

Nº d'ordre : 354



THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR

Mention : SPECTROCHIMIE

par

Christian ROQUETA



ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES CAROTENOIDES DU PLASMA SANGUIN PAR SPECTROMETRIE RAMAN DE RESONANCE

Soutenue le 16 Juin 1989 devant la Commission d'Examen

BOURGEOIS WALLART MANFAIT	Rapporteur Rapporteur Examinateur
WALLART MANFAIT	Rapporteur Examinateur
MANFAIT	Examinateur
ROUSSEL	Examinateur
HECQUET	Examinateur
MERLIN	Examinateur
	ROUSSEL HECQUET MERLIN

Que toutes les personnes qui, par leurs conseils, leurs remarques et leur patience, m'ont permis d'arriver au terme de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie particulièrement les personnes qui ont accepté de faire partie du jury.

Monsieur CORSET, Directeur du L.A.S.I.R., qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Monsieur MERLIN, Maître Assistant à l'Université de Lille I, et Monsieur HECQUET, Biologiste au laboratoire pharmacodynamie clinique du Centre Oscar Lambret, qui ont assuré mon encadrement et ont toujours pris le temps de me faire profiter de leurs expériences et de leurs connaissances.

Monsieur BOURGEOIS, Chef de Laboratoire de la Société Hoffmann-La-Roche, et Monsieur WALLART, Professeur à l'Université de Lille I, qui ont bien voulu juger ce travail.

Messieurs MANFAIT, Professeur à l'Université de Reims, ROUSSEL, Ingénieur de la Société DILOR, qui ont accepté d'examiner ce travail et d'apporter à cette étude la caution de leur autorité scientifique.

La Société Hoffmann-La-Roche qui m'a procuré gracieusement les échantillons nécessaires aux études réalisées dans ce mémoire ainsi que Monsieur DEBAERT et son équipe, pour leur matériel de spectrométrie d'absorption multicanale que nous avons pu utiliser.

Ainsi que Madame MAURO qui a accepté de dactylographier cette thèse et Monsieur LABAEYE pour les dessins qu'il a effectués.

SOMMAIRE

- INTRODUCTION	10
- <u>CHAPITRE I</u> :	
Mise au point d'une séparation de caroténoïdes par la chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.)	20
I - <u>GENERALITES</u>	22
II - <u>CHOIX DE LA COLONNE</u>	23
III - <u>CHOIX DES SOLVANTS</u>	25
IV - <u>DEBITS UTILISES</u>	26
V - <u>DETECTEURS</u>	28
1 - Détecteurs UV-visible	29
2 - Détecteurs Raman de résonance	31
VI - CONCLUSION ET PERSPECTIVES	54
- <u>Chapitre II</u> :	
Caractérisation des caroténoides du plasma sanguin	60
I - PRESENTATION DES CHROMATOGRAMMES DES	
CAROTENOIDES DU PLASMA SANGUIN	62
II - <u>CARACTERISATION</u>	66
III - CONCLUSION	88

- CHAPITRE III :

Quantification des caroténoides du plasma sanguin	.92
I - <u>DOSAGE DES DIFFERENTS CAROTENOIDES APRES</u> <u>SEPARATION C.L.H.P.</u>	97
II - QUANTIFICATION DES CAROTENOIDES TOTAUX	118
III - COMPARAISON DES TECHNIQUES MISES AU POINT : ETUDE	
DE L'EVOLUTION CIRCADIENNE DES CAROTENOIDES CHEZ	
<u>L'ETRE HUMAIN</u> (étude préliminaire)	124
IV - CONCLUSION	131
- <u>CONCLUSION GENERALE</u>	134
- <u>ANNEXE</u>	140
I - LES CAROTENOIDES	142
II - <u>ACTIVITE PROVITAMINE A</u>	144
III - SPECTRES D'ABSORPTION ULTRAVIOLET ET VISIBLE DES	
CAROTENOIDES	145
IV - SPECTRES DE VIBRATION DES CAROTENOIDES	155
V - LA FLUORESCENCE DES CAROTENOIDES	163
- ANNEXE EXPERIMENTALE	172
- <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	182

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les caroténoides font partie de la famille des terpénoïdes caractérisés par leur nature polyinsaturée (figure 1). Comme l'indique la figure 1, ils sont très largement répandus dans la nature. Ils sont à l'origine des teintes brillantes jaunes, oranges et rouges de nombreux fruits comestibles (oranges, abricots...), de légumes (carottes, tomates,...), de fleurs. Mais ces couleurs ne sont pas le critère absolu de leur présence car ils peuvent être masqués par d'autres pigments, par exemple la chlorophylle dans le cas des végétaux verts.

On trouve également des caroténoïdes dans le règne animal, particulièrement dans les oeufs, les poissons, les crustacés, où ils sont responsables d'une grande variété de couleurs vives.

Certains caroténoïdes de synthèse ou extraits sont utilisés comme colorant dans les produits pharmaceutiques ainsi que dans les denrées alimentaires. Ils apparaissent dans la classification Européenne des matières colorantes et ont pour dénomination E 160 pour les carotènes et E 161 dans le cas des xanthophylles.

Les caroténoïdes sont présents dans le corps humains que par l'alimentation.

Outre leur pouvoir colorant, les caroténoïdes peuvent avoir un rôle biologique chez l'homme. Ainsi, le plus évident est une activité provitamine A. Certains d'entre eux sont transformés, au cours de leur passage au niveau de la muqueuse intestinale ou du foie par clivage oxydatif, en deux molécules de rétinal, transformés enzymatiquement par la suite en rétinol, plus souvent appelé vitamine A (cf annexe).

La vitamine A joue plusieurs rôles dans le monde animal. D'une part, elle intervient en tant que facteur de croissance indispensable mais aussi dans le processus de la vision.

De plus, récemment, plusieurs auteurs ont fait état d'effets antitumoraux de la vitamine A [1-2] sur les modèles animaux. A partir de ces résultats, des expérimentations animales ont été réalisées afin d'étudier le rôle que pourraient jouer les caroténoïdes provitamine A et non provitamine A sur certaines formes de cancers [3-4-5].



Figure 1 : Exemples de caroténoïdes rencontrés dans l'alimentation de l'homme.

-11-

Ces expériences suggèrent que les pigments caroténoïdiques, indépendamment de leur activité provitamine A, peuvent prévenir ou ralentir la croissance de certaines tumeurs (cutanées par exemple).

Il existe également plus d'une trentaine d'études épidémiologiques publiées, concernant les effets de l'alimentation et plus particulièrement de l'effet d'ingestions de caroténoides contenus dans les végétaux sur l'incidence du cancer. Presque toutes ces études ont trouvé une relation inverse entre l'ingestion des caroténoïdes de végétaux et la fréquence de certaines formes de cancers. [4-6].

Différents mécanismes explicatifs ont été proposés. On pense ainsi que les caroténoïdes pourraient prévenir les altérations del'ADN en inhibitant les espèces moléculaires excitées et plus précisément, en inhibitant la transition vers l'état singulet de l'oxygène et des radicaux libres avant qu'ils ne réagissent avec les acides nucléiques. In vitro, les caroténoïdes sont effectivement des inhibiteurs de la péroxydation lipidique induite par l'oxygène singulet ou par des radicaux libres. Ainsi les caroténoïdes ont la particularité d'être des antioxydants agissant à des pressions inférieures à 150 torrs, telles que dans les conditions physiologiques de la plupart des tissus.

Afin d'établir le rôle exact des caroténoïdes dans la prévention de certaines formes du cancer humain, l'Institut National du Cancer et des Instituts Nationaux Américains de la santé conduisent des études dans lesquelles des caroténoïdes sont administrés à une population à haut risque pour certains cancers. Si leur action protectrice est confirmée, les caroténoïdes, et plus particulièrement le β -carotène, seraient de bons candidats comme agent prophylatique du cancer, notamment du fait de leur non toxicité.

La recherche très précise des relations quantitatives entre l'effet des différents caroténoïdes et leur concentration est limitée par les techniques d'analyse des caroténoïdes. Les méthodes actuellement utilisées sont basées sur la spectrométrie d'absorption visible ; elles nécessitent une préparation relativement longue et complexe de l'échantillon à analyser (saponification par une solution de potasse dans le méthanol à chaud suivie, après refroidissement et centrifugation, de plusieurs extractions par l'hexane).Le spectre d'absorption des caroténoïdes dans l'hexane est enregistré entre 300 et 600 nm et la mesure de l'absorbance au maximum d'absorption donne la concentration selon la loi de Beer-Lambert. Récemment, le couplage de cette méthode avec la technique C.L.H.P. (chromatographie liquide haute performance) a permis d'obtenir, avec une très grande précision, la concentration totale ainsi que la composition de mélanges de caroténoides. Cependant si ces techniques deviennent de plus en plus précises, reste la phase d'extraction et de purification qui conduit immanquablement à une perte en caroténoïdes, perte d'autant plus importante que la période de traitement est longue.

