisation vis-à-vis des étudiants, en leur accordant des stages.

Mes remerciements chaleureux s'adressent également à Mr. MAADOUDI MOHAMED, le directeur du laboratoire régionale d'analyse et de recherche de Tanger, pour son encadrement, son soutien scientifique et morale et tous ses conseils judicieux qu'elle m'a prodigués.

J'exprime mes sincères remerciements à Dr. NAWAL, la cheffe de section de chimie alimentaire du L.R.A.R.T pour m'avoir initiée à la recherche et diriger ce travail avec beaucoup d'intérêt ainsi pour ses orientations précieuses.

L'expression de mon profond respect à mon encadrant Mr. Pr. AL ASRI MOHAMMED d'avoir accepté de m'encadrer et de me suivre rigoureusement durant la préparation de ce travail. Je suis très reconnaissante pour ses efforts, ses compétences, sa disponibilité en cas de question et/ou de problèmes lors de la mise au point de mon projet.

Je présente mes sincères remerciements à Mr. Pr. EL HADRAMI MOUSTAFA, responsable du master « Chimiométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion industrielle de la qualité » et à tous mes enseignants de la FST de Fès pour leurs aides et leurs efforts.

Ainsi mes gratitudes aux membres de jury : Mr. Pr. Y.KANDRI RODI et Mr. Pr. BEN-TAMMA, pour l'honneur qu'ils m'ont accordé, en acceptant d'évaluer et de juger ce travail.

Mes vifs remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire régional d'analyse et de recherche de Tanger et plus spécialement Mme. ASMAE et Mr. ABDELLETIF, qu'ont mis à ma disposition tous les moyens pour faciliter la réalisation de ce travail.

En fin, un grand merci à toute personne contribuant de près ou de loin à la réalisation du présent rapport et en particulier le doctorant Ayoub.



Introduction générale

Au cours de ces dernières décennies, une plus grande attention est portée à la sécurité alimentaire que ce soit sur les contaminants chimiques, les contaminants physiques ou les contaminants d'origine biologique afin de protéger la santé humaine.

La recherche des contaminants d'origine naturelle et biologique tels que les amines biogènes est particulièrement importante, car certaines de ces molécules, notamment l'histamine, sont dangereuses pour l'homme si la dose ingérée est trop élevée.

En effet, l'intoxication histaminique constitue la première cause de toxi-infection alimentaire liée à la consommation de poisson à l'échelle mondiale dont les plus souvent incriminés appartiennent aux familles des *Scombridés* (thon, germon, bonite, maquereau) et des *Scombrésocidés* (balaou, scombrérosoce). Mais elle peut également se voir avec plusieurs espèces de la famille des engraulidés (anchois), ainsi la détermination de la quantité d'histamine est très importante, tant en terme d'amélioration de la sécurité sanitaire liée à la consommation des poissons puisque la majorité de la population dans le monde vit dans les zones côtières et dépendent ainsi des productions marines, qu'en terme d'économie pour l'industrie des produits de la pêche.

Selon le règlement européen N°2073/2005 du 15 Novembre 2005, le taux limite d'histamine est fixé à 10mg/100g. Cependant, ces limites d'acceptabilités de l'histamine dans les poissons changent d'un pays à un autre. Cette hétérogénéité dans la normalisation est liée d'avantage à la diversification des interprétations scientifiques et à la nature des systèmes de protection des marchés intérieurs.

Dans cette perspective, vient mon stage au sein de laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de l'ONSSA qui est chargé de contrôle officiel pour garantir la sécurité sanitaire des produits alimentaires et qui m'a proposé le projet présenté dans ce mémoire consistant à valider la méthode de détermination de l'histamine dans les poissons par chromatographie sur couche mince.

Dans le présent travail, nous avons repartis notre démarche en deux parties :

La première partie est consacrée à l'étude bibliographique au sujet : les techniques d'analyses utilisées pour qualifier la qualité des poissons, généralités sur l'histamine, la présentation de la méthode analytique utilisée dans notre étude ainsi que le principe de la validation d'une méthode d'analyse.

Dans la deuxième partie, nous avons présenté les matériels utilisés dans la partie pratique de ce travail et nous avons détaillé le mode opératoire réalisé, puis une optimisation du milieu analytique de déroulement de la technique et la réalisation des différents tests statistiques sur les résultats obtenus dans la partie pratique en vue de conclure quant à la validation de la méthode analytique utilisée.



Sommaire

Introduction	
générale.....	4
Etude bibliographique :	
I- Présentation de l'ONSSA	9
1- Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Tanger de l'ONSSA.....	9
II- Différentes méthodes de caractérisation de la qualité des poissons	10
1- Analyses sensorielles	10
2- Méthodes microbiologiques	11
3- Méthodes chimiques	11
a- Azote basique volatil totale(ABVT).....	11
b- Formaldéhyde	11
c- Amines biogènes	11
III- Généralités sur l'histamine	12
1- Définition	12
2- Formation	13
a- Origine endogène	13
b- Origine exogène	13
3- Seuil de toxicité	14
4- Actions et symptômes.....	14
5- Aliments associés	15
6- Réglementation	15
IV- Détermination de l'histamine dans les poissons par Chromatographie sur couche mince	16
1- Définition de la chromatographie.....	16
2-Définition de la chromatographie sur couche mince	16
3- Protocole de la chromatographie sur couche mince	18
a- Préparation de la cuve	18
b- Préparation de la plaque	18



V-Validation d'une méthode d'analyse.....	20
1-Définition de la validation	20
2-Intérêt et démarche de la validation dans un laboratoire d'analyse.....	20
3-Critères de validation	21
VI- Etude statistique de la validation d'une méthode d'analyse par la méthode classique.....	23
1- Etude de la linéarité	23
2- Justesse	27
3- Fidélité	27
4- Robustesse	29
Etude pratique :	
I- Mise au point de la méthode de détermination de l'histamine par chromatographie sur couche mince	31
1- Référence de la technique d'analyse	31
2- Principe	31
3- Réactifs	31
4- Appareillages et matériels	32
5- Mode opératoire	32
a- Préparation de la matrice	32
b- Extraction de la matrice	33
c- Préparation des solutions étalons	33
+ Gamme d'étalonnage d'histamine	33
+ Solutions étalons des amines biogènes	33
+ Solution étalon de mélange des amines biogènes	34
d- Fortification des prises d'essais	34
+ Fortification des prises d'essais par l'histamine	34
+ Fortification des prises d'essais par les amines biogènes	34
e- Dérivatisation de l'histamine par le chlorure de dansyle d'après le mode opératoire.....	35
f- Etape CCM	35
II- Validation de la méthode de détermination de l'histamine par chromatographie sur couche mince par l'approche classique	42



1- Etude de la linéarité	44
2- Justesse	51
3- Fidélité.....	53
4- Robustesse.....	56
III- Aspect qualitatif de la validation des performances de CCM.....	57
1- Limite de détection	57
2- Spécificité	57
Conclusion générale.....	59



PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



I- Présentation de l'ONSSA :

L'Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires ou ONSSA est un organisme public marocain responsable de la sécurité sanitaire des produits alimentaires et de la conformité des aliments importés au Maroc. Il est placé sous la tutelle du ministère marocain de l'Agriculture et de la Pêche Maritime. Il est l'équivalent marocain de l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments ou de la FDA.

Cet office regroupe tous les services de contrôle. Il intègre à la fois les services de contrôle des produits végétaux et des produits animaux et il est également en charge de la préservation de la santé animale et de la santé végétale. De même, l'ONSSA est chargé d'homologuer et de contrôler les intrants agricoles (semences, pesticides, engrais) et les médicaments vétérinaires.

Les missions dévolues à l'office sont régies par un arsenal juridique composé de plus de 200 textes législatifs et réglementaires en vigueur.

1- Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Tanger de l'ONSSA :

Créé depuis 1973 et placé sous la tutelle de la Direction d'Elevage du Ministère de l'Agriculture, le LRART est devenu depuis l'avènement de l'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires le 1er Janvier 2010 une division rattachée à la Direction Régionale de l'ONSSA de Tanger-Tétouan.

Le laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Tanger relevant de l'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires vient d'être accrédité, conformément aux critères de la norme ISO/CEI 17025: 2005 dans les analyses suivantes :

- ➔ Dosage de l'histamine par HPLC et spectrofluorimétrie (Lerck et Bell)
- ➔ Dosage des métaux lourds (mercure et plomb)
- ➔ Dosage des dioxydes de soufre dans les crustacés
- ➔ Dosage de l'ABVT dans les poissons frais

Cette accréditation a été accordée par le Service marocain d'accréditation (SEMAC) relevant du Ministère de l'Industrie, du Commerce et des Nouvelles Technologies.

Ceci signifie qu'il remplit les exigences générales de compétence technique pour effectuer ces essais ainsi que la production des résultats techniquement valides.

Le LRART est doté de locaux adaptés et d'équipements performants et est organisé en trois sections techniques :

La section de santé animale, la section de microbiologie alimentaire, et la section de chimie et toxicologie alimentaire dont nous développerons les activités :



a- Section santé animale :

La section de santé animale effectue des analyses dans le cadre de l'épidémie-surveillance des maladies contagieuses animales (contrôle des animaux vivants à l'import ou faisant l'objet de transaction dans le cadre de marché de l'état), ainsi que l'établissement du diagnostic des maladies infectieuses animales d'importance économique (Bactériennes, parasitaires) ou sanitaire (Rage) :

- Analyses en sérologie
- Analyses de biologie moléculaire
- Analyses en bactériologie
- Analyses en parasitologie

b- Section microbiologie alimentaire :

c- Section de chimie et toxicologie alimentaire :

La section de chimie réalise ses prestations de service dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle établis par les directions nationales, ainsi qu'à la demande des services vétérinaires de la zone d'action du laboratoire dans le cadre de la certification sanitaire des denrées alimentaires d'origine animales. Elle répond de même aux demandes des professionnels de l'industrie alimentaire en matière d'autocontrôle de leur production.

Les analyses effectuées sont les suivantes :

- Analyses de la composition des aliments des animaux
- Analyses des produits laitiers
- Analyses des produits de la pêche
- Dosage de l'ABVT dans les poissons frais
- Dosage du dioxyde de soufre dans les crustacés
- Dosage des métaux lourds
- Recherche et dosage des biotoxines marines dans les tissus des mollusques bivalves
- Recherche des résidus de pesticides
- Recherche des aflatoxines dans les aliments pour animaux et les mycotoxines M1 dans les produits laitiers
- Dosage de l'histamine dans les poissons frais, congelés, conserves et semi-conserves.

II- Différentes méthodes de caractérisation de la qualité des poissons :

1- Analyses sensorielles :

L'analyse sensorielle est définie comme étant une nouvelle discipline scientifique qui a pour but de définir, mesurer, analyser et interpréter les caractéristiques organoleptiques d'un produit telles qu'elles sont perçues par les organes des sens: c'est-à-dire ses propriétés gustatives, olfactives, visuelles, auditives et tactiles.



Selon les règlements de l'union européenne, cette méthode est exigée lors de contrôle de qualité des poissons pour l'évaluation de leur fraîcheur et pour la détermination de leur durée de conservation restante.

2- Méthodes microbiologiques :

Le but des examens microbiologiques des produits de la pêche et les poissons est d'évaluer la présence possible des bactéries ou d'organismes pouvant avoir des conséquences néfastes sur la santé publique et de donner une idée sur la qualité hygiénique du poisson incluant la rupture de la chaîne du froid, l'hygiène au cours de la manutention et du traitement. Les données microbiologiques ne fournissent pas en générale des informations sur la fraîcheur. Les examens bactériologiques traditionnels sont complexes, longs, coûteux et requièrent des compétences pour leur exécution et l'interprétation des résultats.

3- Méthodes chimiques :

Les méthodes chimiques retenues pour l'évaluation de la qualité des produits de la mer sont plus fiables et plus précises et elles doivent être en corrélation avec la qualité sensorielle, à savoir :

a- Azote basique volatil totale(ABVT):

Depuis 1937, Beatty a montré que l'évolution des composés aminés volatils se corrélait avec l'évolution bactérienne dans un extrait de jus de poisson. Au niveau chimique, c'est la mesure d'ABVT qui fait référence par la décision de la commission du 8 mars 1995 (95/149/CE) et en fixant les valeurs limites en azote basique volatil total pour certaines catégories des produits de la pêche. L'ABVT comprend principalement la triméthylamine (produit par les bactéries d'altération et elle est considéré comme le principale cause de mauvaises odeurs dans les produits de la pêche), l'ammoniac et la diméthylamine (produit par les enzymes autolytique durant la congélation). Ces indicateurs ne sont pas performants sur toutes les espèces, de manière générale, on exclut les thonidés et les poissons gras. Il faut aussi limiter cette analyse aux produits qui n'ont pas subi des transformations comme la cuisson, la salaison, la fumaison ou qui sont préemballés. Ce sont plus des indicateurs qui reflètent les stades d'altération plutôt que la fraîcheur mais ils restent encore utilisés de nos jours.

b- Formaldéhyde :

Le formaldéhyde contenu dans les produits de la pêche est considéré comme non toxique, cependant, il peut réagir avec plusieurs composés chimiques comme les résidus des acides aminés et les composés de faible poids moléculaires, ce qui entraîne la dénaturation des protéines. Le formaldéhyde contenu dans les produits de la pêche congelés est généralement utilisé comme indicateur d'altération.

c- Amines biogènes :

Les amines biogènes sont définies comme des molécules de faibles poids moléculaires et biologiquement actives sur le système nerveux central et sur le système vasculaire.



Elles interviennent dans la régulation de la température corporelle, le pH de l'estomac et la pression sanguine.

La concentration des amines biogènes a été rapportée comme étant une méthode fiable de mesure de la qualité du poisson. Les amines biogènes sont générées par la décarboxylation microbienne des acides aminés libres spécifiques dans les poissons et les crustacés. Les plus importantes amines biogènes produites après la mort du poisson sont la putrescine, la cadavérine, la spermidine, la spermine (amines aliphatiques), l'histamine, la tryptamine (hétérocycliques), la tyramine, β -phényléthylamine (amines aromatiques). Elles sont classées en fonction du nombre de groupements aminés, en diamines (histamine, putrescine, cadavérine), en monoamines (β -phényléthylamine, tyramine, tryptamine) ainsi qu'une polyamine (agmatine). La consommation des produits de la mer contenant des fortes quantités de ces amines peut avoir des effets toxicologiques et peut encore plus poser des problèmes pour les personnes sensibles. Parmi ces amines biogènes, on trouve que l'histamine est potentiellement dangereuse et est l'agent causant des intoxications histaminiques. D'autres, surtout putrescine, tyramine et cadavérine, sont rapportés pour augmenter la toxicité de l'histamine. La teneur en amines biogènes dans les poissons dépend de l'espèce, de la teneur en acides aminés libres, de la présence des microorganismes décarboxylase, du moment de la capture et du contenu de la flore microbienne dans l'estomac à la mort qui varie suivant les saisons.

Nous pouvons citer sans entrer dans les détails les autres différentes approches utilisées pour essayer de caractériser la fraîcheur d'un poisson :

- Mesure de l'oxydation des acides gras.
- Caractérisation de la dégradation des protéines.
- Quantification des dérivés nucléotidiques de l'ATP.
- pH.

III- Généralités sur l'histamine :

1- Définition :

Cette molécule, découverte en 1910 par Akerman, est d'une part produite par l'organisme et d'autre part fournie par l'alimentation. C'est un neuromédiateur largement impliqué dans les phénomènes inflammatoires et allergiques. Dans notre corps, elle est synthétisée à partir d'un acide aminé : l'histidine et elle est stockée principalement dans les cellules immunitaires, qui la libèrent lorsqu'ils sont stimulés par la présence d'une molécule étrangère comme un allergène [11].

Dans le domaine alimentaire, elle appartient aux amines biogènes, qui se forme au cours de la fermentation microbienne de l'alimentation comme conséquence de sa détérioration.

L'histamine est la 2-(imidazol-4-yl) éthanamine et a pour formule $C_5H_9N_3$. C'est une base soluble dans l'eau, l'alcool et le chloroforme établissant d'une liaison hydrogène mais peu soluble dans les solvants organiques apolaires.



2- Formation :

a- Origine endogène :

La muqueuse digestive est le lieu le plus riche en histamine de l'organisme : 17 $\mu\text{g/g}$ au niveau gastrique, 10 $\mu\text{g/g}$ au niveau duodenojejunal. Ces fortes teneurs s'expliquent par la synthèse et le stockage de l'histamine dans les mastocytes, cellules très abondantes dans la muqueuse digestive.

L'histamine peut se former aussi par le phénomène d'autolyse tissulaire : sous l'action d'enzymes histidine décarboxylases tissulaires, il y a formation d'histamine post-mortem.

b- Origine exogène :

Dans les aliments, l'histamine se forme par décarboxylation de l'histidine libre par une enzyme d'origine principalement bactérienne: l'histidine décarboxylase. Après la mort du poisson et dans certaines conditions de stockage, notamment à partir de +7 °C, les bactéries produisant l'histidine décarboxylase peuvent se multiplier conduisant à la formation d'histamine. Cependant, d'autres recherches ont montré que certaines bactéries étaient actives entre 2 et 5°C.

La formation de l'histamine dans les poissons dépend de 3 facteurs essentiels :

- La teneur en histidine, directement liée à l'espèce animale. Les poissons appartenant aux familles des Scombridés (thon, bonite, maquereau), des Clupéidés (sardine, hareng) ou des Engraulidés (anchois), présentent la plus forte prédisposition à synthétiser de l'histamine après leur mort.
- L'absence de congélation ou retard à la congélation au bord des bateaux de pêche.
- La présence des bactéries capables de synthétiser l'histidine décarboxylase. Les principales bactéries responsables de la formation d'histamine appartiennent à la famille des Enterobactéries (Malle 2006).

On peut souligner que la production endogène de ces amines (autolyse par les enzymes tissulaires) est beaucoup moins importante que celle par la voie exogène bactérienne (Wendakoon&Sakaguchi, 1992).

Les conditions d'hygiène lors des manipulations liées à la préparation et à la transformation du poisson, sont très importantes dans la mesure où elles peuvent éviter la contamination du poisson par les bactéries produisant l'histidine décarboxylase.

De la même façon, les conditions de conservation ont également une influence essentielle sur la formation d'histamine car elles conditionnent la multiplication de ces bactéries. Ainsi, l'histamine ne peut pas se former dans les poissons congelés, ni dans les conserves stérilisées par la chaleur.

La stabilité thermique de l'histamine ne permet pas de diminuer les risques à la cuisson (Ijomah *et al.* 1992). Elle n'est pas détruite ni par la congélation, ni par le salage



et ni par la stérilisation et peut être présente dans les conserves (Dalgaard 2007), d'où la nécessité de la maîtrise de la chaîne du froid et l'application stricte des règles d'hygiène.

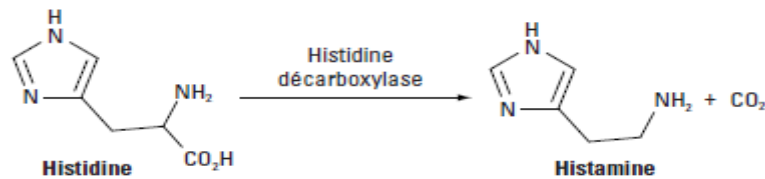


Figure 1 : Réaction de décarboxylation de l'histidine en histamine.

3- Seuil de toxicité :

Il est difficile de définir un seuil précis de toxicité car il dépend de nombreux facteurs, notamment de la grande différence de sensibilité entre les individus :

- ➔ Les teneurs en histamine ne sont pas homogènes dans toutes les parties du poisson.
- ➔ La toxicité de l'histamine peut être accrue par la présence d'autres amines biogènes qui peuvent avoir un effet synergique.
- ➔ La consommation d'alcool ou de médicaments (par exemple, antidépresseurs) peut également accroître la toxicité de l'histamine en inhibant les enzymes de détoxification de cette molécule.

Pour l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), des teneurs en histamine inférieures à 50 mg.kg⁻¹ sont sans effet toxique, celles de 50 à 100 mg.kg⁻¹ provoquent quelques intoxications légères, mais des concentrations de 100 à 1 000 mg.kg⁻¹, le produit est considéré comme toxique.

4- Actions et symptômes:

La consommation des aliments renfermant de fortes quantités d'histamine peut induire des effets toxiques dans l'organisme. Les principaux symptômes observés sont liés à l'effet vasodilatateur de l'histamine. La dilatation des capillaires sanguins entraîne des phénomènes d'hémoconcentration. Les symptômes les plus souvent rencontrés sont une rougeur facio-cervicale, une éruption cutanée, un œdème du visage, des bouffées de chaleur, une sensation de brûlure dans la gorge, un goût de poivre dans la bouche, des démangeaisons, des picotements de la peau. Ces symptômes cutanés sont les plus spécifiques de l'intoxication histaminique et peuvent orienter le diagnostic. Ils sont généralement suivis de troubles de type céphalées, palpitations cardiaques, étourdissements. Des symptômes secondaires, de nature gastro-intestinale, peuvent apparaître : nausées, maux d'estomac, vomissements, diarrhées.

En général, la période d'incubation est courte, elle varie de quelques minutes à quelques heures. Les symptômes disparaissent spontanément en général en trois heures.

Exceptionnellement, ils peuvent durer plusieurs jours dans les cas les plus graves et seuls les antihistaminiques sont capables d'arrêter ces symptômes, en bloquant l'action de l'histamine sur ses récepteurs.



L'incidence de ce phénomène, trop souvent pris pour une allergie alimentaire, est sous-estimée à cause d'un mauvais diagnostic.

Les intolérances à l'histamine traduisent manifestement une prédisposition individuelle et entrent dans le cadre des maladies dites « fausses allergies alimentaires » car elles miment cliniquement l'allergie alimentaire sans mettre en jeu des mécanismes immunologiques.

Ainsi, l'ingestion d'aliments contenant des doses élevées d'histamine peut entraîner chez tous les sujets une réaction ressemblant à une réaction anaphylactique de sévérité proportionnelle à la quantité ingérée, pouvant aller au choc histaminique.

5- Aliments associés :

Parmi les aliments, riches en histamine, les plus impliqués sont les poissons appartenant à la famille des Scombridés. Ils sont la source la plus courante de l'intoxication à l'histamine. On compte parmi ces poissons le thon, la bonite et le maquereau. Les poissons des autres familles, comme les Clupéidés (hareng, sardine, mahi-mahi) et Engraulidés (anchois), peuvent également être impliqués.

On cite également le chocolat, certains produits alimentaires fermentés (vin, bière, choucroute) et certains fromages (roquefort, gruyère, cheddar, gouda, édam, emmental). La grande variabilité dans les teneurs en amine rencontrée dans ces fromages dépend de nombreux facteurs : leurs caractéristiques biochimiques, la composition des communautés microbiennes des laits et des ferments puis leur dynamique en cours d'affinage ou la durée de l'affinage.

Des aliments histamino-libérateurs peuvent être également rencontrés : des fruits (parmi lesquels la tomate, la fraise, l'ananas, la banane, les agrumes...), des légumineuses dont les arachides, les crustacés, l'œuf, l'alcool, et les colorants alimentaires comme E 102.

6- Réglementation :

Les règlements communautaires 2073/2005, puis 11441/2007 fixent les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche. Lors d'un plan de surveillance, neuf échantillons sont prélevés sur chaque lot :

- la teneur moyenne ne doit pas dépasser 100 mg.kg^{-1}
- deux échantillons peuvent dépasser 100 mg.kg^{-1} sans atteindre 200 mg.kg^{-1}
- aucun échantillon ne doit dépasser 200 mg.kg^{-1} .

Ces limites s'appliquent seulement aux poissons des familles suivantes :

- *Scombridés* : (maquereaux, thons, thazards, bonites)
- *Clupeidés* : (harengs, menhadens, aloses, sardines)
- *Engraulidés* : (anchois)
- *Coryphaenidés* : (coryphènes).



Toutefois, les poissons de ces familles, qui ont subi un traitement de maturation enzymatique dans la saumure, peuvent avoir des teneurs en histamine plus élevées mais ne dépassant pas le double des valeurs indiquées ci-dessus.

IV- Détermination de l'histamine dans les poissons par Chromatographie sur couche mince :

Plusieurs méthodes ont été développées pour analyser l'histamine et autres amines biogènes dans la nourriture et particulièrement les poissons. Ces méthodes font appel à des analyses biologiques et chimiques, seules les techniques chromatographiques ont la capacité de séparer les différentes amines biogènes. Parmi celles-ci figure la chromatographie sur couche mince.

1- Définition de la chromatographie :

La chromatographie est une technique de séparation des composés présents dans un échantillon donné. Celle-ci peut être analytique, on cherche alors à identifier les composés présents, ou préparatrice, il s'agit dans ce cas de purifier les composés.

Les composés de l'échantillon sont entraînés par le courant de la phase mobile (liquide ou gaz) à travers la phase stationnaire (également nommée phase fixe) qui est soit placée dans la colonne soit fixée sur une surface plane, ces deux phases doivent être non miscibles.

Selon la nature des phases choisies et les caractéristiques des composés, ceux-ci seront élués à des vitesses différentes, il s'agit de leur interaction (affinité) vis-à-vis des deux phases, ainsi l'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

De nombreux facteurs sont donc à prendre en compte pour la réussite d'une chromatographie et le choix des phases doit être adapté.

A partir de ce principe très général, on peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées ou les phénomènes mis en œuvre dans la séparation. Celle qui nous intéresse dans le présent rapport est la chromatographie sur couche mince.

2-Définition de la chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince est souvent désignée par le terme de la chromatographie de surface ou ascendante, est une séparation simple à mettre en œuvre, flexible et rentable technique à la fois une analyse qualitative et quantitative et permettant l'analyse simultanée de plusieurs échantillons à l'exigence minimum de temps. CCM peut être effectuée manuellement par des moyens simples et peu coûteux sans avoir à recourir à des instruments sophistiqués. Ceci explique son emploi très fréquent dans les laboratoires.

Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique), d'identification ou encore le contrôle de l'avancée d'une réaction chimique, ou enfin la vérification de l'efficacité d'une purification ou d'une extraction.



Elle est basée sur la différence d'affinité des composés à l'égard des 2 phases (mobile et stationnaire), elle joue sur le temps de séjour des analytes dans chaque phases, plus ils ont d'affinité pour la phase stationnaire, plus ils vont y passer du temps, donc leur temps de rétention total va être rallongé. Ainsi, la vitesse de déplacement des solutés dépend de leur nature et de deux forces:

- ✓ Les forces d'attraction de l'adsorbant sur les solutés (phénomène d'adsorption).
- ✓ Les forces d'entraînement de l'éluant qui tendent à les extraire (phénomène de solubilité ou de partage si le solvant est un mélange).

Les séparations sont basées sur le principe de polarité, c'est-à-dire l'existence de dipôles dans une structure moléculaire. Les principaux éléments d'une séparation sur couche mince sont :

- ✓ Une phase stationnaire : une couche mince uniforme très fine de matériel absorbant (usuellement de gel de silice, de l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose) fixée sur une plaque facile au découpage pour que la phase stationnaire ne se détache pas de ce support (l'aluminium ou le plastique) à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou un polymère organique.
- ✓ Une phase mobile ou éluant : un solvant ou un mélange de solvants (polaire et apolaire) qui permet de faire migrer même les espèces qui ont une affinité pour la phase stationnaire, ceci a pour utilité d'éviter que plusieurs produits seront confondus sur la ligne de base, donc l'éluant doit être adapté aux composés à séparer. L'éluant doit être chimiquement inerte.

On dépose sur la phase stationnaire une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact avec la phase mobile dans la cuve. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase stationnaire en entraînant les constituants du mélange. Lorsque les produits sont colorés, leur progression est facilement observable sur la plaque. Dans le cas contraire, une fois l'élution est terminée et après séchage de la plaque, les positions des différentes taches formées par les produits sont révélées en utilisant une lampe UV : alors si la plaque est fluorescente, toute la plaque apparaît verte sauf là où il y a l'échantillon car ce dernier désactive la fluorescence et il apparaît comme une tache sombre que l'on entoure au crayon. Ou encore en appliquant des révélateurs chimique en plusieurs pulvérisations, ce dernier peut être universel comme : l'iode premier révélateur à tester, car il est non destructif. Il permet de révéler les doubles liaisons et les halogénures en formant des taches jaunâtres. Ou des révélateurs chimique spécifiques comme : ninhydrine pour les acides aminés (taches violettes), le nitrate d'argent pour les halogénoalcanes, le révélateur de Dragendorff est spécifique pour les amines. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur caractéristique, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f).

❖ Définition du R_f :

Le R_f d'un composé est le rapport entre la distance parcourue par le soluté et la distance parcourue par la phase mobile, il est caractéristique d'une espèce donnée pour un système chromatographique donné, il permet de vérifier et identifier que les espèces obtenues sont



celles attendues en comparant leurs R_f avec les témoins (les substances migrant à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques ont le même R_f).

Le R_f des produits dépend de leur affinité relative pour la phase stationnaire et la phase mobile. Dans la plupart des cas, la phase stationnaire est polaire. Plus un composé est lui-même polaire, plus il aura d'affinité pour la phase stationnaire et, par conséquent, plus il sera retenu sur la plaque. Plus on augmente la polarité de l'éluant, plus il entre en compétition avec la phase stationnaire et puisqu'il est en mouvement, plus il entraîne le composé avec lui.

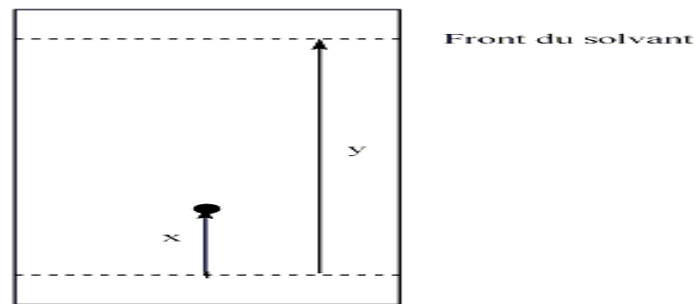


Figure 2 : Migration en CCM

3- Protocole de la chromatographie sur couche mince :

a- Préparation de la cuve :

- On prend des cuves en verre et on note sur chacune, la proportion du solvant qui contient.
- On remplit chaque cuve par le solvant approprié avant de commencer la chromatographie afin de laisser le temps à l'équilibre liquide/vapeur d'être atteint.
- La recouvrir, afin que l'atmosphère dans la cuve reste saturée en vapeurs d'éluant et pour ne pas évaporer le solvant de façon à avoir des valeurs reproductibles.
- Il est important que l'éluant doit être chimiquement inerte avec le mélange à séparer.



Figure 3 : Cuve de migration en CCM

b- Préparation de la plaque :

- La plaque est recouverte de la phase stationnaire, dans ce cas c'est la silice (polaire).
- On trace un trait horizontal (la ligne de départ) à environ 1 cm du bas de la plaque de CCM.