Il semble donc important d'améliorer la technique de dosage et le but du présent travail est d'évaluer l'intérêt d'une nouvelle méthode d'analyse utilisant l'effet Raman de résonance.

En excitant le spectre Raman d'un caroténoïde à l'intérieur de sa bande d'absorption visible (transition $\mathbb{I} \to \mathbb{I}^*$ de la chaîne polyénique) une très forte augmentation de l'intensité des raies caractéristiques de la chaîne polyénique est obtenue ; elle peut être de l'ordre de 10⁶.

De plus la majorité des caroténoïdes naturels (7 à 11 doubles liaisons) possèdent des raies relativement voisines en nombre d'ondes, pour que, avec une résolution spectrale suffisamment large, on puisse observer un signal résultant de la somme des contributions de chaque caroténoïde.

La forte exaltation ainsi que la similitude des spectres sont d'un grand intérêt dans la quantification des caroténoides du plasma sanguin.

- Dosage global des carotenoïdes

On peut, dans des conditions précises, obtenir un spectre Raman d'un mélange complexe qui soit caractéristique des seuls caroténoïdes présents. En effet, dans les conditions de résonance, l'intensité des spectres des espèces non absorbantes et des autres pigments est trop faible pour être détectée. L'analyse directe et spécifique des caroténoïdes à l'intérieur d'un système très complexe serait alors possible sans purification.

L'intensité des raies Raman de résonance est, pour une longueur d'onde d'excitation donnée, proportionnelle à la concentration en caroténoïdes. Une substance de référence mise en solution avec les caroténoïdes (ou le solvant lui-même) peut servir d'étalon interne. Le protocole de dosage résumé sur la figure 2 pourrait être alors fort simple :



Spectre Raman de résonance du plasma sanguin.

Seule la raie caractéristique des caroténoïdes est observable dans la région spectrale étudiée. Les autres constituants ne sont pas visibles.

4 cm³ d'acétone sont ajoutés à 1 cm³ de plasma. Après centrifugation, la solution surnageante est analysée par spectrométrie Raman de résonance. On peut observer entre 1300 et 1800 cm⁻¹.

- Une raie caractéristique des caroténoides extraits.

- Les raies de l'acétone.

Les raies observées dans le spectre Raman de résonance d'une solution de béta-carotène dans l'acétone (1.03*10⁻⁶ mole par litre) sont les mêmes observées dans le spectre Raman de résonance du plasma traité par l'acétone.

L'intensité relative de la raie des caroténoïdes (I caroténoides/ I acétone) est directement proportionnelle à la concentration en caroténoide.

Figure 2 : Méthode de dosage global des caroténoïdes du plasma sanguin par spectrométrie Raman de résonance.

addition d'une certaine quantité d'un solvant organique (ex : acétone ou méthanol) au sérum, centrifugation du précipité formé qui contient essentiellement des protéines dénaturées et enregistrement direct du spectre Raman de résonance du surnageant contenant les caroténoïdes. Le rapport de l'intensité d'une raie de caroténoïde à l'intensité d'une raie de solvant conduirait, par l'intermédiaire d'un étalonnage préalablement effectué, à la concentration totale en caroténoïdes dans le plasma sanguin. Si la précision et la reproductibilité étaient du même ordre de grandeur ou même supérieures aux mesures en spectrométrie d'absorption, la limitation des manipulations et le gain de temps permettraient d'éviter la perte et la décomposition d'une partie des caroténoïdes. Toutefois, l'utilisation d'un seul composé de référence pour l'analyse d'un mélange peut entraîner des erreurs importantes. Aussi, afin de pouvoir tester cette méthode de dosage, une connaissance aussi précise que possible de la composition qualitative et quantitative des différents caroténoïdes du plasma sanguin est nécessaire. Cette composition en caroténoïdesdu plasma sanguin est très mal connue et les renseignements obtenus à partir de la littérature ne sont que fragmentaires. Aussi, nous avons cherché dans un premier temps à mieux connaître la composition en caroténoïdes du plasma sanguin en utilisant la technique de séparation C.L.H.P..

- Séparation des caroténoïdes du plasma sanguin par la technique C.L.H.P.

L'analyse des caroténoïdes présents dans le plasma sanguin à tout d'abord été réalisée à partir d'une technique de séparation C.L.H.P., suivie d'une détection classique utilisant l'absorption UV-visible. Cependant, comme nous l'avons mentionné précédemment, la spectrométrie Raman de résonance s'avère être une méthode de détection très sensible pour les caroténoïdes. Aussi, nous avons pensé utiliser cette technique de détection, ce qui nous a conduit à réaliser le couplage d'une colonne C.L.H.P. et d'une installation Raman. Bien que déjà mentionnée dans la littérature, les caractéristiques et les performances d'un tel couplage sont très mal connues. C'est pour mieux connaître les possibilités d'une telle installation que nous étudierons, dans le premier chapitre, les différents paramètres pouvant influencer les résultats.

Le second chapitre sera consacré à l'identification des principaux caroténoïdes du plasma sanguin. Cette identification sera basée sur quelques propriétés spectroscopiques (Raman de résonance et absorption UV-visible) mais aussi sur certaines propriétés chimiques des caroténoïdes. Une méthode de quantification de chaque caroténoïde du plasma sanguin après séparation C.L.H.P. fera l'objet du troisième chapitre. Cette quantification utilisant l'effet Raman de résonance permettra de connaître la composition exacte en caroténoïdes de certains plasmas sanguins. A l'occasion d'une étude circadienne, nous pourrons comparer les résultats obtenus par la méthode globale aux résultats obtenus après séparation. and a second second

CHAPITRE I

Mise au point d'une séparation de caroténoïdes par la chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.)



CHAPITRE I

Mise au point d'une séparation de caroténoïdes par la chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.)

I - <u>GENERALITES</u>	22
II - <u>CHOIX DE LA COLONNE</u>	23
III - CHOIX DE LA PHASE MOBILE C.L.H.P	25
IV - <u>DEBITS UTILISES</u>	26
V - <u>DETECTEURS</u>	28
1 - <u>Détecteurs</u> UV-Visible	29
A - Détection monocanale B - Détection multicanale	29 31
2 - <u>Détecteurs Raman de résonance</u>	37
A - Caractéristiques de la détection RAMAN	37
a - Principe de la mesure	37
b - Paramètres influençant la détection α) terme Su β) terme Sf	39 39 45
γ) terme Sn δ) constante de temps de l'appareil	46 46
c - Comparaison des détections monocanales	
UV-visible et RAMAN α) limite de détection β) bilan énergétique	47 47 48
B – Caractérisation des produits séparés	50
a - Détection monocanale et balayage rapide b - Détection multicanale	51 52
VI - <u>CONCLUSION et PERSPECTIVES</u>	54

CHAPITRE I

Mise au point d'une séparation des caroténoïdes par la chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.).

Ce chapitre est consacré aux méthodes chromatographiques mises au point au cours de ce travail. Nous verrons dans un premier temps les conditions de séparation utilisées (colonnes et solvants) puis les différents détecteurs utilisables pour l'identification des caroténoïdes. Nous décrivons le couplage original de la technique C.L.H.P. avec un détecteur utilisant la spectrométrie Raman de résonance. Les avantages et les limites de cette technique seront analysés.

I - GENERALITES

La chromatographie liquide haute performance est une méthode d'analyse qui présente une supériorité sur d'autres méthodes car elle permet souvent de séparer les différents constituants d'un mélange avec une efficacité beaucoup plus grande que la chromatographie liquide ou la chromatographie couche mince. Cette technique utilise une pompe qui permet de mettre sous haute pression un solvant dans un circuit comportant une colonne chromatographique et un injecteur d'échantillons. L'échantillon injecté dans le solvant (phase mobile) passe ainsi à travers la colonne remplie de particules solides en forme de bille (phase stationnaire). Différents mécanismes peuvent être mis en jeu entre les constituants de l'échantillon et la phase stationnaire. Suivant leurs caractéristiques physicochimiques, les composants du mélange sont plus ou moins retenus et donc migrent à des vitesses différentes à travers la colonne, d'où leur séparation.

L'utilisation de la C.L.H.P pour l'analyse des caroténoïdes a actuellement largement dépassé toutes les autres techniques analytiques [7]. Les avantages de cette technique tels que la rapidité, la non destruction des produits mais aussi un pouvoir de séparation élevé font que ce type de chromatographie est non seulement utilisé pour l'analyse de routine des caroténoïdes dans la nourriture ou dans les produits pharmaceutiques, mais aussi dans l'analyse fine de mélanges complexes. Pour un mélange donné, le choix de la colonne (phase stationnaire) ainsi que le choix des solvants sont les deux paramètres principaux pour une bonne séparation.

Le choix dépendra du type de composés à séparer mais aussi du temps d'analyse "désiré". Dans notre cas, il s'agissait de séparer des caroténoïdes de polarités très différentes avec un temps chromatographique global ne dépassant pas 15 minutes. Ce dernier critère a été fixé en vue d'une utilisation éventuelle en milieu clinique.