- Le niveau de l'éluant devant être en dessous du produit déposé sinon le soluté sera dissous dans la phase mobile.
- Au niveau des lignes de départ, on sépare les points des solutions de 1cm et du bord de la plaque pour éviter leurs chevauchements.
- A la tête de la plaque, on note l'éluant utilisé et son pourcentage.
- On prend le capillaire ou la micropipette du côté le plus bas et on dépose brièvement avec soin sans appuyer le capillaire sur la plaque afin de ne pas la creuser, une petite quantité de l'échantillon, on sèche le solvant pour qu'il n'entre pas en concurrence avec la phase mobile et on sèche également entre chaque dépôt pour éviter l'élargissement des taches.
- Après avoir tout déposé, on sèche le dépôt à l'aide d'un séchoir ou à l'air libre.
- A la dernière minute, on ouvre la cuve et on place verticalement la plaque de CCM dans la cuve contenant l'éluant pour que le niveau de la phase mobile qui monte le long de la plaque par capillarité soit le même en tout point de la plaque, en évitant ainsi de déplacer la cuve pour que la vitesse initiale de la phase mobile soit nulle, lorsque la phase mobile arrive presque en haut de la plaque, on sort cette dernière de la cuve et on trace rapidement la ligne d'arrivée (ou front de solvant) où l'éluant s'est arrêté de migrer et on sèche l'éluant.
- On révèle les taches formées par l'échantillon à l'aide l'une des moyennes évoquées ci-dessus et si l'analyse est qualitative, les taches parcourues les mêmes distances que les témoins ont de grande chance d'être de même nature.
- Si l'analyse est quantitative : les méthodes de dosage quantitatif de solutés distincts sur un chromatogramme CCM peuvent être classées en deux catégories dont les plus fréquentes, repose sur une mesure de la photodensité des taches, directement sur la plaque à l'aide d'un densimètre. Cet appareil détecte les différentes taches par réflexion ou absorption d'un pinceau lumineux qui balaie la plaque en suivant généralement la ligne de développement. La différence d'intensité de la lumière réfléchi(e) ou transmise entre l'adsorbant et les taches de soluté se traduit par une série des pics dont Les hauteurs correspondent aux fluorescences des taches donc aux quantités des substances présentes dans les différents échantillons. Grace aux progrès de la conception des densimètres optiques, la fiabilité des dosages quantitatifs de CCM s'est considérablement améliorée.
- Il existe une méthode moins onéreuse consistant à recueillir les constituants, après séparation et développement, en raclant les parties correspondantes de l'adsorbant, après examen, par une technique non destructrice. On extrait facilement le constituant en plaçant l'adsorbant dans un tube de centrifugeuse et en ajoutant un solvant appropriée pour le dissoudre. Une fois le soluté dissous, on effectue une centrifugation, le liquide surnageant est recueilli et analysée par une technique quantitative adaptée, telle que la spectrophotométrie dans l'UV ou le visible, la fluorimétrie ou la chromatographie en phase gazeuse. On peut aussi extraire le soluté en transférant l'adsorbant sur une petite colonne remplie de gel de silice retenu par un verre fritté et en éluant avec le solvant. L'extraire est ici encore analysé par une technique quantitative appropriée. Dans les deux cas, il faut disposer d'une courbe d'étalonnage correspondant à des quantités connues du soluté dans le solvant choisi.



V-Validation d'une méthode d'analyse:

Si un laboratoire effectue des analyses, naturellement c'est dans le but d'obtenir des résultats qui seront utiles pour une prise de décision. Ceci fait apparaître le lien étroit entre la qualité d'une analyse et la validation de la méthode qui permet de la faire.

1-Définition de la validation :

Selon la norme **ISO 17025**, la validation se définit comme : « la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies ».

Selon la **FDA** (administration des aliments et des médicaments) : « valider une méthode, consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définies à l'avance ».

Selon la norme **Afnor**, le processus de la validation est défini comme : « l'action de confirmer par examen et l'apport des preuves tangibles obtenues par des études statistiques intra et/ ou inter laboratoires que les exigences particulières pour un usage spécifique prévu de la méthode d'analyse sont satisfaites ».

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée.

2-Intérêt et démarche de la validation dans un laboratoire d'analyse :

La validation d'une méthode d'analyse fait partie des exigences essentielles du système d'assurance qualité dans le domaine de la chimie analytique, et comme la validation des méthodes est requise lorsque le laboratoire utilise des méthodes non normalisées (ou des méthodes développées), il apparaît raisonnable de prétendre que l'objectif de la validation est de garantir au laboratoire officiels, ainsi qu'aux autorisées compétentes les garanties que chaque mesure réalisée ultérieurement en routine, une fois la méthode développée est validée, sera suffisamment proche de la vraie valeur inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable. Le but est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du niveau consommateur ainsi la procédure analytique correspond à l'usage pour lequel elle est prévue.

D'ailleurs, tous les référentiels suivis par les laboratoires affirment que : « Toute méthode doit être validée avant d'être utilisée ».

La détermination de la performance d'une méthode est réalisée par l'utilisation de l'une ou de la combinaison des techniques suivantes :

- ✚ Etalonnage à l'aide d'étalons de référence ou des matériaux de référence.
- ✚ Comparaison des résultats obtenus avec d'autres méthodes.



- ✚ Comparaison entre laboratoires.
- ✚ Evaluation systématique des facteurs influençant le résultat.
- ✚ Evaluation de l'incertitude des résultats sur la base d'une connaissance scientifique des principes théoriques de la méthode et d'une expérience pratique.
- ✚ Evaluation des critères de performances de la méthode.

3-Critères de validation :

Dans cette étude, on vise une méthode semi quantitative pour le dosage de l'histamine dans les poissons qu'on l'assimile à une méthode quantitative, elle fournit un résultat qualitatif extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable. Pour ce type des méthodes, l'incertitude autour du résultat devient une information cruciale lorsqu'il s'agit d'interpréter un résultat ayant une valeur proche de la limite. A noter que Les méthodes semi-quantitatives sont aujourd'hui considérées comme des méthodes quantitatives par COFRAC.

La validation d'une méthode d'analyse entraîne la détermination de plusieurs paramètres à savoir:

Domaine d'application - linéarité - limite de détection - limite de quantification -justesse - fidélité - robustesse - spécificité.

a- Domaine d'application de la méthode :

L'intervalle de mesure d'une procédure analytique est l'intervalle de concentration de la substance à analyser sur lequel, il a été démontré que la procédure possède une fidélité, une exactitude et une linéarité appropriées.

b- Linéarité :

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité à l'intérieur de l'intervalle de dosage (domaine d'utilisation), à fournir des résultats directement proportionnels à la quantité en substance présente dans l'échantillon.

d- Limite de détection d'une méthode:

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée à l'aide d'une méthode d'analyse, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

e- Limite de quantification d'une méthode :

La limite de quantification d'une méthode d'analyse est la plus petite quantité d'un analyte dans un échantillon donné pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.



f- Fidélité :

Exprime l'étroitesse d'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité pour une méthode donnée et elle fournit une indication sur l'erreur systématique :

Répétabilité :

Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

Fidélité intermédiaire (intra laboratoire):

Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs en utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.

Reproductibilité (inter laboratoire) :

Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

g- Justesse:

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série des résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. Elle fournit une indication sur l'erreur systématique. Elle s'exprime généralement en termes de biais. La figure suivante illustre la fidélité et la justesse :

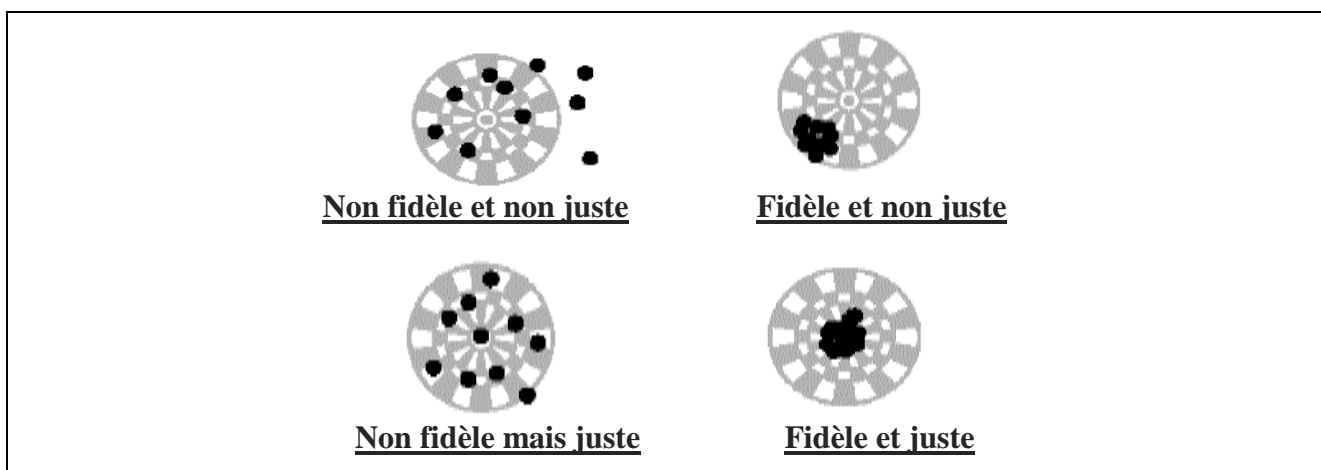


Figure 4 : Représentation de la fidélité et de justesse



h- Spécificité :

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser, en présence des composés susceptibles de l'accompagner. Ces composés comprennent typiquement les impuretés, les produits de dégradation et la matrice.

i- Robustesse :

La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, délibérées, des facteurs associés à la procédure. Elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application.

VI- Etude statistique de la validation d'une méthode d'analyse par la méthode classique:

1- Etude de la linéarité :

La figure ci-dessous résume la stratégie statistique à suivre :

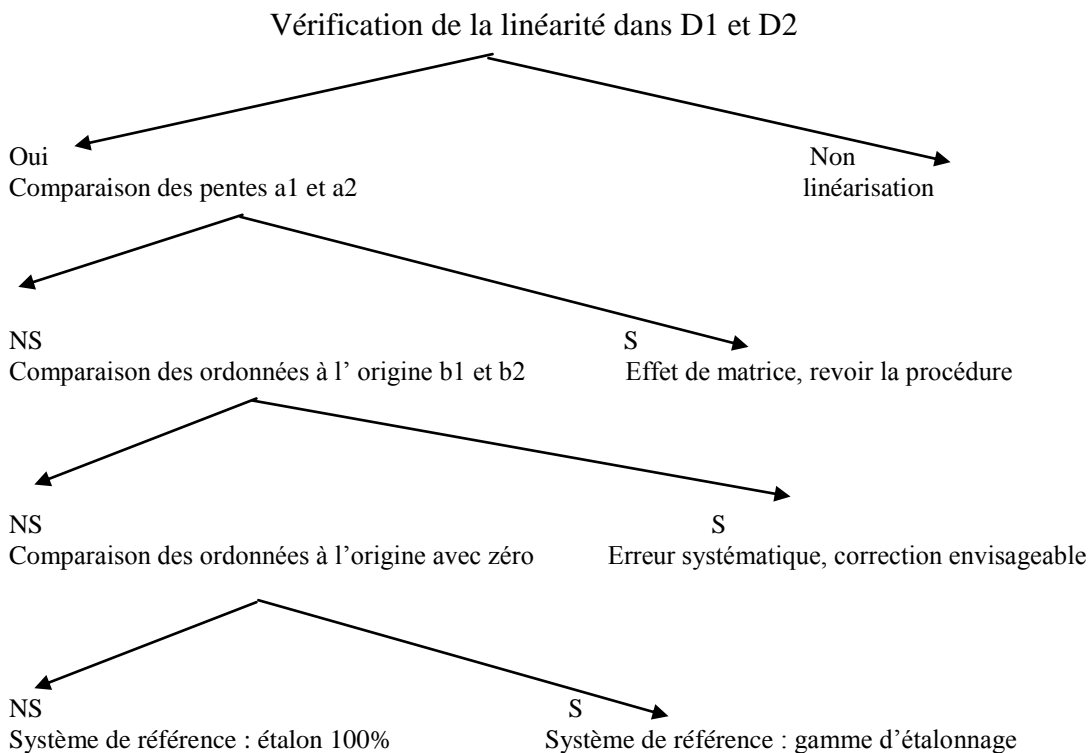


Figure 5 : Vérification de la linéarité

S : test significative

NS : test non significative



a- Test d'homogénéité des variances des niveaux :

Avant d'effectuer des calculs de régression, il convient de vérifier l'homogénéité des variances entre les différents niveaux en effectuant le test de Cochran :

Les hypothèses H0 et H1 à tester sont les suivantes :

- ➔ H0 : Les variances des différents niveaux sont homogènes pour un risque de 5%
- ➔ H1 : les variances des différents niveaux ne sont pas homogènes pour un risque de 5%

$$C_{\text{cal}} = \frac{s^2_{\text{max}}}{\sum_{i=1}^p S_i^2}$$

Avec :

s^2_{max} : est la plus grande variance

$\sum_{i=1}^p S_i^2$: est la somme des variances

Si $C_{\text{cal}} < C(5\%, n, p)$ est vérifiée, on peut affirmer que l'ensemble des variances des différents niveaux sont homogènes au risque de 5%.

$C(5\%, n, p)$: est lu à partir de la table de Cochran avec n : le nombre des répétitions et p : le nombre des niveaux.

b- Régression linéaire :

La méthode statistique de régression des moindres carrés permet d'établir la droite d'étalonnage :

✚ Calcul de la pente(a) et l'écart type Sa :

La pente de la droite de régression et son écart type sont calculées d'après les formules suivantes :

$$a = \frac{SPE_{xy}}{SCE_x} \quad Sa = \sqrt{\frac{S_r^2}{SCE_x}}$$

Avec :

S_r^2 : étant l'écart type des résidus

SPE_{xy} : est la somme des produits des écarts : $SPE_{xy} = \sum \sum (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})$

SCE_x : étant la somme des carrés des écarts pour x_{ij} : $SCE_x = \sum \sum (x_{ij} - \bar{x})^2$

SCE_y : étant la somme des carrés des écarts pour y_{ij} : $SCE_y = \sum \sum (y_{ij} - \bar{y})^2$

✚ Calcul de l'ordonnée à l'origine (b) et l'écart type Sb :

L'ordonnée à l'origine de la droite de régression et son écart type sont calculées d'après les formules suivantes :

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad Sb = \sqrt{s_r^2 \left(\frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{SCE_x} \right)}$$



✚ Calcul de coefficient de corrélation et l'écart type de résidu Sr :

Le coefficient de corrélation est déterminé par la formule suivante :

$$r = \frac{SPE_{xy}}{\sqrt{SCE_x SCE_y}}$$

L'écart type des résidus est :

$$Sr = \sqrt{\frac{SCE_y - \alpha SPE_{xy}}{N-2}}$$

c- Test d'adéquation du modèle linéaire par analyse de la variance :

L'analyse de la variance peut être utilisée pour tester la validité du modèle linéaire :

✚ Vérification de l'existence d'une pente significative :

Ce test consiste à vérifier l'existence d'une pente significative (régression acceptable) c'est-à-dire de s'assurer que la pente provient bien de la régression et non des erreurs résiduelles :

$$F_l = \frac{s_l^2}{s_r^2} > F(\alpha, 1, N-2)$$

Avec :

s_l^2 : Variation due à la régression (linéaire) avec : $SCE_l = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (\widehat{y}_{ij} - \bar{y})^2$; ddl=1

s_r^2 : Variation résiduelle avec : $SCE_r = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \widehat{y}_{ij})^2$; ddl=N-2

F(α , 1, N-2) lu dans la table de Fisher

N : nombre totale des résultats d'analyse

P : nombre de niveau

\widehat{y}_{ij} : étant la réponse prédite par le modèle selon la formule suivante : $\widehat{y}_{ij} = ax_{ij} + b$

Si le test est significatif ($F_l > F(\alpha, 1, N-2)$), on conclut l'existence d'une pente, donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré (risque $\alpha=5\%$).

Sinon, on ne peut pas valider le modèle linéaire et il faut chercher un autre modèle.

✚ Vérification de la validité de la droite de régression :

Ce test consiste à vérifier la validité de la droite de régression (c'est bien une droite dans tout le domaine choisi) c'est-à-dire de s'assurer que la variance caractérisant l'erreur due à une erreur de modèle est bien inférieure à l'erreur expérimentale.

$$F_{nl} = \frac{s_{nl}^2}{s_e^2} < F(\alpha, p-2, N-p)$$



Avec :

s_{nl}^2 : Variance due à l'erreur du modèle (non linéaire) avec : $SCEnl = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (\bar{y}_i - \widehat{y}_{ij})^2$; ddl=p-2

s_e^2 : Variance expérimentale avec : $SCEe = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$; ddl=N-p

F (α , p-2, N-p): lu dans la table de Fisher

Si cette inégalité est vérifiée ou si le test n'est pas significatif, l'erreur du modèle est négligeable, le domaine de linéarité est considéré comme valide au seuil de probabilité considéré.

Sinon le domaine choisi n'est pas linéaire et il faut le réduire. Dans ce cas, il est recommandé de décaler la dernière solution étalon et de refaire le test.

d- Comparaison des droites D1 et D2:

✚ Comparaison des pentes :

Ce test se fait à fin de vérifier si un effet de matrice existe :

$$tcal = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{(s_{a_1}^2 + s_{a_2}^2)}}$$

Alors, si $tcal < t(\alpha, (N_1 + N_2) - 4)$, on peut affirmer que les pentes ne sont pas significativement différentes au risque de α , c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'effet de matrice.

Sinon, il y a un effet de matrice et il faut revoir la procédure.

✚ Comparaison des ordonnées à l'origine :

Ce test est effectué pour vérifier l'absence de l'effet systématique :

$$tcal = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{(s_{b_1}^2 + s_{b_2}^2)}}$$

Si $tcal < t(\alpha, (N_1 + N_2) - 4)$, on peut affirmer que les ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes au risque α , c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'effet systématique.