II - CHOIX DE LA COLONNE

Ce choix est basé sur les caractéristiques physico-chimiques des molécules à séparer.

Dans le cas des caroténoïdes, le mécanisme de séparation mis en jeu ne peut être ni un mécanisme ionique ni un mécanisme de dimension moléculaire. En effet, ces molécules ne sont pas des ions dans nos mélanges et ne présentent pas de différences notables de tailles. Par contre, les caroténoïdes présentent des différences importantes de polarité. C'est donc par ce type de mécanisme que les caroténoïdes sont le plus souvent séparés avec des colonnes de type "phase normale" ou de type "phase inverse".

Une colonne chromatographique dite du type "phase normale" est une colonne possédant une phase stationnaire polaire (billes de silice par exemple). Dans ce cas, la phase mobile (solvant) utilisée doit être peu polaire. Le mécanisme mis en jeu lors d'une séparation est un mécanisme d'adsorption : les molécules polaires sont plus attirées par la phase stationnaire et donc seront retenues par celle-ci. Les molécules sortiront de la colonne en fonction inverse de leur polarité, les moins polaires sortant en premier.

Une colonne de type "phase inverse" présente les propriétés opposées. La phase stationnaire est une phase normale rendue peu polaire par greffe de groupements aliphatiques. La phase mobile est dans ce cas polaire. Dans ce cas, les molécules les plus polaires sortent en premier de la colonne. Dans la littérature, les deux types de colonnes ont été employés pour la séparation des caroténoïdes [8]. Les phases normales utilisées sont généralement de type "silice" ou "alumine" [9-10]. Ces colonnes présentent l'avantage d'avoir une bonne spécificité pour les composés <u>cis-trans</u> [11] mais ne permettent pas de séparer les isomères de position tels que l'alpha et le béta-carotène [12]. Les phases inverses sont de toute évidence les plus utilisées pour la séparation des caroténoïdes [15-16] et plus particulièrement dans l'analyse des caroténoïdes du plasma sanguin [17-18-19-20-21]. Ces colonnes ont pour avantage de séparer spécifiquement les isomères de position mais sont peu sélectives pour les composés polaires. Les études effectuées sur les caroténoïdes du sang se sont donc limitées essentiellement à la séparation et quantification des composés les moins polaires : lycopène, α - carotène, β -carotène. La séparation des xanthophylles n'était pas recherchée.

En remarque, nous pouvons signaler que d'autres types decolonnes de polarité intermédiaire sont actuellement utilisées. Les greffons de la phase stationnaire sont du type amino (-NH2) ou cyano (-CN). Dans ce cas, les isomères de position peuvent être séparés [13-14]. Ces colonnes restent toutefois très spécifiques et donc peu utilisées.

A partir de ces données, nous avons voulu utiliser une colonne permettant d'obtenir une bonne sélectivité à la fois pour les composés non polaires et polaires. La colonne utilisée est de type phase inversée C18 (chaînes à 18 carbones greffées sur de la silice) avec des groupements silanol laissés libres. Cette particularité permet d'obtenir une colonne de polarité intermédiaire et donc utilisable pour une gamme de composés de polarités très différentes.

L'efficacité d'une phase est liée aussi à la granulométrie. Ainsi, les phases les plus fines (dimensions des billes les plus faibles) sont les plus utilisées par ce que plus efficaces. Pour notre séparation, nous nous sommes placés dans les meilleures conditions d'efficacité, c'est-à-dire en utilisant une taille de particule de 5 microns. Cette taille est la plus faible disponible pour ce type de colonne.

La colonne est fabriquée par Du Pont de Nemours type "Zorbax C18 no endcapped" de dimensions : 150 × 4,6 mm.

III - CHOIX DE LA PHASE MOBILE C.L.H.P.

La phase mobile C.L.H.P. peut être composée d'un ou plusieurs solvants. L'utilisation d'un seul solvant n'est généralement pas suffisant pour avoir une bonne séparation, un mélange de solvants permet d'effectuer une séparation plus efficace. Des techniques dites par grandient de solvants permettent de faire varier les propriétés (polarité) du solvant C.L.H.P. en modifiant la composition de celui-ci en cours d'élution. Ces méthodes permettent ainsi d'optimiser une séparation sur l'ensemble des composés à séparer. Ces techniques sont toutefois peu envisageables en méthode de routine du fait d'une reproductibilité parfois aléatoire ainsi que du temps généralement assez long mis pour rétablir après chaque séparation les conditions de polarité initiales.

De ce fait, le mode de séparation que nous utiliserons est de type isocratique (la composition de départ de la phase mobile est conservée pendant toute l'analyse).

Les différents constituants de notre phase mobile C.L.H.P. doivent satisfaire les conditions suivantes :

- être polaires car la phase stationnaire est de type phase inversée,
- être miscibles entre eux,
- solubiliser les caroténoïdes.

Pour une détection par spectrométrie d'absorption visible, ils doivent aussi :

- conserver un coefficient d'extinction molaire élevé pour les caroténoïdes,

et pour une détection Raman :

 ne pas présenter de raie Raman coincidant avec une raie caractéristique des caroténoïdes.

Après divers essais, notre choix final s'est porté sur un mélange de deux solvants et d'un stabilisant : acétonitrile-acétate d'éthyle et le n-décanol dans les proportions respectives 71,9-28-0,1. Le rôle du n-décanol est de stabiliser les caroténoïdes polaires et donc de maintenir le pouvoir de séparation sur ces composés [22]. Sur la figure 3, est présentée le spectre Raman du solvant C.L.H.P. (1) ainsi que le spectre Raman de résonance du β -carotène dans ce même solvant (2). Nous remarquons que les modes v_1 et v_2 du β -carotène sont situés dans des zones spectrales libres de diffusion du solvant. La zone hachurée, représentant la fente d'entrée du spectromètre, indique que la détection Raman est possible avec ce mélange pour les deux modes principaux des caroténoïdes.



Figure 3 : Spectre Raman du solvant C.L.H.P. (1) et spectre Raman de résonance du trans- β -carotène (5 x 10⁻⁷ M) dans le solvant C.L.H.P.(2). $\lambda o = 488$ nm ; 100 mw.

IV - DEBITS UTILISES

Le débit est choisi de telle façon que la colonne effectue les séparations avec le maximum d'efficacité tout en conservant un temps d'élution le plus court possible. Le choix du meilleur débit se fait en calculant le nombre de plateaux théoriques ou la hauteur équivalente d'un plateau théorique (H.E.P.T.).

Ces paramètres se calculent par :

Nombre de plateaux théorique = $5,54 \times (\frac{tr}{\omega l/2})^2$

avec tr : temps de rétention

 $\omega 1/2$: largeur à mi-hauteur du pic.

H.E.P.T. = $\frac{\text{longueur de colonne}}{\text{Nb de plateaux}}$

Les résultats pour le β -carotène, avec la colonne et les solvants choisis auparavant, sont présentés dans le tableau suivant :

<u>Débit</u>	:	tr	:	ω1/2	:	N	:	<i>H.E.P.T.</i>	:	Nb de plateaux/m
	:		:		:		:		:	
2 ml/min	:	11,8	:	0,4	:	4821	:	0,031	:	32140
	:		:		:		:		:	
	:		:		:		:		:	
1,5 ml/min	1:	15,6	:	0,4	:	8426	:	0,0178	:	56176
	:		:		:	· · ·	:		:	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	:		÷		:		:		:	
1 ml/min	:	23,8	:	0,7	:	6421	:	0,024	:	42807
	:		:		:		:		:	

L'efficacité de la colonne est meilleure à 1,5 ml/min. Ce débit correspond à nos exigences de départ, une analyse d'environ 15 minutes (le β -carotène étant le composé le moins polaire des caroténoïdes du sang). L'efficacité d'une colonne peut se dégrader après plusieurs utilisations. Il est possible de mettre en cause la perte de chaines C18 par l'empoisonnement des sites de fixation (injection d'impuretés) et la création de chemins préférentiels (effet d'un débit trop important). Nous avons été amenésau cours du travail à vérifier à plusieurs reprises l'efficacité de notre colonne en mesurant le temps d'élution et la largeur du pic de β -carotène. La phase stationnaire a été remplacée au bout de 500 injections environ.

V - DETECTEUR

Le but d'un détecteur est de contrôler de façon continue la présence des différents composants du mélange à la sortie de la colonne après élution. Le choix de celui-ci dépend de la nature et des propriétés physico-chimiques des composés à analyser.

Dans certaines séparations, les constituants étant de nature très différente, il est nécessaire d'utiliser plusieurs détecteurs afin de pouvoir, avec efficacité, détecter chacun des constituants.

Ceci nous amène à parler de spécificité : un détecteur spécifique est un détecteur permettant de noter la présence d'une catégorie de substances bien déterminée. Le détecteur spécifique permet donc de caractériser un soluté grâce à ses propriétés physico-chimiques qui sont différentes de celles du solvant.