Sinon, il y a un effet systématique et il faudra effectuer une correction (réglage éventuel).

✚ Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec zéro :

On calcul les coefficients de student (t) des deux droites D1 et D2 :

$$t_1 = \frac{|b_1|}{\sqrt{s_{b_1}^2}} \text{ et } t_2 = \frac{|b_2|}{\sqrt{s_{b_2}^2}}$$



Si $t_{cal} < t(\alpha, N-2)$, alors l'ordonnée à l'origine de la droite étudiée (D1 ou D2) n'est pas significativement différente de zéro au seuil de probabilité considéré. Dans ce cas, on peut calibrer avec un seul point à 100%.

Sinon, l'ordonnée à l'origine de la droite étudiée est significativement différente de zéro au seuil de probabilité considéré. Dans ce cas, on doit calibrer avec une gamme.

2- Justesse :

Il est tout d'abord nécessaire de calculer le recouvrement R pour chaque quantité trouvée d'après la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Quantité trouvée}}{\text{Quantité introduite}} * 100$$

a- Test d'homogénéité des variances :

Le test de Cochran est appliqué pour vérifier l'homogénéité des variances du recouvrement constitutives de l'erreur expérimentale.

b- Test d'homogénéité des moyennes :

On procède à une analyse par ANOVA pour vérifier si les moyennes des différents niveaux sont homogènes ainsi il n'existe pas un effet de niveau.

✚ Estimation du recouvrement moyen :

Après avoir vérifié le test d'homogénéité des moyennes des recouvrements, il est possible de calculer la valeur du recouvrement moyen y_{moy} et son intervalle de confiance (IR_{moy}) d'après les formules suivantes :

$$IR_{moy} = y_{moy} \pm \frac{t(\alpha, N-1)}{\sqrt{N}} ST$$

Avec :

$y_{moy} = R\%$

N : nombre totale des mesures

ST : l'écart type

3- Fidélité :

a- Test d'homogénéité des variances des recouvrements :

Le test de Cochran permet de vérifier l'homogénéité des variances des recouvrements.



b- Recherche d'une moyenne des recouvrements suspecte ou aberrante (Test de Grubbs simple) :

Ce test permet d'identifier une ou des séries suspectes ou aberrantes dont la moyenne est exceptionnellement faible ou forte vis à vis des moyennes des autres séries.

$$\frac{|\bar{y}_i - \bar{y}|}{s_{\bar{y}_i}} < G(\alpha, p)$$

Avec :

\bar{y}_i : Moyenne de la série suspecte (moyenne min et/ ou max)

\bar{y} : Moyenne calculée totale des N valeurs (moyenne des moyennes)

$s_{\bar{y}_i}$: L'écart-type déterminé sur les p moyennes y_i

La valeur G ainsi calculée est comparée à la valeur lue dans une table de Grubbs pour la probabilité considérée.

Si le test n'est pas significatif, alors la moyenne testée est considérée comme correcte au seuil de probabilité considérée.

Sinon, la moyenne est dite suspecte ou aberrante selon le seuil considéré et les valeurs de la série incriminée doivent être testées.

c- Estimation de l'écart type de répétabilité et de la reproductibilité:

L'écart type de répétabilité est calculé par la formule suivante :

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (n_i - 1) * s_i^2}{N - p}}$$

Si : $s_i^2 > 0$ alors : l'écart type de la reproductibilité est calculé par la formule suivante :

$$S_R = \sqrt{s_r^2 + s_l^2}$$

Avec :

$$s_l^2 = \frac{s_d^2 - s_r^2}{n_i} \quad \text{et} \quad s_d^2 = \left(\frac{1}{p-1}\right) * \left[\left(\sum_{i=1}^p n_i (\bar{y}_i - \bar{y})\right)^2\right]$$

Si : $s_l^2 < 0$ alors : $S_R^2 = S_r^2$



d- Estimation de la répétabilité et de la reproductibilité:

La répétabilité ou seuil de répétabilité qui est l'écart maximum entre deux résultats obtenus dans des conditions de répétabilité est calculé par la formule suivante :

$$r = t(95, N-p) * \sqrt{2} * S_r$$

La reproductibilité est calculée par la formule suivante :

$$R = t(95, N-1) * \sqrt{2} * S_R$$

On exprime les erreurs de répétabilité et de la reproductibilité sous forme de coefficient de variation :

$$\text{Répétabilité : } CV_r = 100 * \frac{S_r}{m}$$

$$\text{Reproductibilité : } CV_R = 100 * \frac{S_R}{m}$$

4- Robustesse :

D'après l'approche de la reproductibilité, la méthode est déclarée robuste lorsque les écarts types de reproductibilité et de répétabilité sont considérés comme statistiquement égaux, cette dernière condition est réalisée si et seulement si $\ll 1 \gg$ appartient à l'intervalle suivant :

$$F(\alpha/2, \vartheta_r, \vartheta_R) * \frac{s_r^2}{s_R^2} \leq \frac{\sigma_r^2}{\sigma_R^2} \leq F(1 - \alpha/2, \vartheta_r, \vartheta_R) * \frac{s_r^2}{s_R^2}$$

5-limite de détection :

La limite de détection peut être déterminée en utilisant la gamme de l'étalonnage d'après la formule suivante :

$$x_{LD} = \frac{3S_{a0}}{a1}$$



DEUXIEME PARTIE : ETUDE PRATIQUE



I- Mise au point de la méthode de détermination de l'histamine par chromatographie sur couche mince :

1- Référence de la technique d'analyse :

Plusieurs techniques de chromatographie sur couche mince ont été rapportées pour l'analyse de l'histamine, celle développée et validée dans cette étude est publiée en 1988 par Rosier et Petegham dans un article intitulée : << Rosier, J., & Petegham, C. V. (1988). A screening method for the simultaneous determination of putrescine, cadaverine, histamine, spermidine and spermine in fish by means of high pressure liquid chromatography of their 5-dimethyl amino naphthalene 1-sulphonyl derivatives. Zeit. Lebens. Unters., Forsch., 186, 25–28. >>

2- Principe :

En milieu tamponné à pH basique, l'histamine se dérive par le chlorure de dansyle en donnant un composé jaune orange caractéristique 'dansylhistamine' qui est révélé sur la plaque chromatographique par l'UV à la longueur d'onde de 365 nm et quantifié à l'aide d'un densimètre optique, selon la réaction suivante :

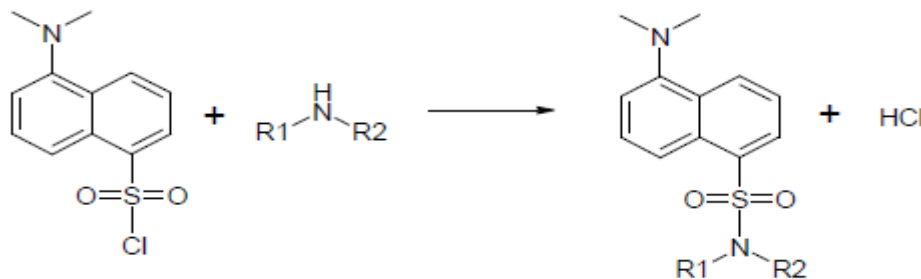


Figure 6 : Réaction du chlorure de dansyle avec les amines biogènes

3- Réactifs :

Solution tampon phosphate (pH=8) : mélanger 11 ml de la solution di-hydrogenophosphate de potassium à M/15(soit 9,08g de KH₂PO₄ par litre) et 189 ml de la solution de di-sodium hydrogénophosphate (soit 9,47 g de Na₂HPO₄ par litre).

Solution tampon borate double concentré (pH=9,2) : mélanger 50 ml de la solution d'acide borique et de chlorure de potassium 0,2M (soit 12,41g de H₃BO₃ et 14,91g de KCl par litre) et 26,7ml de la soude 0,2M (8g de soude par litre) et compléter à 100 ml.

Solution tampon borate (pH=9,2) : mélanger 25 ml de la solution d'acide borique et de chlorure de potassium 0,2M (soit 12,41g de H₃BO₃ et 14,91g de KCl par litre) et 13,35ml de la soude 0,2M (8g de soude par litre) et compléter à 100 ml.

Chlorure de dansyle 2,5%: dissoudre 0,125g de chlorure de dansyle dans 50 ml de l'acétone et couvrir la fiole par l'aluminium.

Chlorure de dansyle 5%: dissoudre 0,25g de chlorure de dansyle dans 50 ml de l'acétone et couvrir la fiole par l'aluminium.

Chlorure de dansyle 10%: dissoudre 0,5g de chlorure de dansyle dans 50 ml de l'acétone et couvrir la fiole par l'aluminium.



Solution d'hydroxyde de sodium 4N: dissoudre 16 g NaOH dans 50 ml d'eau distillée et compléter à 100ml.

Solution de l'acide chlorhydrique 0,2N : introduire lentement 1,650 ml de HCl 37% dans 100 ml d'eau distillée, la solution ainsi préparée est de 0,2N.

Solution d'acide trichloracétique 5% : dissoudre 50g de trichloracétique dans 500ml d'eau distillée et compléter à 1000 ml, cet acide est utilisé pour la précipitation des protéines.

Solution mère étalon d'histamine 1000ppm : sécher dans un dessiccateur l'histamine pendant 24h. Peser exactement 0,1656g d'histamine dihydrochloride, le dissoudre dans 50 ml de l'acide trichloracétique 5% et compléter à 100ml.

Solution mère de cadaverine 1000ppm : peser 0,0858g de cadaverine dihydrochloride, le dissoudre dans presque 25 ml de l'acide trichloracétique 5% et compléter à 50ml.

Solution mère de spermidine 1000ppm : peser 0,0878g de spermidine trihydrochloride, le dissoudre dans presque 25 ml de l'acide trichloracétique 5% et compléter à 50ml.

Solution mère de tyramine 1000ppm : peser 0,0633g de tyramine hydrochloride, le dissoudre dans presque 25 ml de l'acide trichloracétique 5% et compléter à 50ml.

Solutions de développement :

Chloroforme : diethyl ether : triethylamine (60 :40 :10)

Chloroforme : triethylamine (50 :75)

Chloroforme : triethylamine (75 :50)

Chloroforme : triethylamine (100 :25)

4- Appareillages et matériels :

- Matériels courant de laboratoire.
- Densimètre optique fonctionnant sous le mode UV 365 nm et lampe UV 365nm.
- Cuves et couvercles.
- Balance analytique, vortex, agitateur et ultra-turrax.
- Plaque de CCM recouverte par un gel de Silice.
- Capillaire ou micropipette.
- Matériels biologiques : la matrice retenue pour notre étude est l'anchois séchée salé, notre choix a été basé sur le fait que ce poisson est le plus répandu au laboratoire car il est parmi les poissons causant des intoxications histaminiques, de plus, c'est une matrice complexe et pleine de protéines et des sels pouvant interférer avec l'histamine.

5- Mode opératoire :

a- Préparation de la matrice :

Un mélange de la matrice a été préparé à partir de plusieurs échantillons reçus au laboratoire dans le cadre du contrôle officiel. Ces échantillons sont homogénéisés puis repartis dans des sachets hermétiquement fermés et rapidement stockés dans un congélateur réglé à -20°C pour éviter toute augmentation du taux d'histamine. Rappelant que ce mélange a été testé préalablement par Lerck et Bell pour s'assurer qu'il ne contient pas des concentrations significatives d'histamine.



b- Extraction de la matrice :

10g d'échantillon préalablement préparé est homogénéisé avec 20 ml de l'acide trichloracétique (5%) par l'ultra-turrax, ensuite le volume est porté à 40 ml par l'acide trichloracétique (5%) enfin les extraits de filtration sont récupérés et réfrigérés jusqu'au moment de l'analyse.

c- Préparation des solutions étalons :

+ Gamme d'étalonnage d'histamine :

Les niveaux des concentrations d'histamine retenues sont choisis en prenant en considération les quantités pouvant engendrer des intoxications histaminiques.

Une gamme des solutions étalons d'histamine est préparée à partir de la solution mère d'histamine (1000 ppm), ces solutions se préparent le jour même de l'analyse comme indiquée dans le tableau suivant :

Concentration de la solution étalon d'histamine	6,25ppm	12,5ppm	25ppm	50ppm	100ppm	200ppm
Volume ajouté de Solution mère d'histamine 1000ppm	62,5µl	125µl	250µl	500µl	1ml	2ml
Acide trichloracétique (5%)	9,940ml	9,875ml	9,750ml	9,5ml	9ml	8ml

Tableau 1 : Préparation des solutions étalons d'histamine

+ Solutions étalons des amines biogènes :

Le niveau de concentration retenu pour les amines biogènes est 50 ppm car on vise par ces derniers étudiée juste la spécificité de la présente méthode. Ces solutions étalons des amines biogènes se préparent le jour même d'analyse comme renseigné dans le tableau suivant :

Solutions étalons	Solution étalon de cadaverine (50ppm)	Solution étalon de spermidine (50ppm)	Solution étalon de tyramine (50ppm)
Solution étalon de cadaverine (1000ppm)	500µl	-	-
Solution étalon de spermidine (1000ppm)	-	500µl	-
Solution étalon de tyramine (1000ppm)	-	-	500µl
Volume ajouté de l'acide trichloracétique (5%)	9,5ml	9,5ml	9,5ml



Tableau 2 : Préparation des solutions étalons des amines biogènes

✚ Solution étalon de mélange des amines biogènes :

La concentration de la solution étalon de mélange des amines biogènes est 50 ppm, cette solution est préparée comme suit :

	Solution étalon de mélange des amines biogènes
Solution mère d'histamine (1000ppm)	500 μ l
Solution mère de cadaverine (1000ppm)	500 μ l
Solution mère de spermidine (1000ppm)	500 μ l
Solution mère de tyramine (1000ppm)	500 μ l
Acide trichloracétique (5%)	8ml

Tableau 3 : Préparation d'une solution étalon de mélange des amines biogènes

d- Fortification des prises d'essais :

✚ Fortification des prises d'essais par l'histamine :

On fortifie la matrice par l'histamine après l'extraction car on cherche le rendement de cette méthode et non pas celui de l'extraction de plus on ne quantifie pas l'histamine liée à la chaire mais l'histamine libre, le tableau suivant représente les volumes ajoutés :

Niveau de contamination	Echantillon à 6,25ppm	Echantillon à 12,5ppm	Echantillon à 25ppm	Echantillon à 50ppm	Echantillon à 100ppm	Echantillon à 200ppm
Volume de la solution mère d'histamine ajoutée (1000ppm)	62,5 μ l	125 μ l	250 μ l	500 μ l	1ml	2ml
Volume de l'extrait de la matrice	9,940ml	9,875ml	9,750ml	9,5ml	9ml	8ml

Tableau 4 : Fortification des prises d'essais avec une solution mère d'histamine

✚ Fortification des prises d'essais par les amines biogènes :

L'extrait des prises d'essais est fortifié par les amines biogènes suivantes : cadaverine, spermidine, tyramine et l'histamine dont la concentration retenue est 50 ppm. Cette fortification est faite comme indique le tableau suivant :



	Solution de mélange des amines biogènes
Solution mère d'histamine (1000ppm)	500µl
Solution mère de cadaverine (1000ppm)	500µl
Solution mère de spermidine (1000ppm)	500µl
Solution mère de tyramine (1000ppm)	500µl
Volume de l'extrait de la matrice	8ml

Tableau 5 : Fortification des prises d'essais avec les amines biogènes

e- Dérivatisation de l'histamine par le chlorure de dansyle d'après le mode opératoire:

La dansylation de l'histamine est faite comme suit : dans un tube à essai, on introduit 1 ml de la solution standard d'histamine (ou l'échantillon), puis on ajoute 1 ml de la solution tampon phosphate (pH=9), ensuite on additionne une goutte de Na OH (4N) et on le mélange à l'aide d'un vortex. Enfin, on ajoute 2 ml de chlorure de dansyle 5%. Après bien mélanger, on couvre le tube par papier aluminium et on l'incube pendant 1h à 55°C.

f- Etape CCM :

Après avoir préparé la cuve de migration, on dépose sur la plaque chromatographique 20 à 30 µl de chaque échantillon ainsi que les solutions étalons tout en respectant les instructions évoquées précédemment dans le protocole de CCM.