Un détecteur peut ne pas être spécifique, dans ce cas, c'est un détecteur que l'on appelle détecteur universel : il mesure les variations des propriétés physico-chimiques de la phase mobile.

Nous avons rassemblé, dans le tableau suivant, les différents types de propriétés physico-chimiques utilisées à des fins de détection en chrommatographie liquide. Les performances présentées [23] sont très aléatoires suivant les molécules étudiées. Ces valeurs sont une indication de la sensibilité relative de chaque détecteur. Les limites de détection correspondent à un chromatogramme obtenu avec un signal sur bruit égal à 5 pour des molécules de poids moléculaires de 200 et une injection de 10 μ l.

Type de propriétés	:	Disponible	:	Détection limite	:	Détection limite
physico-chimiques	:	dans le	:	des détecteurs	:	des détecteurs
mis en jeu	•	commerce	:	commerciaux	:	expérimentaux
	:		:		:	
Absorbance	:	X	:	100 pg - 1 ng	:	1 pg
Fluorescence	:	X	:	1 - 10 pg	:	10 fg
Electrochimique	:	X	:	10 pg - 1 ng	:	100 fg
Indice de réfraction	:	X	:	100 ng - 1 pg	:	100 ng
Conductivité	:	X	:	500 pg - 1 ng	:	500 pg
Spectrométrie de	:				• :	
masse	:	X	:	100 pg - 1 ng	:	1 pg
IRTF	:	X	:	1 μg	:	100 ng
Diffusion de lumière	:	X	:	10 µg	:	500 ng
Activité optique	:		:		:	1 ng
Photoionisation	:		:		:	1 pg - 1 ng
Sélectivité d'éléments	:		:		:	10 ng

Seuls les détecteurs utiles pour notre étude sont détaillés par la suite.

1 - Détecteurs UV-visible

Les détecteurs basés sur l'absorption UV-visible sont très bien adaptés à l'analyse de solutions de caroténoïdes à très faibles concentrations car ces composés possèdent un coefficient d'extinction molaire élevé ($\simeq 10^5$ mole⁻¹ × l × cm⁻¹). La majorité des détecteurs sont de type monocanal ; ils réalisent l'analyse dans une bande étroite de longueur d'onde. Ces dernières années sont apparus sur le marché des détecteurs de type multicanal qui enregistrent la totalité du spectre d'absorption en un temps court. Nous avons utilisé ces deux types de détecteurs.

A - Détection monocanale

L'appareil utilisé est le modèle 481 "Lambda Max" de la Société Waters. La lumière émise par une lampe au deutérium est diffractée par un réseau holographique concave (1200 traits par mm) puis dirigée vers un séparateur de faisceau pour éclairer la cellule d'analyse (cellule à flux continu de 14 microlitres) et la cellule de référence contenant soit de l'air, soit le solvant C.L.H.P.. Ce détecteur est constitué par une double photodiode au silicium montéedans un pont de wheastone qui effectue la mesure de la différence d'absorption.

Le monochromateur utilisable entre 210 et 700 nm, ne comporte pas de fente de sortie ; la bande spectrale utile est en fait définie par la dimension de la fenêtre d'entrée de la cellule qui possède un diamètre de 1 mm. Le schéma optique du détecteur est présenté en figure 4.



Figure 4 : Schéma optique du détecteur UV-visible monocanal utilisé.

La longueur d'onde d'analyse est fixée à 450 nm qui est un domaine d'absorption commun à tous les caroténoïdes. Sur la figure 5 est représenté le chromatogramme d'un mélange synthétique de caroténoïdes obtenu grâce à ce type de détecteur. Les conditions d'élution, colonne, solvants et débit sont celles décrites précédemment.



Figure 5 : Séparation d'un mélange synthétique de caroténoïdes. Détection à 450 nm ; débit : 1,5 ml/mn ; volume d'injection = 60 µl ; masse moyenne par caroténoïde = 10 ng.

B - Détection multicanale

L'avènement récent des barettes de photodiodes a permis le développement de ce type de détecteur qui permet d'obtenir instantanément le spectre d'absorption UV-visible (210-600 nm) des solutés élués par la colonne. La figure 6 présente le schéma de principe du détecteur utilisé (Hewlett - Packard 1040 A).



Figure 6 : Schéma du détecteur UV-visible à barette de photodiodes utilisé.

La lumière issue de la source (lampe au deutérium) pénètre à l'intérieur de la cellule d'analyse (4,5 μ l); la lumière transmise est ensuite diffractée par un réseau holographique concave au plan focal duquel est placé une barette de photodiodes comportant 210 éléments au silicium (résolution de 2 nm). La mesure s'effectue de la manière suivante :

- Mesure du courant de fuite des photodiodes par élimination du faisceau lumineux.
- Enregistrement du spectre d'absorption UV-visible du solvant seul avant injection.

- Enregistrement des spectres d'absorption en cours d'élution ; la cadence d'enregistrement peut être variable (entre 40 ms et quelques secondes) et doit tenir compte de la résolution temporelle demandée et du temps total de l'élution.
- Soustraction continue du spectre du solvant par les mémoires "tampons" du détecteur au cours de l'élution et stockage dans la mémoire de l'ordinateur.
- Un logiciel informatique permet l'analyse et l'exploitation des résultats qui peuvent être présentés de différentes manières. Nous illustrons sur les figures 7,8,9,10 les différentes informations obtenues par l'analyse d'un mélange de caroténoides standard.
- Les chromatogrammes sont obtenus à différentes longueurs d'onde (figure 7).





- La superposition de ces chromatogrammes permet d'obtenir une représentation en trois dimensions (fig. 8).



Figure 8 : Représentation en trois dimensions des différents chromatogrammes (conditions identiques à la figure 7).

TEMPS (MINUTES)



Figure 9 : Représentation de type "cartographie" (conditions expérimentales identiques à la figure 7).

- La représentation de type "cartographie" (figure 9) permet d'obtenir des informations sur la qualité de la séparation. En effet un pic d'élution obtenu à partir d'un seul composé donne des "courbes de niveau" symétriques. On peut voir sur la figure 9 que le pic élué à environ 8 minutes présente une légère dissymétrie provoquée par la présence de deux isomères de position de la cryptoxanthine. Le composé utilisé pour la préparation du mélange synthétique comporte 2 % d'isomère isocryptoxanthine et 98 % d'isomère β-cryptoxanthine.
- Pour chaque pic d'élution, il est possible d'obtenir le spectre d'absorption visible (fig. 10).




2 - Détecteurs Raman de résonance

A - Caractéristiques de la détection Raman

L'intensité de la diffusion Raman est faible et donc l'utilisation d'un spectromètre Raman comme détecteur C.L.H.P. reste limitée du fait de son manque de sensibilité, qualité généralement demandée à un détecteur C.L.H.P. Cependant, ce moyen de détection a déjà été mentionné dans la littérature [24-25-26] pour différentes séparations.

Dans le cas des caroténoïdes, le phénomène de résonance permet d'augmenter la diffusion Raman d'un facteur 10^6 (cf. Annexe). Cette très forte exaltation permet d'utiliser le spectromètre Raman comme détecteur C.L.H.P. spécifique aux caroténoïdes avec une sensibilité supérieure à celle obtenue par absorption visible.

a - Principe de la mesure

Un faisceau laser est focalisé dans une cellule à flux continu reliée à la colonne chromatographique. La lumière diffusée est projetée sur la fente d'entrée d'un monochromateur qui sélectionne un nombre d'onde particulier devant la fente de sortie. Le nombre d'onde analysé correspond à une raie caractéristique du spectre Raman de résonance des caroténoïdes (v_1 à 1525 cm⁻¹ ou v_2 à 1159 cm⁻¹). Le flux sortant éclaire un photomultiplicateur ; le courant anodique amplifié et filtré alimente un enregistreur potentiométrique ou un microordinateur. La figure 11 présente une telle installation ainsi qu'un chromatogramme obtenu pour un mélange de caroténoïdes standard.

Le chromatogramme est obtenu en enregistrant l'intensité du signal Raman de résonance en fonction du temps.

Il n'existe pas dans la littérature d'études systématiques de ce type de détection, aussi nous avons été amenés à étudier l'influence des différents paramètres instrumentaux sur les résultats.



Figure 11 : Schéma du couplage C.L.H.P. - Spectromètre Raman et séparation d'un mélange synthétique. $\lambda ext = 488$ nm ; P = 150 mw ; débit = 1,5 ml/mn ; détection à 1159 cm⁻¹ ; résolution = 18 cm⁻¹ ; volume d'injection = 80 µl.

b - Paramètres influençant la détection : conditions optimales d'utilisation

En spectrométrie Raman, la qualité des résultats peut s'exprimer par le rapport signal sur bruit. On exprime ce rapport par la relation suivante :

$$\frac{S}{B} = \frac{Su \times T}{\sqrt{Su \times T} + \sqrt{Sf \times T} + \sqrt{Sn \times T}}$$
(1)

avec :

Su = nombre de photons diffusés utiles.

Sf = nombre de photons engendrés par des phénomènes parasites (fluorescence de l'échantillon).

Sn = signal parasite du à la diffusion des pièces optiques et du bruit noir du photomultiplicateur.

T = temps d'enregistrement d'un élément spectral.

Nous nous sommes penchés sur l'influence de chacun des paramètres de l'équation (1) afin de connaître les conditions optimales d'utilisation en détection C.L.H.P..

a) Terme Su

Ce paramètre doit être le plus important possible. Il dépend de :

* La puissance laser

Pour une concentration donnée, l'intensité d'une raie Raman est proportionnelle à l'intensité du faisceau excitateur ainsi il n'est pas surprenant d'obtenir une droite en portant l'intensité en fonction de la puissance laser. Nous voyons sur la figure 12 que, pour nos conditions expérimentales, le domaine de linéarité est compris entre 0 et 400 mw. La non-linéarité aux fortes énergies peut facilement s'expliquer par la photodégradation des caroténoïdes irradiés à l'intérieur de leur bande d'absorption. Un bilan énergétique plus complet sera présenté par la suite.



Figure 12 : Intensité du pic chromatographique en fonction de la puisssance laser pour la zéaxanthine. (8ng ; volume d'injection = 60 μ l) ; λ ext = 488 nm.

* La géométrie d'illumination et de collection

Cette géométrie est très importante car elle permet de produire au niveau de l'échantillon une forte densité photonique par focalisation du faisceau laser et de collecter le maximum de lumière diffusée. Deux cellules ont été utilisées (figure 13 A et B). La première (A) est une cellule parallèlépipédique commerciale (Ellma) de 25 microlitres initialement prévue pour les études en fluorescence. Elle présente trois faces transparentes qui permettent de réaliser un double passage du faisceau laser à l'intérieur de la cellule et d'extraire la lumière diffusée à 90°. De part sa configuration, la solution s'écoule perpendiculairement à la direction du faisceau laser.

Pour améliorer la détection, et donc le terme Su, une seconde cellule a été construite d'après des travaux préalablement effectués au laboratoire [24]. Elle est constituée d'un tube capillaire de 800 μ m de diamètre intérieur et de 1 cm de longueur. Le faisceau laser est focalisé le long de l'axe de cette cellule ; il est parallèle au sens d'écoulement de la solution. Sa géométrie permet de réaliser un double passage et d'utiliser un miroir de collection placé à l'opposé de l'objectif du spectromètre. Sa capacité est de 8 μ l, ce qui permet d'éviter des dilutions éventuelles au niveau de la cellule.

Cette seconde cellule (B) permet un gain de 1,5 par raport à la première cellule (A) sur le rapport S/B d'un chromatogramme.

* Largeur des fentes

La raie de diffusion Raman analysée possède une largeur intrinsèque, ce qui nécessite d'utiliser des ouvertures de fente compatibles avec la largeur de la raie afin d'obtenir le maximum d'intensité. Les spectres Raman du solvant seul et d'un caroténoïde dissout dans ce solvant sont représentés sur la figure 3. Les bandes Raman principales des caroténoïdes (v_1 et v_2) ont une largeur spectrale de l'ordre de 30 cm⁻¹.

Pour une résolution spectrale donnée, le nombre de photons détectés est proportionnel à la surface de la zone hachurée. Nous constatons que ce signal utile est en fait la superposition de diffusion Raman et d'émission de fluorescence. La présence d'une bande de fluorescence est souvent observée lors de l'enregistrement de spectres Raman de résonance. Cette émission a pendant longtemps été attribuée à la présence d'impuretés ou de produits de décomposition, cependant nous avons pu constater au cours de cette étude que les caroténoïdes possèdent effectivement une fluorescence intrinsèque (voir annexe).



DIM: 0.15 X 1 cm





CELLULE B

Figure 13 : Schéma des cellules utilisées pour le couplage C.L.H.P.spectromètre Raman.

-42-

Sur la figure 14, nous présentons le rapport diffusion Raman sur émission de fluorescence pour différentes résolutions spectrales. Nous constatons que l'émission de fluorescence est majoritaire dans bien des cas.





L'évolution du signal utile en fonction de la largeur de la fente est présentée sur la figure 15. Cette variation laisserait penser que la fente doit être la plus large possible pour pouvoir détecter le maximum de signal et donc une masse de plus en plus faible de caroténoïde. Cette masse détectable est en fait inversement proportionnelle au signal utile détecté, c'est pour cela que nous avons porté sur le graphe de la figure 15 l'évolution d'une masse détectable en fonction de la résolution choisie.



Figure 15 : Signal utile (----) et masse détectable relative en fonction de la résolution (-----). λ ext = 488 nm à la fréquence v_2 (1159 cm⁻¹) pour une solution de β -carotène (5 × 10⁻⁷M).

Nous voyons que pour des largeurs spectrales supérieures à 20 cm⁻¹, le gain est très faible d'autant plus que le fond propre au solvant va augmenter. Ceci est, comme nous le verrons par la suite, préjudiciable au rapport S/B. Une fente de 18 cm⁻¹ a été choisie pour ces études.

* Choix du spectromètre

La luminosité du monochromateur ainsi que la sensibilité du photomultiplicateur sont deux paramètres importants pour la détection d'un signal. Au cours de ce travail, nous avons utilisé deux types d'appareils :

- Un triple monochromateur Dilor RT 30, équipé d'un photomultiplicateur Hamamastu, type 943-02 (photodiode GA-AS) refroidi par effet Peltier.
- Un double monochromateur à réseaux holographiques concaves, Ramanor HG2S, équipé d'un photomultiplicateur, Hamamatsu, type 943.

Ce dernier nous a permis de gagner un facteur 1,6 sur le rapport S/B.

Les caractéristiques des appareils seront présentées en annexe.

* Utilisation optimale de la résonance

Pour obtenir le meilleur signal, il faut préférentiellement se placer sur le maximum du profil d'excitation, c'est-à-dire au voisinage de la transition électronique 0-0. Cependant, il est impossible de se trouver au maximum de résonance de chaque composé élué ; un compromis doit généralement être pris.

β) terme Sf

Ce terme qui correspond au fond d'émission ou de diffusion de l'échantillon est à diminuer pour obtenir le meilleur rapport S/B.

* Fluorescence des solvants C.L.H.P.

Comme nous l'avons vu, la fluorescence de l'échantillon est un paramètre favorable pour la détection en mode monocanal. Par contre, la qualité des solvants est très importante à la fois pour la longévité de la colonne chromatographique mais aussi pour la détection Raman. En effet, les impuretés du solvant peuvent engendrer un fond de fluorescence qui nuit à la détection. De la relation (1), on peut déduire que le rapport S/B est inversement proportionnel à la racine carré du nombre de photons engendrés par la fluorescence des solvants.

* Bandes Raman des solvants

Comme nous l'avons vu, les solvants C.L.H.P. ont été choisis pour leur pouvoir de séparation des caroténoïdes mais aussi parce qu'aucune des bandes Raman des solvants ne coïncide avec une raie Raman de résonance caractéristique des caroténoïdes. Ainsi, le fond continu détecté est le plus faible possible. Dans notre cas, il est préférable de détecter la bande v_2 à 1159 cm⁻¹, nombre d'onde pour lequel le fond de solvant est le plus faible, que de détecter la bande v_1 à 1520 cm⁻¹. La différence reste ici très faible mais peut être non négligeable dans d'autres cas. La largeur des fentes du spectromètre doit en outre rester dans des valeurs raisonnables car, pour un solvant donné, Sf est proportionnel à cette largeur.

γ) Terme Sn

Le terme Sn n'est fonction que du type de photomultiplicateur utilisé. Le bruit noir de celui-ci doit être le plus faible possible, c'est pour cela qu'il est maintenu à basse température par effet Peltier.

δ) La constante de temps de l'appareil

Celle-ci dépend des conditions chromatographiques (débit, résolution des pics du chromatogramme). Dans notre cas, le meilleur compromis pour un débit de 1,5 ml/mn entre le rapport S/B et la résolution est une constante de 1 s.

c - Comparaison des détections monocanales UV-visible et Raman

Les conditions optimales établies lors d'un couplage C.L.H.P.-Raman permettent de comparer la technique de détection Raman à la détection UV-visible surtout au point de vue limite.

a) Limite de détection

Pour la détection en absorption visible, nous utilisons les résultats de la littérature. En effet, David W. Nierenberg [18] s'est placé dans les meilleurs conditions expérimentales d'une détection UV-visible en utilisant un détecteur équipé d'un filtre passe bande à 436 nm. Dans ces conditions, cette technique détecte 500 pg de β -carotène injectés avec un rapport S/B égale à 5.

Pour une détection Raman, dans les conditions optimales explicitées précédemment, la masse limite de détection est de 50 pg de β -carotène avec un rapport S/B égal à 5 (conditions opératoires et chromatogramme fig. 16).