Le composé dansylhistamine est révélé sous irradiation UV de chromatogramme à 365nm car ce complexe a comme caractéristique d'émettre sous forme de fluorescence l'énergie du rayonnement ultraviolet absorbé et on le détecte dans la matrice par comparaison de sa densité et son rapport frontale avec celle de témoins d'histamine ajoutés et par la suite, on les quantifie par un densimètre optique.

Mais avant de procéder aux essais pour l'évaluation des paramètres de la performance de cette méthode, une optimisation ou développement des conditions de réalisation de cette technique est nécessaire pour maîtriser les facteurs pouvant influencer la reproductibilité de cette technique. Ainsi, les paramètres étudiés sont les suivants : temps et température d'incubation, concentration de chlorure de dansyle, nature et concentration de la solution tampon, solutions de développement, types des tubes utilisés, volume de Na OH, effet de la plaque. Ces facteurs nous a permis également de juger sa robustesse.

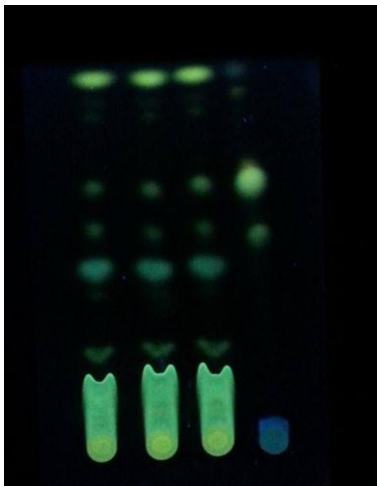
→ Solutions de développement :

Les volumes et la composition des solutions de développement influent d'une manière majeure la séparation d'histamine sur la plaque CCM ainsi quatre solutions de développement ont été testées pour évaluer leur capacité à séparer l'histamine dans les échantillons, il s'agit de : chloroforme:triéthylamine (75 :50 en volume) puis chloroforme : diéthylether : triéthylamine (60:40:10) ensuite chloroforme :triéthylamine (50 :75) puis une double migration par chloroforme :

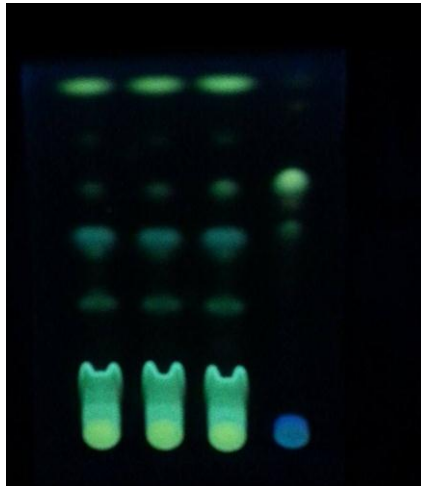


diethylether : triethylamine(60 :40 :10) suivi par chloroforme :triethylamine(100 :25) et enfin chloroforme :triethylamine(100 :25)

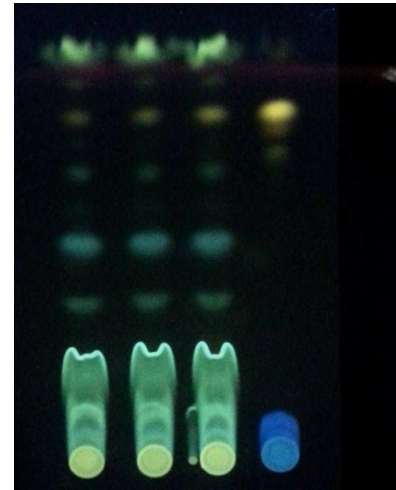
Les figures suivantes représentent les résultats obtenues en utilisant la matrice d'anchois séchés salés :



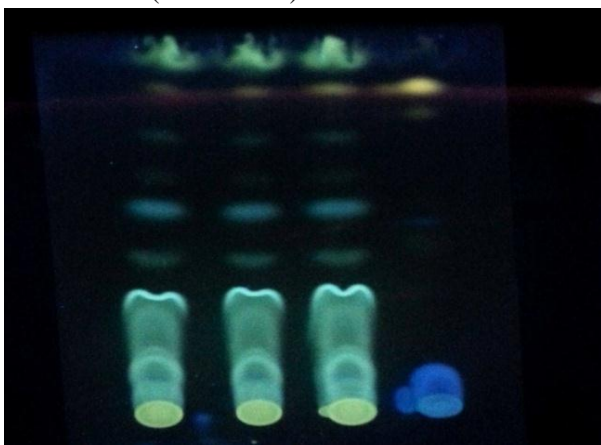
Chloroforme :diethylether :triethylamine
(60 :40 :10)



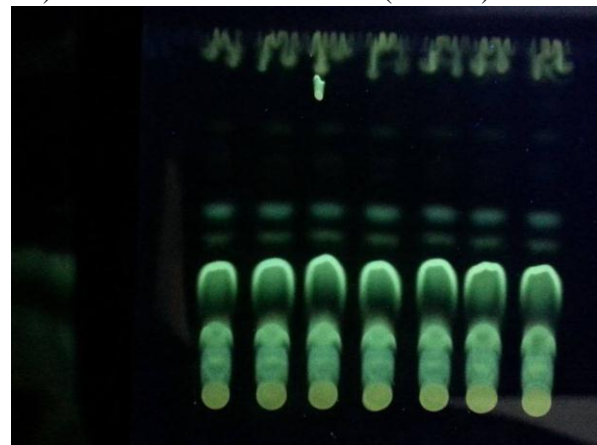
chloroforme :triethylamine
(50 :75)



chloroforme :triethylamine
(75 :50)



Chloroforme :diethylether :triethylamine
suivi par : chloroforme :triethylamine (60 :40 :10) et (100 :25)



chloroforme :triethylamine (100 :25)

Figure 7 : Plaques chromatographiques développées dans différents solution de migration

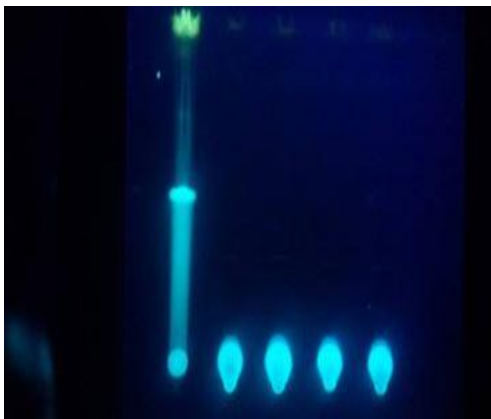
Les essais réalisés montrent que le mélange des solvants chloroforme : triethylamine (75 :50 en volume) et la double migration par chloroforme : diethylether : triethylamine (60 :40 :10) suivi par chloroforme :triethylamine (100 :25) permettent d'entraîner et de bien séparer les spots d'histamine des autres spots or l'inconvénient de ce dernier c'est qu'il demande beaucoup du temps du faite que la plaque doit être éluée avec deux phases mobiles différents de plus ce type de migration est couramment utilisé pour séparer plusieurs amines biogènes.

A propos de mélange des solvants chloroforme : diethylether : triethylamine (60:40:10) et chloroforme :triethylamine(50 :75) permettent également d'entraîner l'histamine mais avec un petit rapport frontale pour la même duré de migration.

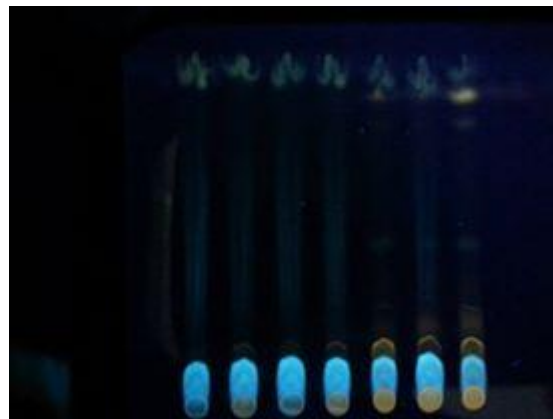
Pour la solution de développement chloroforme : triéthylamine(100 :25), on remarque que les taches d'histamines ne se séparent pas en haut de plaque des autres taches correspondant à l'excès de chlorure de dansyle non réagit, critère qui nous a amené à utiliser chloroforme : triéthylamine (75 :50) comme solution de développement dans tous nos essais.

→ **Volume de NaOH :**

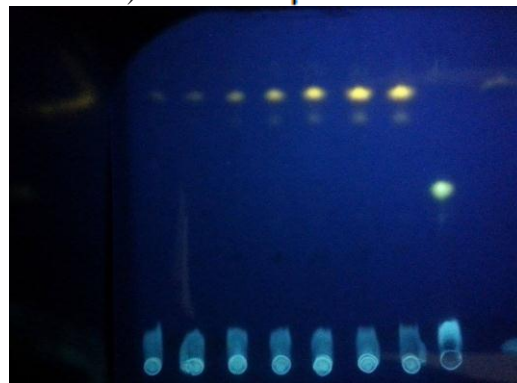
Les figures suivantes montrent les résultats obtenus avec les solutions standards en utilisant différents volumes de Na OH :



30 μ l Volume de Na OH (milieu acide)



115 μ l Volume de Na OH (milieu très basique)



Neutralisation de TCA et ajout T. borate (pH=9,24)

Figure 8 : Plaques chromatographiques de solutions standards réalisées avec différents volume de NaOH

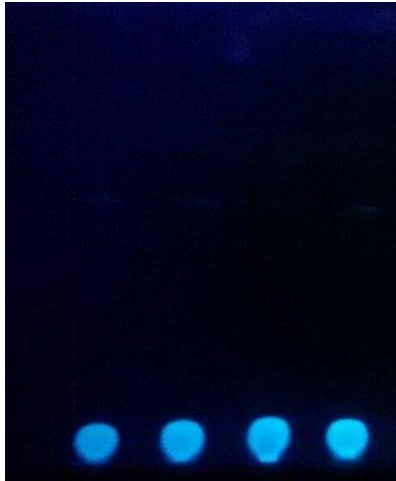
On note l'absence complète de migration des molécules d'histamine en utilisant soit une goutte de Na OH qui est équivalente à 30 μ l de NaOH soit en utilisant un grand volume (115 μ l) rendant le milieu de dansylation de l'histamine très basique (aux environ pH=13).

Ainsi le volume de Na OH doit être ajouté d'une manière à neutraliser l'acide trichloracétique où on a préparé les échantillons(ou les standards) et peut être s'étend à pH 10. Il est à noter ici, que le pH de la solution de dérivation de l'histamine par le chlorure de dansyle est un point critique qu'il faut le maîtriser.

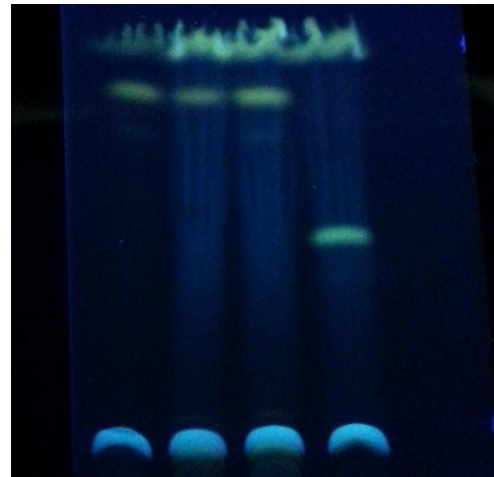
→ **Nature et concentration de la solution tampon :**

D'abord, on a utilisé le borate comme solution tampon au lieu de phosphate car ce dernier n'existe pas à pH=9.

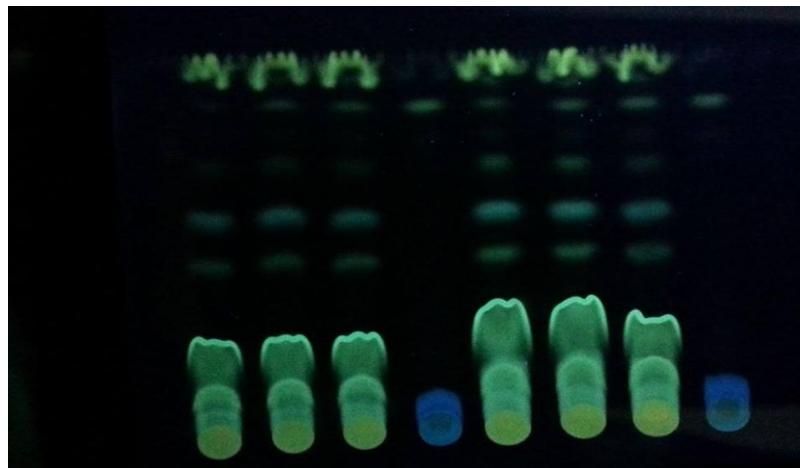
Par la suite, on a essayé de comparer les spots d'histamine obtenus en utilisant différentes concentrations de la solution tampon borate, les voici résumés ci-dessous :



Tampon phosphate (standards d'histamine)



Sans ajout de T. Borate juste neutralisation par Na OH (standard d'histamine)



De gauche à droite : tampon borate une fois concentré puis T. borate deux fois concentré (matrice d'anchois séchés salés fortifiés par l'histamine)

Figure 9 : Plaques chromatographique réalisés avec différentes concentrations de la solution tampon borate

On constate qu'en absence de la solution tampon borate, les spots d'histamine laissent des traînées de couleur bleu foncé ce qui peut gêner la lecture des résultats surtout au niveau de faible concentration.

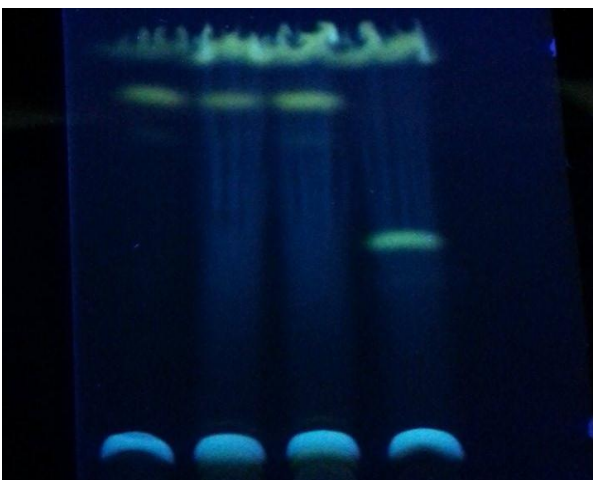


En revanche, on note que les taches d'histamine sont plus concentrées et plus précises en utilisant la solution tampon borate deux fois plus concentré ceci est due à l'augmentation de la force ionique de la solution tampon.

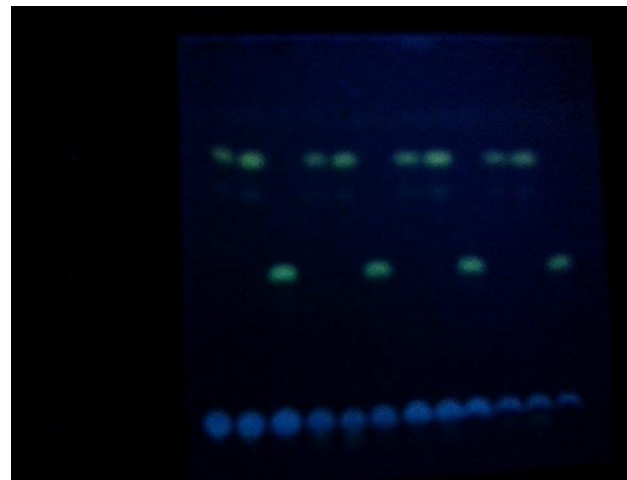
Ainsi, l'ajout de la solution tampon borate deux fois plus concentré à pH=9 a pour objectif de favoriser la réaction de dansylation de l'histamine en absorbant le chlorure d'hydrogène délibéré.

→ Temps et température d'incubation :

Plusieurs températures et temps d'incubation ont été évalués pour favoriser le rapport rapidité & performance de cette technique du faite des contraintes des délais de réponses imposés par les clients et de leurs confiances aux résultats présentés par le laboratoire, on résume dans les figures suivantes les résultats trouvées :



Sans incubation (standards d'histamine)



De gauche à droite : incubation 1h à 55 °C puis 10min à 70 °C (standards d'histamine)

Figure 10 : Plaques chromatographiques faites avec des solutions standards d'histamine préparée dans différents temps et température d'incubation

On remarque qu'en absence de l'incubation, la migration des spots d'histamine laissent un traîné de couleur bleu foncé du faite que le chlorure de dansyle n'a pas eu le temps pour bien réagir avec les autres réactifs autre que l'histamine, ce qui peut gêner la lecture des résultats.

D'autre part, on note que l'incubation 10 min à 70° C permet d'avoir des spots d'histamine de même intensité que l'incubation 1h à 55 °C et on constate que les spots trouvées sur la ligne de départ ont des volumes différent donc le prolongement de la durée d'incubation a un effet juste sur la réaction secondaire de chlorure de dansyle.



→ **Concentration de chlorure de dansyle :**

Lors de cette étude, on a évalué l'effet de trois concentrations de chlorure de dansyle sur l'intensité des taches de dansylhistamine formées :

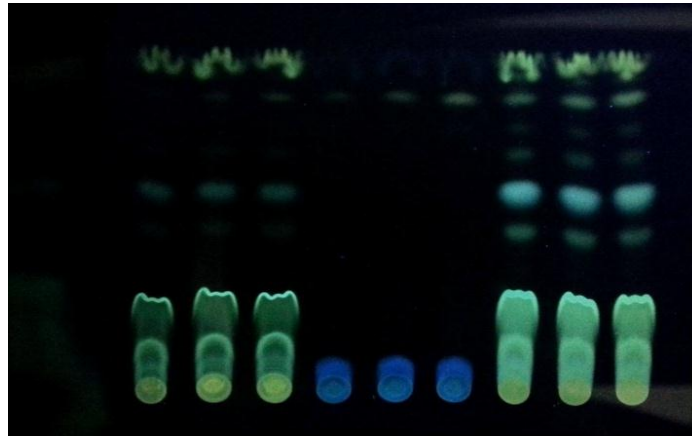


Figure 11 : Plaque chromatographique de la matrice préparé dans différents concentration de chlorure de dansyle (de gauche à droite : chlorure de dansyle 2,5% puis 10%)

On constate que les taches formées sont plus intenses et brillantes en utilisant le chlorure de dansyle 10% qu'avec le chlorure de dansyle 5% et 2,5%

→ **Stabilité du complexe dansylhistamine :**

En raison du contraintes du temps, l'analyste est parfois obligé de reporter l'analyse à la journée qui suit, de ce fait une étude de la stabilité du complexe dansylhistamine est nécessaire, ainsi la solution du formation du complexe dansylhistamine est analysé après deux journées de sa préparation.



Figure 12 : Plaque réalisé le jour même de préparation

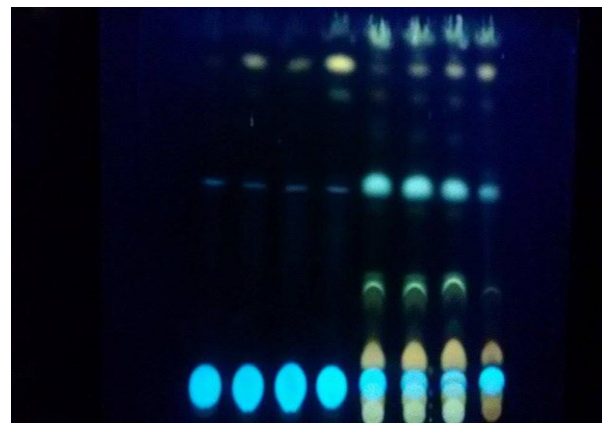


Figure 13 : Plaque réalisé après 2 jours de préparation



On constate qu'il n'y a pas une différence significative que ce soit sur Rf ou l'intensité des taches des standards d'histamine (à gauche de la plaque), ce qui implique que l'étape CCM peut être retardée deux journées donc le complexe dansylhistamine est très stable.

→ **Stabilité de l'histamine dans l'acide trichloracétique :**

L'analyse de la même solution tampon est réalisée après 4 jours de son préparation, les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante :

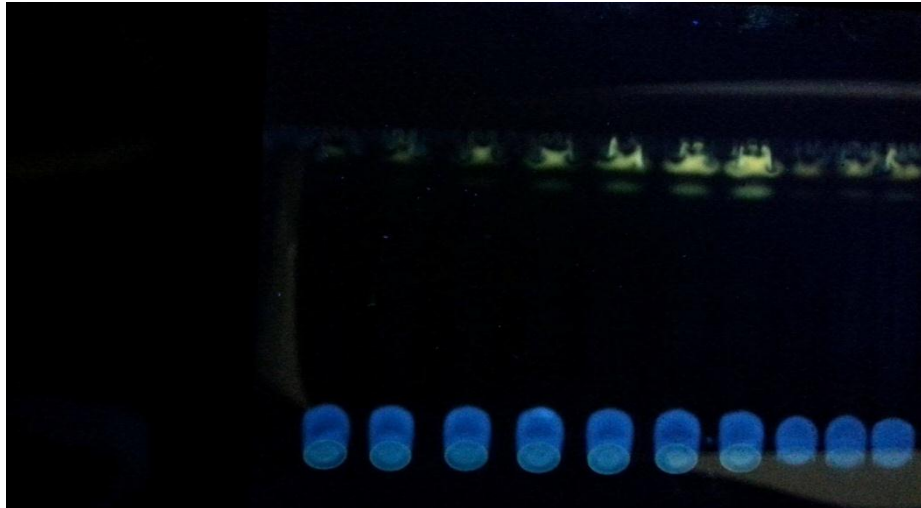


Figure 14 : Plaque des solutions de standard dont les anciens préparés se trouvent à droite

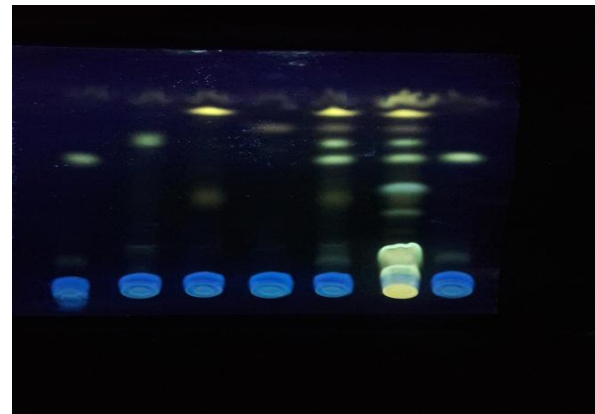
On remarque que l'intensité des taches d'histamine s'est considérablement diminuée donc il y a une réduction du taux de rendement d'histamine à partir du quatrième jour, il en résulte que la stabilité de l'histamine dans l'acide trichloracétique serait affectée au bout de quatrième jour.

→ **Type des plaques CCM :**

Les plaques HPTLC sont des plaques CCM composées de gel de silice avec une zone de concentration pré-absorbante plus épaisse que la couche de silice, qui fonctionne comme une éponge qui pré-concentre l'échantillon avant de réagir avec le gel de silice donc elle permet d'augmenter le volume déposé sans aucun risque



Plaque HPTLC



Plaque de CCM normale

Figure 15 : Effet des différents types des plaques chromatographiques

On constate que les plaques HPTLC permettent d'obtenir des taches sous forme des bandes étroites et plus précises alors que les plaques de gel de silice donnent des taches rendent et plus larges mais malgré l'importance de ces plaques, leurs utilisations dans nos recherches était limité du fait de leur cout élevé et de leur disponibilité.

→ **Types des tubes :**

Pour vérifier la possibilité de dégradation des tubes par les réactifs donc la possibilité d'attaquer la qualité des solutions contenus dans ces tubes, un test de comparaison des tubes en plastique avec les tubes en verre contenant les mêmes concentrations d'histamine a été réalisé.

On a constaté qu'il n'y a pas de formation des taches supplémentaire autre que l'histamine et également la qualité de l'intensité des taches réalisés à partir des deux tubes est la même ce qui nous a permis d'utiliser les deux types des tubes.

✚ Ainsi, on propose le mode opératoire suivant pour la dansylation de l'histamine:

Dans un tube à essai, on introduit 1 ml de la solution standard d'histamine(ou l'échantillon), ensuite on additionne 95 μ l de NaOH (4N) puis on ajoute 1ml de la solution tampon borate (pH=9) deux fois plus concentré, et on le mélange à l'aide d'un vortex. Par la suite, on ajoute 2ml de chlorure de dansyle 10% et on couvre le tube par papier aluminium et enfin, on l'incube pendant 10 min à 70° C.

Et la séparation est réalisée sur une plaque recouverte de silice par le mélange du solvant chloroforme : triéthylamine (75 :50 ml).



II- Validation de la méthode de détermination de l'histamine par chromatographie sur couche mince par l'approche classique :

Le densimètre optique utilisé dans cette étude nous donne 3 réponses à savoir : le volume, la hauteur et la surface mais celle la plus performante est la hauteur car le volume et la surface traduit simplement la taille de la tache tandis que la hauteur corresponde aux fluorescences des taches donc aux quantités d'histamines présentes dans les différents échantillons.

La courbe d'étalonnage obtenu avec les standards d'histamine illustrant la variation de la fluorescence en fonction de la concentration introduite est la suivante :

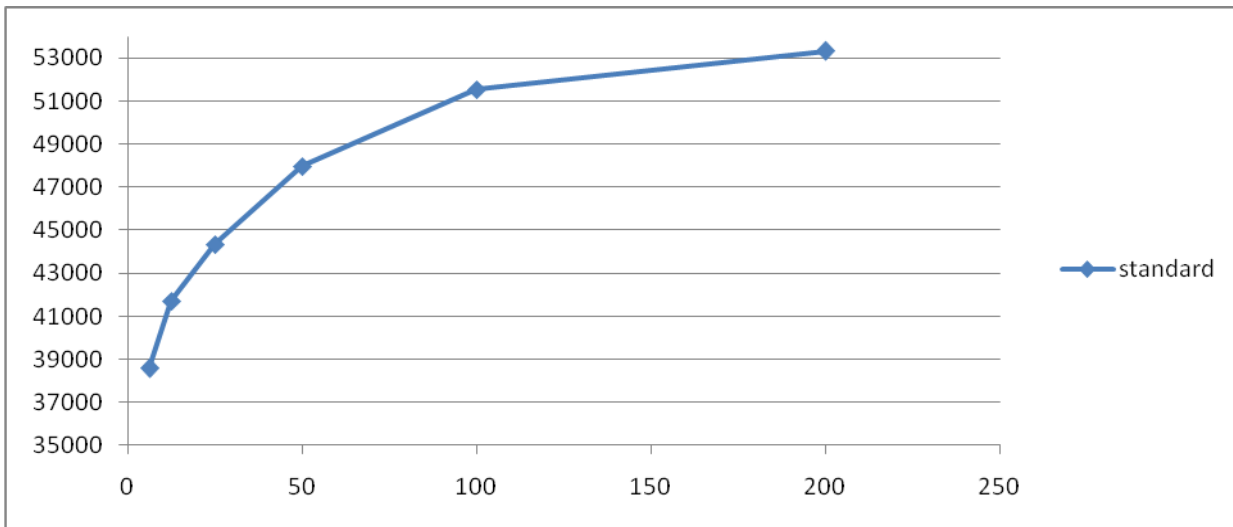


Figure 16 : la courbe de la régression sans matrice

Celui de la gamme des ajouts dosés (avec matrice) est le suivant :

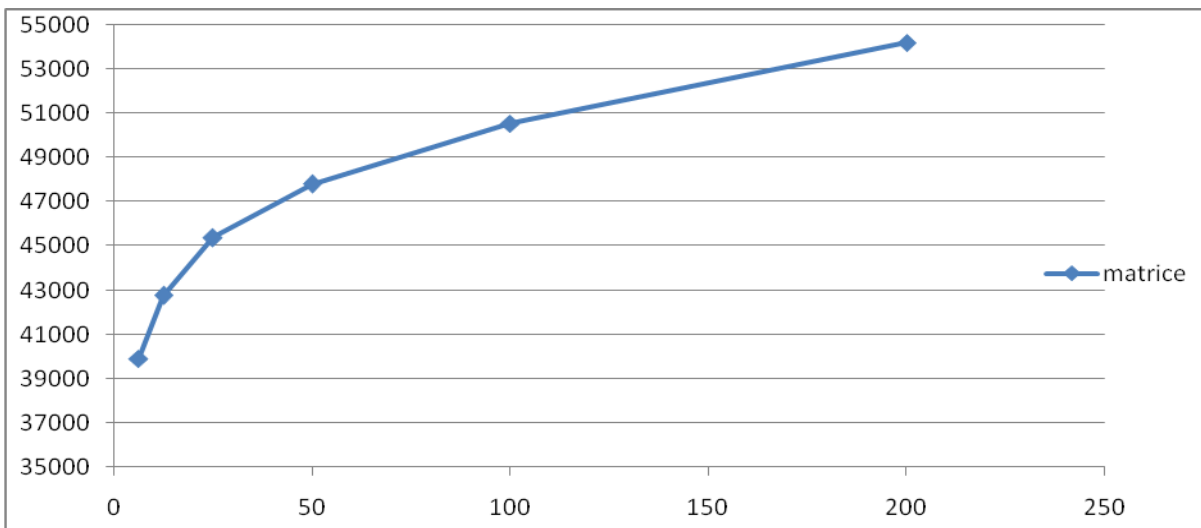


Figure 17 : la courbe de la régression avec matrice



Donc à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la fluorescence et la concentration de l'histamine n'est pas une fonction linéaire d'où l'utilité d'étudier la linéarité de cette méthode d'analyse.

1- Etude de la linéarité :

La régression linéaire, basée sur la méthode des moindres carrés, permet de montrer l'existence d'une relation linéaire entre les x_{ij} et y_{ij} .

a- Vérification de l'homogénéité des variances :

Les hypothèses H_0 et H_1 à tester sont les suivantes :

H_0 : les variances des différents niveaux sont homogènes pour un risque de 5%

H_1 : les variances des différents niveaux ne sont pas homogènes pour un risque de 5%

❖ Sans matrice :

Dans le tableau ci-dessous, on calcule l'écart type pour chaque niveau de concentration (sans matrice) :

niveau	x_{ij}	y_{ij}	S_i^2
1	6,25	38845	3473827,8
	6,25	40373	
	6,25	37609	
	6,25	41978	
	6,25	37717	
2	12,5	42139	4257612,7
	12,5	42433	
	12,5	38916	
	12,5	44492	
	12,5	40821	
3	25	42928	2852889,5
	25	43673	
	25	41575	
	25	46216	
	25	43713	
4	50	44219	2587491,5
	50	47882	
	50	46921	
	50	48381	
	50	46982	
5	100	51113	2663461,7
	100	51705	
	100	49046	
	100	52768	



	100	49127	
6	200	53625	1874866,3
	200	55394	
	200	53313	
	200	55462	
	200	52324	

Tableau 6 : Données brute (sans matrice)

On regroupe dans le tableau suivant les résultats du test de Cochran :

S^2_{max}	Somme (Si^2)	Ccal	C(5%, n, p)
4257612,7	17710149,5	0,240	0,48

Tableau 7 : Tableau du test de Cochran

On conclut que : $C_{cal} < C(5\%, n, p)$ donc l'ensemble des variances pour l'ensemble des points de gamme de l'intervalle étudié sont homogènes au seuil de 5%.

❖ **Avec matrice :**

Dans le tableau ci-dessous, on calcule l'écart type pour chaque niveau de concentration (avec matrice) :

niveau	x_{ij}	y_{ij}	Si^2
1	6,25	41950	1343291,8
	6,25	40086	
	6,25	39524	
	6,25	40685	
	6,25	42192	
2	12,5	45008	1283904,3
	12,5	42512	
	12,5	42031	
	12,5	42995	
	12,5	43171	
3	25	44569	1845240,3
	25	42592	
	25	44368	
	25	45721	
	25	46033	
4	50	44284	3396415,5
	50	44075	
	50	45928	
	50	48539	
	50	46724	
5	100	49142	4019593,3
	100	50189	



	100	49810	
	100	53614	
	100	48423	
6	200	53079	2219076,2
	200	54410	
	200	54217	
	200	57065	
	200	55343	

Tableau 8 : Données brute (avec matrice)

Le tableau suivant illustre les résultats du test de Cochran :

S²max	Somme (S²i)	Ccal	C(5%,n,p)
4019593,3	14107521,4	0,285	0,48

Tableau 9 : Tableau du test de Cochran

On conclut que $C_{cal} < C(5\%, n, p)$ donc l'ensemble des variances pour l'ensemble des points de gamme de l'intervalle étudié sont homogènes au seuil de 5%.

b- Test d'adéquation du modèle linéaire par l'analyse de la variance :

Vérification du modèle mathématique linéaire simple: $y = a_0 + a_1x$:

Calcul des paramètres :

On récapitule dans le tableau suivant les paramètres des deux droites D1 (sans matrice) et D2 (avec matrice) :

	sans matrice	avec matrice
pente des droites (a1 et a2)	70,859	67,046
variance de la pente des droites Sa	42,058	22,642
ordonnées à l'origine des droites (b1 et b2)	41406,187	42209,391
variance des ordonnées à l'origine Sb	373758,657	201215,717
coefficient de corrélation r ²	0,900	0,936
coefficient de détermination R ²	0,810	0,876
variance résiduelle	5778883,846	3111104,552
limite de détection	25,88	

Tableau 10 : Paramètres des deux droites (D1 et D2)

Test de vérification de l'existence d'une pente significative :

Les hypothèses H0 et H1 à tester sont les suivants :

H0 : la pente n'est pas significativement différente de zéro à un risque de 5%, donc on ne peut pas valider le modèle linéaire. Dans ce cas, il faut chercher un autre modèle.