Figure 16 : 50 picogrammes de β -carotène injectés et détectés à 1159 cm⁻¹ (ν_2) pour λ ext = 488 nm (P = 500 mw).

Ainsi, le détecteur Raman améliore sensiblement la limite de détection des caroténoides (facteur 10) par rapport à un détecteur UV-visible performant. Nous avons vérifié que le détecteur Raman ne modifie pas la résolution par rapport au détecteur UV-visible utilisé.

Pour comparer plus précisément ces deux techniques de détection, nous avons tenté d'établir un bilan énergétique pour chacune de ces méthodes.

β) Bilan énergétique

Il est difficile de comparer les deux techniques de détection car les phénomènes mis en jeu sont très différents (la détection UV-visible est basée sur l'absorption et la détection Raman sur la diffusion). La comparaison se limitera donc à la présentation de quelques ordres de grandeurs. Le nombre de photons absorbés ou diffusés par molécule et par seconde est égale à :

$$N = \frac{N_o \star \sigma}{\pi \star R_o^2}$$
(2)

avec : $R_0 = rayon du faisceau incident (cm)$

 σ = section efficace d'absorption ou de diffusion (cm²/molécule)

 N_{o} = nombre de photons incident/s

No peut être remplacé par :

$$N_{o} = \frac{P \times \lambda_{o}}{h \times C}$$
(3)

 $o\dot{u}$: P = puissance faisceau incident (watt)

 λ = longueur d'onde du faisceau (cm)

h = constante de planck = $6,62 \times 10^{-34}$ J.s

C = vitesse de la lumière (cm/s)

On obtient donc :

$$N = \frac{P \times \lambda_{o} \times \sigma}{h \times C \times \pi \times R_{o}^{2}}$$
(4)

Tous les termes de l'équation (4) sont connus expérimentalement, seules les sections efficaces d'absorption et de diffusion restent à déterminer. La section efficace d'absorption d'une molécule (σ) est reliée au coefficient d'extinction molaire ε par la relation suivante [27]:

$$\sigma = 3,824 \times 10^{-21} \times \epsilon \tag{5}$$

Sachant que le β -carotène à un ε égal à 1,33 × 10⁵ l/mole × cm, on trouve σ égal 5 × 10⁻¹⁶ cm²/molécule.

Nous avons déterminé la section efficace de diffusion du β -carotène par rapport à un solvant de section efficace connue et à l'aide de la relation suivante [28] :

$$\sigma_N = \sigma_S \star (I_N / I_S) \star (\frac{v_o - v_S}{v_o - v_N}) \star (C_S / C_N)$$
(6)

où : v_N = fréquence de diffusion du composé

- v_{s} = fréquence de diffusion du solvant
- $v_0 = fréquence$ laser
- $\boldsymbol{\sigma}_{N}$ et $\boldsymbol{\sigma}_{S}$ sont les sections efficaces de diffusion pour le composé
 - et le solvant aux vibrations v_N et v_S
- I_N et I_S sont les intensités des raies Raman

 C_S et C_N = concentrations molaires du solvant et du composé.

Nous utilisons la section efficace de la bande 992 cm⁻¹ du benzène [29] pour déterminer celle du β -carotène. Ceci nous a permis de trouver une section efficace égale à 2,59 × 10⁻²³ cm²/molécule pour la bande à 1159 cm¹ du β -carotène exalté avec la radiation à 488 nm.

Nous pouvons ainsi rassembler dans un tableau les grandeurs mises en jeu (cf tableau ci-après).

A partir des valeurs du tableau, il est possible de constater les points suivants :

- La faible intensité du signal Raman (section efficace petite) est sans doute compensée par le nombre de photons incidents très élevé. La focalisation du faisceau laser permet en outre d'irradier un nombre très petit de molécules.

- La concentration limite obtenue à l'intérieur de la cellule Raman au moment de la détection d'un pic (2×10^{-10} M) est en parfait accord avec le seuil de détection obtenu en spectrométrie conventionnelle (5×10^{-9} M) avec une résolution spectrale de 5 cm⁻¹. Ceci indique que, dans les conditions expérimentales que nous nous sommes fixées, il n'est guère pensable de détecter moins de 50 picogrammes de caroténoïde.

- Le nombre important de photons absorbés par molécule et par seconde lors de la détection Raman (47200) peut être à l'origine des phénomènes de dégradation qui peuvent être observés. Cependant, le processus de dégradation peut

-49-

être fortement réduit par un flux continu dans la cellule Raman : la dégradation sera inversement proportionnelle au débit. Une différence significative a été trouvée entre les deux types de cellules utilisées; avec la cellule de type fluorescence dans laquelle le flux est perpendiculaire au faisceau laser, le temps de passage des molécules dans le faisceau (3×10^{-3} s) est beaucoup plus faible que dans le cas de la cellule cylindrique (0,15 s). Il sera donc préférable d'utiliser la cellule de type A (cf figure 13 A).

·	UV.VISIBLE	RAMAN
Puissance du faisceau incident (watt)	: : 8 × 10 ⁻⁹ :	: : 0,5 :
Rayon incident (cm)	: : 0,1 :	: : 0,005 :
Longueur d'onde (cm)	: 450×10^{-7} :	: 488×10^{-7} :
σ (cm²/molécule)	5×10^{-16}	: $2,59 \times 10^{-23}$
Nombre de photons absorbés par molécule et par seconde	3×10^{-4}	: : 47200 :
Nombre de photons diffusés par molécule et par seconde	: :	: 1 :1
Concentration limite obtenue dans la cellule en haut du pic d'élution (mole/l)	2×10^{-8}	2×10^{-10}
Volume irradié = volume du faisceau dans la cellule	: 7,854 × 10^{-3} :	$6,4 \times 10^{-6}$
Temps d'irradiation d'une molécule au débit utilisé (s)	: : : 0,4	$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$
Nombre de molécules irradiées par le faisceau dans la cellule en haut du pic d'élution	: $1,57 \times 10^{-13}$:	: 1,28 × 10 ⁻¹⁸ :
Nombre de photons absorbés par seconde pour le total des molécules	: 4,71 × 10 ⁻¹⁷	: 6×10^{-14}
Nombre de photons diffusés par seconde	: : :	: : 1,28 × 10 ⁻¹⁸ :

B - Caractérisation des produits séparés

A des fins de caractérisation, il est parfois très utile d'enregistrer le spectre Raman de résonance des composés en sortie de colonne. On peut envisager de stopper le flux à un temps de rétention donné et d'enregistrer le spectre. Cette méthode, qui a été utilisée de nombreuses fois, a le gros désavantage d'être très longue à mettre en oeuvre. L'enregistrement du spectre Raman de résonance en flux continu aurait l'énorme avantage d'être plus rapide. Bien que, pour les caroténoïdes, il soit très difficile de les identifier par leur spectre de diffusion, nous avons testé deux techniques donnant les informations spectrales Raman en continu.

a - Détection monocanale et balayage rapide

Le système de balayage rapide (voir annexe) adapté sur le spectromètre Raman H2S (Jobin-Yvon) permet l'enregistrement d'un domaine spectral de 700 cm⁻¹ en quelques secondes (1 à 12 secondes). Nous avons effectué le couplage C.L.H.P. avec ce type de spectromètre. Le but est ici d'obtenir rapidement un spectre Raman de résonance des composés élués en sortie de colonne. L'enregistrement rapide de la zone spectrale 900-1600 cm⁻¹ au cours de l'élution d'un échantillon de zéaxanthine est présenté sur la figure 17. Nous voyons apparaître simultanément les raies v_1 et v_2 ainsi que la montée du fond de fluorescence. La fluorescence des caroténoïdes n'est donc pas apportée par des impuretés ou par des produits de dégradation mais est bien due à une fluorescence intrinsèque des caroténoïdes (cf annexe).



Figure 17 : Balayage rapide (70 cm⁻¹/s) du spectre Raman entre 900-1600 cm⁻¹ pendant l'élution de la zéaxanthine (2ng injectés). Le tracé en pointillé représente le retour rapide du système. Débit : 2 ml/mn ; 60 μl injectés.

b - Détection multicanale

Les spectromètres multicanaux de nouvelle génération permettent l'enregistrement de spectres Raman en un temps très court (jusqu'à 100 ms). Nous avons effectué le couplage C.L.H.P. avec un spectromètre multicanal OMARS 89 de la Société DILOR. Les mesures ont été réalisées de la façon suivante :

- Enregistrement du spectre du solvant avant injection.

- Enregistrement des spectres de solutés pendant l'élution à des temps de rétention prédéterminés.

- Normalisation des spectres de solutés à l'aide des bandes du solvant.

- Soustraction du spectre normalisé de chaque soluté avec le spectre du solvant C.L.H.P. seul (fig. 18).

La séparation de deux caroténoïdes à longueurs de chaînes différentes (le β -carotène et le lycopène) a été réalisée avec les conditions chromatographiques précédemment décrites. La valeur du nombre d'onde v_1 permet de caractériser la longueur de la chaîne, et donc le type de caroténoïde. En effet, comme le montre la figure 18, nous observons un déplacement de la bande v_1 de 10 cm⁻¹ entre le β -carotène et le lycopène.