H1 : la pente est significativement différente de 0, donc il y a une dépendance linéaire au seuil de probabilité considérée (5%).

Le résultat de ce test est résumé dans le tableau suivant :

	Source de variation	SCE	ddl	variance	F _l calculé	F(5%,1,N-2)
Avec matrice	résiduelle	87110927	28	3111105	198,53	4,196
	Régression (modèle)	617650629	1	617650629		
	totale	704761556	29			
Sans matrice	résiduelle	161808748	28	5778884	119,38	4,196
	Régression (modèle)	689904115	1	689904115		
	totale	851712863	29			

Tableau 11 : Vérification de l'existence d'une pente significative

F_l calculée > F (5%, 1, N-2) donc le test est significative ainsi la pente est significativement différente de zéro pour la droite D2 et D1, c'est à dire que la pente provient bien de la régression et non des erreurs résiduelles ainsi il y a une dépendance linéaire au seuil de probabilité 5%.

Test de la validité de la droite de régression :

Les hypothèses H0' et H1' à tester sont les suivants :

H0' : l'erreur du modèle est négligeable ($y_i = \hat{y}_i$) donc le domaine de linéarité est considéré comme

valide à un risque de 5%.

H1' : l'erreur du modèle n'est pas négligeable ($y_i \neq \hat{y}_i$) donc le domaine choisi n'est pas linéaire

et il faut le réduire en décalant la dernière solution.

Les résultats trouvés sont les suivantes :

	Source de variation	SCE	ddl	variance	F _{nl} calculé	F (5%, p-2, N-p)
Avec matrice	résiduelle	87110927	28	3111105	3,26	2,776
	expérimentale	56430086	24	2351254		
	erreur modèle (non linéaire)	30680842	4	7670211		
Sans matrice	résiduelle	161808748	28	5778884	7,70	2,776
	expérimentale	70840598	24	2951692		
	erreur modèle (non linéaire)	90968150	4	22742038		

Tableau 12 : Vérification de la validité de la droite de régression



D'après les résultats illustrés dans ce tableau, $F_{nl} > F(5\%, p-2, N-p)$ donc le domaine choisi n'est pas linéaire et il faut le réduire en décalant la dernière solution pour la matrice fortifié ainsi que la gamme des standards.

Après l'élimination de la dernière solution 200 ppm, on a refait ce test dont les résultats sont les suivants :

	Source de variation	SCE	ddl	variance	F_{nl} calculé	$F(5\%, p-2, N-p)$
Avec matrice	résiduelle	60268221	23	2620357	1,78	3,098
	expérimentale	47553781	20	2377689		
	erreur modèle (non linéaire)	12714441	3	4238147		
Sans matrice	résiduelle	85764830	23	3728906	2,36	3,098
	expérimentale	63341133	20	3167057		
	erreur modèle (non linéaire)	22423698	3	7474566		

Tableau 13 : Vérification de la validité de la droite de régression après élimination de la solution 200 ppm

On a obtenu $F_{nl} < F(5\%, p-2, N-p)$ pour la matrice fortifié ainsi que la gamme des standards donc on peut conclure que le test n'est pas significatif ainsi l'erreur du modèle est négligeable et le domaine choisi est linéaire.

➤ **Génération d'autres modèles :**

D'après la réglementation évoquée précédemment, dans neuf échantillons de même lot, aucun résultat ne doit pas dépasser 200 mg/kg, donc on est intéressé à garder la solution de concentration 200 ppm, ainsi on doit générer d'autre modèles linéaires pour choisir celui le plus adéquat expliquant les valeurs de la réponse.



On résume dans le tableau suivant les résultats obtenus en générant trois autres modèles :

	Modèles	R ² (%)	R ² ajusté (%)	FL calculée	Fnl calculée	Sr	a	Sa	b	Sb
avec matrice	1	90,9	90,6	280,59	0,77	3,456	2,639	0,158	197,024	1,276
	2	87,6	87,1	197,52	3,2	0,037	0,080	0,006	10,458	0,0215
	3	90,5	89,8	128,96	1,47	1572,75	115,25 -0,235	17,34 0,082	41131,8	548,9
sans matrice	1	88,7	88,3	218,83	1,88	4,320	2,913	0,197	193,736	1,595
	2	90,4	90	263,07	0,4	0,037	0,093	0,006	10,400	0,022
	3	90,6	89,9	129,58	1,08	1725,5	167,36 -0,470	19,03 0,090	39249,1	602,1

Tableau 14 : Résultats des différents modèles générés

Les modèles 1, 2 et 3 correspondent respectivement à : $\sqrt{y}=b+a\sqrt{x}$ puis $\ln(y)=b+a \ln(x)$ et $y=b+ax+a_1x^2$

Avec : $F(5\%, 1, N-2) = 4,196$ et $Fnl(5\%, p-2, N-p) = 2,776$

✚ Test de vérification de l'existence d'une pente significative :

Pour la gamme d'étalonnage (sans matrice), on remarque que dans les 3 modèles :

Fl calculée $> F(5\%, 1, N-2)$ donc le test est significative ainsi la pente est significativement différente de zéro, c'est à dire que la pente provient bien de la régression et non des erreurs résiduelles ainsi il y a une dépendance linéaire au seuil de probabilité 5%.

Pour la gamme des ajouts dosés (avec matrice), on remarque également que dans les 3 modèles :

Fl calculée $> F(5\%, 1, N-2)$ donc le test est significative ainsi la pente est significativement différente de zéro, c'est à dire que la pente provient bien de la régression et non des erreurs résiduelles ainsi il y a une dépendance linéaire au seuil de probabilité 5%.

✚ Test de la validité de la droite de régression :

Pour la gamme d'étalonnage (sans matrice), on remarque que dans les 3 modèles:

$Fnl < F(5\%, p-2, N-p)$ donc le test n'est pas significative ainsi l'erreur du modèle est négligeable ce qui implique que le domaine choisi est linéaire au seuil de probabilité considérée (5%).

Pour la gamme des ajouts dosées (avec matrice), on remarque que seulement les 2 modèles $\sqrt{y}=b+a\sqrt{x}$ et $y=b+ax+a_1x^2$ ont : $Fnl < F(5\%, p-2, N-p)$



D'autre part, R^2 du modèle linéaire $\sqrt{y}=b+a\sqrt{x}$ de la gamme des ajouts dosées est le plus grand donc ce modèle a le plus forte pouvoir explicatif des résultats, même pour R^2 ajusté.
Et l'écart type résiduel de modèle $\sqrt{y}=b+a\sqrt{x}$ est le plus petit que ce soit pour la gamme d'étalonnage ou la gamme des ajouts dosées.
Ainsi, on conclut que le modèle le plus adéquat est: $\sqrt{y}=b+a\sqrt{x}$

c- Test de comparaison des deux droites :

→ Comparaison des pentes a1 et a2 :

Les hypothèses H0 et H1 à tester sont les suivants :

H0 : les pentes a0 et a1 ne sont pas significativement différentes à un risque de 5%

H1 : les pentes a0 et a1 sont significativement différentes à un risque de 5% donc il y a un effet de matrice et il faut revoir la procédure

test de Student	t cal	t(95%,N-4)
	1,085	2,003

Tableau 15 : Comparaison des pentes par test de Student

On a $t \text{ calculé} < t(95\%, 56)$ donc les pentes a1 et a2 ne sont pas significativement différentes au risque de 5% ainsi il n'existe pas un effet de matrice.

→ Comparaison des ordonnées à l'origine :

Les hypothèses H0 et H1 à tester sont les suivants :

H0 : les ordonnées à l' origine b0 et b1 ne sont pas significativement différentes.

H1: les ordonnées à l' origine b0 et b1 sont significativement différentes donc il y a un effet systématique et il faudra effectuer une correction.

test de Student	t cal	t(95%,N-4)
	1,610	2,003

Tableau 16 : Comparaison des ordonnées à l'origine

On a $t \text{ calculé} < t(95\%, 56)$ donc les ordonnées à l' origine b0 et b1 ne sont pas significativement différentes au risque de 5% donc il n'y a pas un effet systématique



→ **Comparaison des ordonnées à l'origine b1 et b2 avec zéro :**

Les hypothèses H0 et H1 à tester sont les suivants :

H0 : l'ordonnée à l'origine de la droite étudiée (D1 ou D2) n'est pas significativement différente de zéro au risque de 5%. Dans ce cas, on peut calibrer avec un seul point à 100%

H1 : l'ordonnée à l'origine de la droite étudiée (D1 ou D2) est significativement différente de zéro au risque de 5%. Dans ce cas, on doit calibrer avec une gamme (2 points au minimum)

Droite D1 -sans matrice		
test de Student	t cal	t(95%,N1-2)
	121,465	2,048

Tableau 17 : Comparaison des ordonnées à l'origine b1 avec zéro

Droite D2-avec matrice		
test de Student	t cal	t(95%,N2-2)
	154,408	2,048

Tableau 18: Comparaison des ordonnées à l'origine b2 avec zéro

Puisque $t_{calculée} > t(95\%, N-2)$ pour les deux gammes, alors les deux ordonnées à l'origine sont significativement différente de zéro au risque de 5%. Ainsi, la calibration doit se faire avec une gamme (2 points au minimum).

2- Justesse :

Les données brutes d'une procédure de justesse sont exprimées par les pourcentages de recouvrement entre les quantités retrouvées et celles introduites en histamine dans les échantillons.

❖ **Calcul du taux de recouvrement :**

D'après ce qui précède on a trouvée les pentes et les ordonnés à l'origine suivantes :

penne 1	penne 2	penne 3	penne 4	penne 5
2,006	2,824	2,788	3,203	2,375

ordonné à l'origine1	ordonné à l'origine 2	ordonné à l'origine 3	ordonné à l'origine 4	ordonné à l'origine 5
200,975	193,446	194,501	196,386	199,812



niveau	Q. Introduite	y_{ij}	Q. Retrouvée	Rij%
1	2,500	204,817	1,916	76,626
	2,500	200,215	2,396	95,857
	2,500	198,806	1,544	61,769
	2,500	201,705	1,661	66,432
	2,500	205,407	2,356	94,251
2	3,536	212,151	5,572	157,603
	3,536	206,184	4,510	127,561
	3,536	205,015	3,771	106,661
	3,536	207,352	3,424	96,846
	3,536	207,776	3,354	94,867
3	5,000	211,114	5,055	101,100
	5,000	206,378	4,579	91,572
	5,000	210,637	5,788	115,756
	5,000	213,825	5,445	108,898
	5,000	214,553	6,208	124,155
4	7,071	210,438	4,718	66,722
	7,071	209,940	5,840	82,587
	7,071	214,308	7,105	100,474
	7,071	220,316	7,472	105,665
	7,071	216,157	6,883	97,345
5	10,000	221,680	10,323	103,230
	10,000	224,029	10,828	108,279
	10,000	223,182	10,287	102,874
	10,000	231,547	10,978	109,784
	10,000	220,052	8,524	85,235
6	14,142	230,389	14,665	103,697
	14,142	233,260	14,096	99,674
	14,142	232,845	13,754	97,254
	14,142	238,883	13,269	93,825
	14,142	235,251	14,924	105,527

Tableau 19 : Calculs du taux de recouvrement de la justesse

a- Test de l'homogénéité des variances :

Le résultat de ce test est illustré dans le tableau suivant :

S ² max	Somme (S ² i)	Ccal	C(5%,n,p)
690,668	1464,121	0,472	0,480

Tableau 20 : Vérification de l'homogénéité des variances de recouvrement

Puisque C_0 calculé $<$ C (5%, 5,6) donc l'ensemble des variances des différents niveaux sont homogènes au risque de 5%.



b- Test de l'homogénéité des moyennes des recouvrements:

Le résultat de ce test est résumé dans le tableau suivant :

Source de variation	SCE	DDL	Variances	F_l	$F_{(5\%, 5, 24)}$
Expérimentale	5856,482	24	244,020	3,607	2,621
Factorielle	4400,350	5	880,070		
Totale	10256,832	29	353,684		

Tableau 21 : Etude de la validité des moyennes des recouvrements

$F_{calculé} > F_{(5\%, p-1, N-p)}$, donc les moyennes des différents niveaux ne sont pas homogènes au risque de 5% ainsi il existe un effet de niveau et on ne peut pas considérer une seule moyenne ou un seul taux de recouvrement pour les 6 niveaux.

c- Estimation du recouvrement moyen de chaque niveau et de son intervalle de confiance :

niveau	$R_M(\%)$	ST	$t(5\%, N-1)$	IR_M	
				min	max
1	78,987	15,630	2,045	73,150	84,823
2	116,708	26,281	2,045	106,894	126,521
3	108,296	12,639	2,045	103,577	113,016
4	90,559	15,845	2,045	84,642	96,475
5	101,881	9,789	2,045	98,225	105,536
6	99,995	4,743	2,045	98,224	101,767

Tableau 22 : Estimation du recouvrement moyen de chaque niveau et de son intervalle de confiance

Puisque le 100% est inclus dans l'intervalle de confiance des recouvrements moyen juste des niveaux 5 et 6 alors on peut considérer cette méthode est juste selon l'approche classique que dans ces niveaux.

3- Fidélité :

Huit échantillons de la matrice fortifiée par 50 ppm de l'histamine sont préparés et analysés. Cette opération est répétée deux autres fois à raison d'une fois par jour.



❖ **Détermination de pourcentage de recouvrement:**

Séries	essai	quantité introduite	y	quantité retrouvée	R%
1	1	7,071	202,129	1,793	25,357
	2	7,071	204,406	2,504	35,415
	3	7,071	210,452	4,392	62,110
	4	7,071	214,884	5,776	81,679
	5	7,071	240,196	13,679	193,448
	6	7,071	213,729	5,415	76,579
	7	7,071	209,402	4,064	57,472
	8	7,071	203,047	2,080	29,411
2	1	7,071	198,731	1,871	26,460
	2	7,071	206,332	4,562	64,521
	3	7,071	211,582	6,421	90,807
	4	7,071	217,424	8,489	120,056
	5	7,071	220,304	9,509	134,480
	6	7,071	219,543	9,240	130,667
	7	7,071	215,659	7,865	111,223
	8	7,071	208,507	5,332	75,408
3	1	7,071	201,958	2,675	37,825
	2	7,071	221,680	9,749	137,868
	3	7,071	224,029	10,591	149,784
	4	7,071	223,182	10,287	145,485
	5	7,071	231,547	13,288	187,920
	6	7,071	220,052	9,165	129,612
	7	7,071	216,386	7,850	111,015
	8	7,071	223,235	10,307	145,758

Tableau 23 : Données utilisés pour évaluer la fidélité

a- Homogénéité des variances par test de Cochran :

Le résultat de ce test est la suivante :

S ² max	Somme (S ² _i)	Ccal	C (1%,n,p)
2924,959	6195,580	0,472	0,707

Tableau 24 : Homogénéité des variances des recouvrements par test de Cochran

C₀ calculé < C (5%, 8,3) donc l'ensemble des variances des différents séries sont considérées comme homogènes au risque de 5%.



b- Vérification de l'homogénéité des moyennes :

Les hypothèses H0 et H1 à tester pour vérifier l'homogénéité des moyennes sont les suivantes :

H0 : les moyennes des différentes séries sont homogènes au risque de 5%

H1: les moyennes des différentes séries ne sont pas homogènes au risque de 5%

Les hypothèses H0' et H1' à tester pour vérifier l'existence des valeurs suspectes ou aberrantes sont les suivantes :

H0' : la valeur maximum et/ou minimum de la série incriminée n'est pas suspecte au risque de 5%

H1' : la valeur maximum et/ou minimum de la série incriminée est suspecte au risque de 5%

TEST DE GRUBBS	Test des moyennes		G1_{calculé}	G_{table(5%)}	
	MAX[y _{i moy}]	130,659	0,745	1,155	
	MIN[y _{i moy}]	70,184	0,521		
	Test des valeurs suspectes		G2_{calculé}	G_{table(5%)}	
	Série incriminée : 3				
	MAX[y _j]	187,920			1,781
MIN[y _j]	37,825	1,203			

Tableau 25 : Vérification de l'homogénéité des moyennes des recouvrements

D'une part, on remarque que $G1_{calculé} < G_{table(5\%, 3)}$ pour la moyenne maximum et la moyenne minimum, donc les moyennes des différentes séries sont homogènes au risque de 5%.

D'autre part, on remarque que $G2_{calculé} < G_{table(5\%, 24)}$ pour la valeur minimum et maximum de la série 3 donc les résultats de cette série sont homogènes au risque de 5%.

c- Estimation de la répétabilité et de la reproductibilité:

La fidélité de la procédure est jugée satisfaisante compte tenu des valeurs des coefficients de variation de répétabilité CV_r et celui de la reproductibilité.

Les hypothèses H0 et H1 à tester sont les suivantes :

H0 : $CV_r \leq CV_R$ donc la méthode est fidèle à un risque de 5%

H1 : $CV_r > CV_R$ donc la méthode n'est pas fidèle à un risque de 5%



➤ **Répétabilité :**

Le résultat de cette estimation est résumé dans le tableau suivant :

Répétabilité	Variance (S_r^2)	t(95%)	Seuil de répétabilité	CV _r
	2065,193	2,08	133,653	46,208

Tableau 26 : Calcul du coefficient de répétabilité

➤ **Reproductibilité :**

Le résultat de cette estimation est résumé dans le tableau suivant :

Reproductibilité	ni	S_d^2	S_L^2	S_R^2	CV _R
	8,000	7417,480	669,036	2734,229	53,168
	t(95%)		seuil de reproductibilité		
	2,074		153,361		

Tableau 27 : Calcul du coefficient de reproductibilité

On remarque que $CV_r \leq CV_R$ donc la méthode est fidèle à un risque de 5%

4- Etude de la robustesse :

La robustesse est évaluée par comparaison statistique de la variance de reproductibilité et de la répétabilité.

Les hypothèses H0 et H1 à tester sont les suivantes :

H0 : le «1» est inclus dans l'intervalle :
[F ($\alpha/2$, ddl_r, ddl_R)*(S_r^2 / S_R^2) ; F (1- $\alpha/2$, ddl_r, ddl_R)*(S_r^2 / S_R^2)] donc les 2 écarts types S_R et S_r sont considérés comme statistiquement égaux ainsi la méthode est robuste au risque de 5%

H1 : le «1» est inclus dans l'intervalle :
[F ($\alpha/2$, ddl_r, ddl_R)*(S_r^2 / S_R^2) ; F (1- $\alpha/2$, ddl_r, ddl_R)*(S_r^2 / S_R^2)] donc les 2 écarts types S_R et S_r ne sont pas considérés comme statistiquement égaux ainsi la méthode n'est pas robuste au risque de 5%

S_r^2	S_R^2	S_r^2 / S_R^2	F ($\alpha/2$, ddl _r , ddl _R)	F (1- $\alpha/2$, ddl _r , ddl _R)	(S_r^2 / S_R^2) min	(S_r^2 / S_R^2) max
2065,193	2734,229	0,755	2,340	0,420	1,767	0,317

Tableau 28 : Etude de la robustesse

Puisque le « 1 » est inclus dans l'intervalle [0,317 ; 1,767] donc les 2 écarts types S_R et S_r sont considérés comme statistiquement égaux ainsi la méthode est robuste au risque de 5% selon l'approche de la reproductibilité.

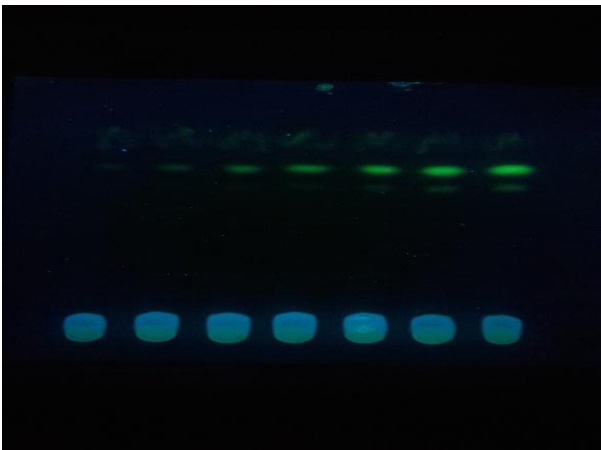


IV- Aspect qualitatif de la validation des performances de CCM :

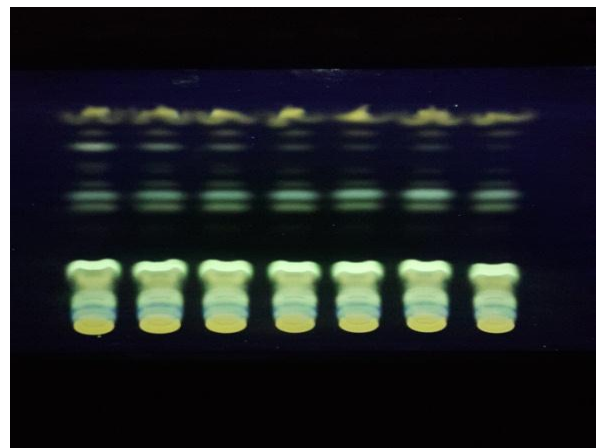
1- Limite de détection :

Le seuil de détection de la présence d'histamine par CCM en tant que méthode qualitative est évalué en se basant sur la visualisation des spots.

Pour déterminer la plus faible quantité d'histamine donnant une intensité sur la plaque, une gamme des standards d'histamine et une série des prises d'essais fortifiées par différentes concentrations d'histamine sont testées :



Plaque des standards d'histamine



Plaque de la matrice fortifiée

Figure 18 : Plaques montrant la limite de détection de cette méthode

On remarque que l'intensité des taches diffère selon la concentration de l'histamine. La tache dont la concentration en histamine est 6,25 ppm est à peine visible que ce soit dans la solution étalon ou l'extrait de matrice ainsi on peut considérer cette quantité comme limite de détection de l'histamine ce qui correspond à 12,5 µg/g d'échantillon

2- Spécificité :

Pour examiner la capacité de la présente méthode à séparer l'histamine des autres amines biogènes susceptibles de l'interférer, 3 amines biogènes sont choisies pour faire ce test à savoir : cadaverine, spermidine et tyramine

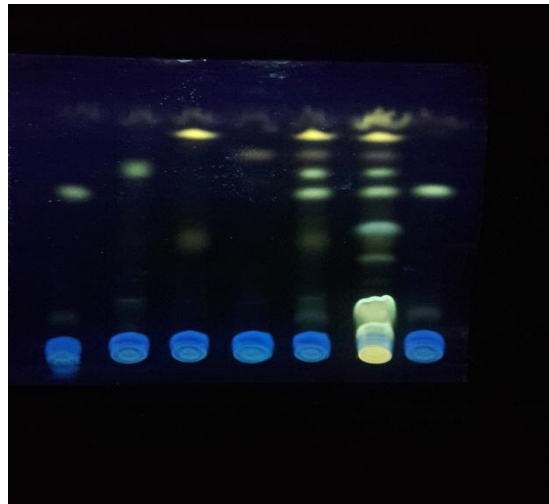


Figure 19: Plaque des amines biogènes (AB) illustrant la spécificité : de gauche à droite : cadavérine, spérmidine, tyramine, histamine, mélange des standards des AB et mélange des standards AB dans la matrice

On vérifie l'identité de ces amines biogènes dans l'extrait de la matrice, en procédant à un dépôt séparé d'une solution de chacun d'eux puis à celui de leur mélange. Ces solutions témoins permettent de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

Les spots correspondants aux ces amines biogènes sont bien visibles et séparées les uns des autres que ce soit dans l'extrait fortifiée ou dans le mélange de leurs standard ainsi l'histamine n'interfère pas avec les amines en question lors de migration. Cependant, ces résultats restent restreints du fait qu'il faut examiner d'autres amines biogènes pouvant interférer avec l'histamine.

La robustesse et la stabilité sont déjà évalués pendant la mise au point de cette méthode.



Conclusion générale

Trouver une méthode d'analyse intermédiaire de contrôle de qualité des produits de la pêche qui est simple à mettre en œuvre, rapide et permettant de diminuer le coût d'investissement présente un enjeu sanitaire et économique très important que ce soit pour les laboratoires chargés de contrôle officiel que pour les unités de traitement des produits de la pêche d'où l'intérêt de ce travail effectuée au sein de laboratoire Régionale d'Analyses et de Recherches de l'ONSSA consistant sur l'adoption de la chromatographie sur couche mince comme une technique semi quantitative de détermination et de l'identification de l'histamine dans les poissons. D'après les résultats obtenus suite à la vérification statistique des critères de validation, on peut déduire que cette méthode analytique est validée et elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue.

D'autre part, dans les cas où les quantités d'histamine présentent des teneurs alarmantes pouvant causées des intoxications intense et devant être déterminer rigoureusement, cette méthode chromatographique peut être compléter par d'autre méthodes plus sensible comme HPLC malgré que celle-ci présente d'autre contrainte à savoir la longue durée d'analyse, le coût très élevé et le risque de contamination.

Dans la continuité, ce travail mérite d'être approfondi par :

- L'étude de la spécificité en utilisant d'autres amines telles que la putrescine, spermine
- Développement de la séparation de l'histamine dans les matrices des poissons maturés
- Amélioration de la favorisation de la réaction de chlorure de dansyle avec l'histamine
- Réalisation des essais interlaboratoires pour vérifier la reproductibilité des résultats obtenus par cette méthode d'analyse



Liste des abréviations

- ONSSA: Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaire
L.R.A.R.T : Laboratoire Régionale d'Analyse et de Recherche de Tanger
FDA : Agence Américaine des Produits
ISO : Organisation Internationale de Normalisation
CEI : Commission Electronique Internationale
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
CCM : Chromatographie sur couche mince
Rf : Rapport frontale de migration
AFNOR : Association Française de Normalisation
COFRAC : Comité Française d'Accréditation
HPTLC: High Performance Thin Layer Chromatography
AB: Amine biogène
ABVT : Azote Basique Volatile Totale
UV : Ultra-violet
ppm : Partie par million
HPLC: High performance Layer Chromatography



Liste des figures

Figure1: Réaction de décarboxylation de l'histidine en histamine.....	14
Figure 2 : Migration en CCM.....	18
Figure 3 : Cuve de migration en CCM.....	18
Figure 4 : Représentation de la fidélité et de justesse.....	22
Figure 5 : Vérification de la linéarité.....	23
Figure 6 : Réaction du chlorure de dansyle avec les amines biogènes.....	31
Figure 7 : Plaques chromatographiques développées dans différents solution de migration.....	36
Figure 8 : Plaques chromatographiques de solutions standards réalisées avec différents volume de Na OH.....	37
Figure 9 : Plaques chromatographique réalisés avec différents concentration de la solution tampon borate.....	38
Figure 10 : Plaques chromatographiques faites avec des solutions standards d'histamine préparée dans différents temps et température d'incubation.....	39
Figure 11 : Plaque chromatographique de la matrice préparé dans différents concentration de chlorure de dansyle (de gauche à droite : chlorure de dansyle 2,5% puis 10%).....	40
Figure 12 : Plaque réalisé le jour même de préparation.....	40
Figure 13 : Plaque réalisé après 2 jours de préparation.....	40
Figure 14 : Plaque des solutions de standard dont les anciens préparés se trouvent à droite.....	41
Figure 15 : Effet des différents types des plaques chromatographiques.....	42
Figure 16 : la courbe de la régression sans matrice.....	43
Figure 17 : la courbe de la régression avec matrice.....	43
Figure 18 : Plaques montrant la limite de détection de cette méthode.....	57
Figure 19: Plaque des amines biogènes (AB) illustrant la spécificité : de gauche à droite : cadavérine, spermidine, tyramine, histamine, mélange des standards des AB et mélange des standards AB dans la matrice.....	58



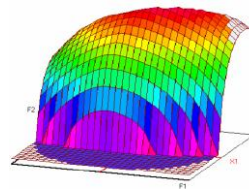
Liste des tableaux

Tableau 1 : Préparation des solutions étalons d'histamine.....	33
Tableau 2 : Préparation des solutions étalons des amines biogènes.....	33
Tableau 3 : Préparation d'une solution étalon de mélange des amines biogènes.....	34
Tableau 4 : Fortification des prises d'essais avec une solution mère d'histamine.....	34
Tableau 5 : Fortification des prises d'essais avec les amines biogènes.....	35
Tableau 6 : Données brute (sans matrice).....	45
Tableau 7 : Tableau du test de Cochran.....	45
Tableau 8 : Données brute (avec matrice).....	46
Tableau 9 : Tableau du test de Cochran.....	46
Tableau 10 : Paramètres des deux droites (D1 et D2).....	46
Tableau 11 : Vérification de l'existence d'une pente significative.....	47
Tableau 12 : Vérification de la validité de la droite de régression.....	47
Tableau 13 : Vérification de la validité de la droite de régression après élimination de la solution 200 ppm.....	48
Tableau 14 : Résultats des différents modèles générés.....	49
Tableau 15 : Comparaison des pentes par test de Student.....	50
Tableau 16 : Comparaison des ordonnées à l'origine.....	50
Tableau 17 : Comparaison des ordonnées à l'origine b_1 avec zéro.....	51
Tableau 18: Comparaison des ordonnées à l'origine b_2 avec zéro.....	51
Tableau 19 : Calculs du taux de recouvrement de la justesse.....	52
Tableau 20 : Vérification de l'homogénéité des variances de recouvrement.....	52
Tableau 21 : Etude de la validité des moyennes des recouvrements.....	53
Tableau 22 : Estimation du recouvrement moyen de chaque niveau et de son intervalle de confiance.....	53
Tableau 23 : Données utilisés pour évaluer la fidélité.....	53
Tableau 24 : Homogénéité des variances des recouvrements par test de Cochran.....	53
Tableau 25 : Vérification de l'homogénéité des moyennes des recouvrements.....	55
Tableau 26 : Calcul du coefficient de répétabilité.....	56
Tableau 27 : Calcul du coefficient de reproductibilité.....	56



Références bibliographiques

- 1- A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products
- 2- Formation of Histamine and Other Biogenic Amines During Storage of Freshwater Fish Chunks
- 3- Determination of histamine and other biogenic amines in fish by planar chromatography
- 4- Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods Separation, identification and estimation of biogenic amines in foods by thin layer chromatography
- 5- Methodology for histamine and biogenic amines analysis
- 6- New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid
- 7- Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods
- 8- Thèse : Le risque histamine dans les produits de la pêche
- 9- fiche_synthese_histamine
- 10- Histamine-intoxication-afssa
- 11- Intoxication histaminique : le scombrotisme
- 12- [Www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)
- 13- ICH. Validation of analytical procedures
- 14- Cours de validation d'une méthode d'analyse par l'approche classique



Master ST CAC Agiq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: TAZI AICHA

Année Universitaire : 2015/2016

Titre: Validation de la méthode de détermination de l'histamine dans les produits de la pêche par chromatographie sur couche mince

Résumé

La validation est l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminée. Toutes ces procédures passeront par des outils statistiques basées sur des tests d'hypothèse qui permettent de prendre des décisions à partir des résultats expérimentaux.

L'objectif de ce travail réalisé au sein de laboratoire Régionale d'Analyses et de Recherches de L'ONSSA est la validation de la méthode de détermination de l'histamine dans les produits de la pêche par chromatographie sur couche mince en utilisant l'approche classique.

En définitif, le présent stage de fin d'études revêt un caractère de complément de formation en théorie, il m'a permis d'appliquer mes connaissances théoriques, de découvrir les divers aspects d'un problème et d'envisager des solutions pratique.

Mots clés: validation- histamine- chromatographie sur couche mince- produits de la pêche- LRART(ONSSA)-pH