On peut, d'après les spectres de la figure 18, faire quelques commentaires concernant cette technique.

Le spectre du solvant C.H.L.P. seul présente un assez bon rapport S/B. En présence d'un caroténoïde, ce rapport se dégrade à cause, sans doute, de la superposition de la bande de fluorescence. Une dégradation supplémentaire du rapport S/B est observée après soustraction des bandes du solvant. Nous voyons donc que si la fluorescence des caroténoïdes améliore la détectivité en spectrométrie monocanale, elle est préjudiciable en détection multicanale. Des temps d'intégration plus longs et l'amélioration du couplage colonne-spectromètre devraient sans doute renforcer les résultats.



Figure 18 : Séparation C.L.H.P. du β-carotène et du lycopène synthétique et détection en spectrométrie Raman multicanale. Temps d'intégration = 1 s ; λext = 488 nm ; P = 100 mw ; débit = 2 ml/mn ; masse injectée = 20 ng par carotenoïde.

-53-

VI - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux ont permis la mise au point d'un système chromatographique simple et rapide. La phase stationnaire ainsi que la phase mobile utilisées permettent à la fois d'obtenir une séparation efficace pour les caroténoïdes polaires comme pour les caroténoïdes moins polaires.

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, la détection utilisant la diffusion Raman de résonance permet d'améliorer la limite de détection des caroténoïdes après séparation C.L.H.P. d'un facteur 10 par rapport aux techniques conventionnelles d'absorption UV-visible. Nous avons pu détecter jusqu'à 50 \times 10⁻¹² g dans les conditions optimales.

Nous pensons qu'il est possible d'améliorer encore la limite de détection par les techniques suivantes que nous proposons comme suite du travail présenté :

- Utilisation d'une micro-colonne.

L'analyse de trace se fait généralement à l'aide de micro-colonnes ayant de faibles diamètres intérieurs (100 microns environ). En effet, ces colonnes limitent les dilutions de l'échantillon. Par exemple, notre colonne de diamètre intérieur de 4,6 mm entraîne, toutes choses égales par ailleurs, une dilution 2000 fois plus importante qu'une colonne de 100 microns (la dilution est proportionnelle au carré du diamètre). On voit donc là l'un des intérêts du développement récent des micro-colonnes remplies. L'utilisation de ce type de colonne nécessite des capacités de cellules de détection plus faibles que celles présentées dans ce chapitre pour éviter ainsi les problèmes de dilution au niveau de la cellule. L'emploi d'une micro-colonne de diamètre égale à 100 microns devrait permettre de détecter environ 25 femtogrammes de caroténoïdes.

- Utilisation de la technique SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy).

Il est possible d'améliorer la sensibilité de notre technique au niveau de la détection. Si l'effet Raman de résonance permet d'augmenter la section efficace de diffusion de plusieurs ordres de grandeur, et par ce fait d'augmenter l'intensité de diffusion, il existe d'autres phénomènes qui provoquent le même effet. Nous citerons la technique SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy). En effet, cette technique permet d'augmenter la section efficace d'un molécule par son adsorption sur une électrode d'argent ou en présence d'un colloïde d'argent. Le spectre Raman est ainsi fortement intensifié. Nous avons superposé cette technique à la spectroscopie Raman de résonance. Ceci nous a permis d'augmenter l'intensité de la bande v_1 du β -carotène d'un facteur 500 vis à vis de l'intensité de cette même bande obtenue en spectroscopie Raman de résonance pure (figure 19).



Figure 19 : Bande v₁ (1525 cm⁻¹) du β-carotène.
A - dans une solution de méthanol (6 × 10⁻⁷ M)
B - dans une solution de méthanol en présence d'un colloide d'argent ; la solution a été diluée 500 fois par rapport à la sol. A.
λext = 488 nm ; P = 150 mw. R.D. Freeman [30] et A. Berthod [31] ont déjà imaginé un système de dérivation post-colonne qui permet de mélanger des colloïdes d'argent avec l'éluant. Pour des raisons technologiques, nous n'avons pas effectué ce montage mais dans notre cas, ce système permettrait d'améliorer la limite de détection d'un facteur 500. On peut donc envisager de détecter par cette technique environ 100 femtogrammes de caroténoïdes, soit 200 attomoles. Dans ce cas, le gain de sensibilité serait de 5000 vis à vis de la détection en absorption UV-visible.

Des techniques aussi sensibles permettraient de faire l'analyse sur de très faibles quantités de caroténoïdes injectées. L'étude des caroténoïdes du tissu humain serait certainement une des applications.

CHAPITRE II

Caractérisation des caroténoïdes du plasma sanguin.

CHAPITRE II

Caractérisation	des	caroténoïdes	du	plasma	sanguin
-----------------	-----	--------------	----	--------	---------

I - PRESENTATION DES CHROMATOGRAMMES DES CAROTENOIDES	
DU PLASMA SANGUIN	62
II - <u>CARACTERISATION</u>	66
1 - Spectroscopies UV-visible et Raman de résonance	66
2 - Action des acides	79
3 – Comparaison à des composés standards	82
4 - Indexation des pics	83
III - CONCLUSION	88

CHAPITRE II

Caractérisation des carotenoïdes du plasma sanguin.

Aucune étude complète sur la caractérisation des caroténoïdes présents dans le plasma sanguin n'existe dans la littérature. Généralement les auteurs portent leur attention sur les carotènes ; les composés oxygènés, regroupés sous le terme de xanthophylles, n'étant pas individualisés.

Dans le but de connaître avec plus de précision la structure des caroténoïdes présents dans le plasma sanguin, nous avons entrepris leur séparation et leur caractérisation.

Différentes méthodes ont été utilisées pour mener à bien cette étude. Les spectrométries d'absorption UV-visible et Raman de résonance ont permis d'apporter des informations essentielles après la séparation C.L.H.P. . D'autres techniques, utilisant des réactions caractéristiques des caroténoïdes ou la comparaison avec des standards, ont permis de renforcer les hypothèses émises.

I - <u>PRESENTATION DE CHROMATOGRAMMES DES CAROTENOIDES DU</u> PLASMA SANGUIN.

Les caroténoïdes sont extraits du plasma sanguin en deux étapes. Un premier solvant, généralement le méthanol, fait précipiter les protéines et solubilise les caroténoïdes et les vitamines. Un second solvant (hexane) est ensuite utilisé pour extraire les caroténoïdes de la phase hydroalcoolique. La solution d'hexane est évaporée par un courant d'azote. Les caroténoïdes sont ensuite repris par la phase mobile C.L.H.P., ou un solvant miscible avec elle, avant d'être injectés dans le système chromatographique (voir détails de l'extraction au chapitre III).

La figure 20 représente à la fois une comparaison entre le profil chromatographique du plasma prelevé chez différentes personnes mais aussi une comparaison entre les deux techniques de détections décrites au chapitre précédent (Raman de résonance et absorption visible) utilisées pour la détection d'un même plasma.



Figure 20 : Séparation C.L.H.P. des carotenoïdes du plasma sanguin. A - Détection Raman de résonance (trois plasmas différents).

B - Détection UV-visible.

Débit = 1,5 ml/min ; 60 μ l injectés correspondant à 1 à 12 ng selon le type de carotenoïde .

-63-

Les chromatogrammes (figure 20-A) ont été choisis parmi de nombreux plasmas analysés. Nous pouvons remarquer que, si la concentration relative de chaque caroténoïde varie très fortement d'un plasma sanguin à un autre, le nombre total de caroténoïdes reste constant. Cette constatation nous a permis d'effectuer, pour chaque étape de la caractérisation, des analyses sur des plasmas d'origine différente.

On peut remarquer une grande analogie entre les chromatogrammes UV-visible et Raman, bien que l'intensité relative de chaque pic ne soit pas respectée quand on compare l'un et l'autre ; ceci provient du fait que ces deux spectroscopies utilisent des phénomènes physiques différents. Mais il est important de noter qu'aucune information n'est perdue lors de l'utilisation du détecteur Raman avec une raie excitatrice laser à 488 nm par rapport à une détection d'absorption visible à 450 nm. Par contre, comme nous l'avons observé au premier chapitre, le rapport S/B du chromatogramme est amélioré par l'utilisation du détecteur Raman.

Si, toutefois, les différences entre une détection en absorption à 450 nm et une excitation laser à 488 nm sont minimes, des différences plus importantes apparaissent lors de l'utilisation d'autres longueurs d'onde d'excitation : nous avons analysé ses différences :

* Influence de la longueur d'onde d'excitation laser

L'intensité Raman de résonance dépend très fortement du choix de la longueur d'onde excitatrice et des propriétés d'absorption du caroténoïde car le profil d'excitation est plus étroit que la bande d'absorption (cf. Annexe). Ce phénomène se traduit sur les chromatogrammes par de fortes variations d'intensité des pics selon les différentes longueurs d'onde excitatrices (figure 21-A). Par exemple, nous pouvons remarquer que le choix de la raie verte du laser à argon (514,5 nm) exalte d'une façon sélective 1 seul pic attribuable au lycopène tandis que la raie violette (457,9 nm) favorise la détection des premiers pics.

* Influence de la longueur d'onde d'observation

Le détecteur UV-visible est à la longueur d'onde variable (200 à 700 nm); on peut ainsi faire varier facilement la longueur d'onde d'observation. Cependant, comme les bandes d'absorption UV-visible des caroténoïdes sont très larges, les modifications de spectre observées quand la longueur d'onde d'observation varie de 430 à 490 nm ne sont pas significatives (figure 21-B). Les chromatogrammes correspondant à des longueurs d'onde d'observation supérieures à 500 nm n'ont pas été présentés car ceux-ci présentent un rapport signal sur bruit trop faible.



Figure 21 : Séparation C.L.H.P. des carotenoïdes du plasma sanguin.
 A - Influence de la longueur d'onde d'excitation.
 B - Influence de la longueur d'onde d'observation.

Débit = 1,5 ml/min ; 60 μ l injectés (1 à 12 ng suivant le type de caroténoide).

La spectrométrie Raman de résonance présente ici un avantage de sélectivité sur la spectrométrie d'absorption. Nous verrons par la suite que cet avantage peut être utilisé pour quantifier les caroténoïdes d'un mélange sans passer par la technique de séparation C.L.H.P..

II - CARACTERISATION

Lors de l'analyse de nombreux échantillons de plasma sanguin, nous avons toujours constaté que le nombre de caroténoïdes restait constant (15 caroténoïdes). Deux techniques spectroscopiques ont été utilisées ainsi qu'une technique chimique et la comparaison avec des standards. Nous présentons les deux techniques spectroscopiques simultanément car ce sont des spectroscopies complémentaires qui permettent d'étudier les niveaux électroniques des caroténoïdes.

1 - Spectroscopies UV-visible et Raman de résonance

Comme nous l'avons vu au premier chapitre, le détecteur UV-visible de type multicanal permet d'obtenir le spectre UV-visible instantanément après la séparation C.L.H.P..Nous avons donc utilisé ce détecteur dans la séparation des caroténoïdes du plasma sanguin.

Le spectre Raman de résonance ne permet pas de différencier les caroténoïdes de même longueur de chaîne (cf annexe). Par contre, les profils d'excitation (intensité d'une bande en fonction d'une raie excitatrice) donnent des indications sur la position des bandes d'absorption électroniques. Cette technique est spécifique au cas des caroténoïdes et permet de déterminer la position de la première transition vibronique O-O. La spectroscopie d'absorption n'a pas cette spécificité car les informations sont parfois cachées à l'intérieur des bandes d'absorption larges.

Nous présentons sur la figure 22, les chromatogrammes à 457 nm et 325 nm obtenus par le détecteur UV-visible de type multicanal pour un plasma sanguin. La figure 23 représente la cartographie de la séparation correspondante ; 20 composés différents peuvent être observés par cette technique.

Par la technique Raman de résonance, nous avons étudié la variation de profil du chromatogramme en fonction de la longueur excitatrice en choisissant le mode v_2 (figure 24). Cette étude nous a permis de déterminer les profils d'excitation de ce mode pour chaque caroténoïde du plasma sanguin. Ceux-ci sont comparés à des profils de composés standards.

Il est à signaler que le plasma étudié par spectrométrie d'absorption UV-visible est d'origine différente de celui étudié par spectrométrie Raman de résonance. Pour les spectres d'absorption UV-visible, un logiciel informatique



Figure 22 : Détection UV-visible de type multicanale; chromatogrammes sélectionnés à 475 nm et 325 nm. Débit = 1,5 ml/mn ; injection de 80 μl ; masses injectées = 6 à 60 ng.



Figure 23 : Représentation cartographique.



Figure 24 : Variation de la longueur d'onde d'excitation. Débit = 1,5 ml/mn ; volume injecté = 60 μl ; masses injectées de 1 à 12 ng.

permet de travailler en détail les informations chromatographiques. Les profils d'excitation sont obtenus après décomposition des massifs des chromatogrammes en composantes gaussiennes (voir Annexe expérimentale).

Les profils d'excitation et spectres d'absorption UV-visible sont présentés simultanément (fig. 25 à 32).

De ces résultats, nous pouvons tirer les interprétations suivantes :

* Les spectres d'absorption UV-visible

- Comme indiqué en annexe, les maxima d'absorption peuvent être corrélés au nombre de doubles liaisons conjuguées de la chaîne principale. Ainsi le composé 9 possède 11 doubles liaisons conjuguées, le composé 16, 7 doubles liaisons conjuguées et le composé 17, 5 doubles liaisons conjuguées. Les autres caroténoïdes possèdent 9 doubles liaisons conjuguées.

- Le décalage vers le bleu (\approx 8 nm) du spectre d'absorption des pics (1), (2) et (4) par rapport aux composés à 9 doubles liaisons conjuguées ainsi que la structure fine prononcée des spectres indiquent une structure de type époxyde (figure 25 et 26).

- La structure très fine des pics (9), (16) et (17) indique l'absence de groupements terminaux cycliques pour ces composés.

- Tous les caroténoïdes du plasma sanguin ont un spectre d'absorption possédant une stucture fine plus ou moins prononcée. On peut donc éliminer les composés ayant un groupement terminal cyclique avec une fonction de type céto en position 4 du cycle. Ce type de composé ne présente aucune structure fine en absorption (cf annexe).

- Aucun caroténoïde de conformation "<u>cis</u>" n'est présent dans le plasma sanguin puisque aucun des spectres enregistrés ne présente la bande caractéristique de la structure de type "<u>cis</u>" à haute énergie (cf annexe).



Figure 25 : Spectres d'absorption et profils d'excitation des pics (1) ; (2) ; (3) .






Figure 27 : Spectres d'absorption et profils d'excitation des pics 6 et 7 .



Figure 28 : Spectres d'absorption UV-visible et profils d'excitation des pics 8 et 9 .



Figure 29 : Spectres d'absorption UV-visible et profils d'excitation des pics (1) et (1) .

-75-



Figure 30 : Spectres d'absorption UV-visible et profils d'excitation des pics (12) et (13) .

-75-



Figure 31 : Spectres d'absorption des composés (16) et (17).



Figure 32 : Spectres d'absorption des composés (15) et (18) .

* Les profils d'excitation

- Les maxima des profils d'excitation correspondent à la bande O-O du spectre d'absorption (cf annexe et figures 25 à 30). On observe parfois un léger décalage vers le rouge du profil d'excitation par rapport à la bande O-O du spectre d'absorption. Ce phénomène, généralement observé pour les caroténoïdes, vient du fait que d'autres niveaux excités interviennent faiblement dans la résonance [32].

- Trois types de profils sont observables ; ils sont caractéristiques :

 1 - Des composés à groupement cyclique faiblement conjugué; le profil est assez large avec un maximum situé entre 477 et 482 nm (figure 30 par exemple).

bande Chromato & C+R

λ d'excita

- 2 Des composés époxydes ; le profil est fin avec un maximum vers 470 nm (figure 25).
- 3 D'un composé à 11 doubles liaisons conjuguées ; le profil possède un maximum situé à 507 nm (figure 28).

Les profils d'excitation des composés (16) et (17) n'ont pas été déterminés, cependant nous pouvons remarquer leur exaltation sur le chromatogramme obtenu à l'aide d'une longueur d'onde d'excitation proche du domaine UV (413 nm du laser au Kr^{+} - figure 24).

Les résultats de ces deux techniques permettent d'indexer, ou au moins de donner une hypothèse de structure à chaque composé détecté. Il reste toutefois des incertitudes, en particulier sur les composés oxygénés de type "époxyde".

Pour renforcer nos hypothèses sur ce type de composé, nous avons utilisé une réaction chimique qui lui est caractéristique.

2 - Action des acides

Nous pouvons, par une acidification, modifier la structure des époxycaroténoides suivant le schéma :



-90-

Cette réaction est très sélective vis à vis des composés de type "époxy" sans modifier les autres caroténoïdes.

Les différences de structure entre le 5,6-époxyde et le 5,8-époxyde peuvent être observées en spectroscopie d'absorption.

Le composé B (oxyde furanoïque) a une double liaison conjuguée en moins que le composé A : en conséquence, le spectre d'absorption du composé B est déplacé vers le bleu par rapport au spectre du composé A. A titre d'exemple, la figure 33 représente les spectres UV-visible de la violaxanthine et de l'auroxanthine [33].



Figure 33 : Spectres d'absorption de la violaxanthine (----) et de l'auroxanthine (---) d'après [33].

Ces différences peuvent être observées en séparation C.L.H.P. avec une détection Raman. Pour une longueur d'onde, il y a effet de résonance dans le cas de composés de type A. A cette même longueur d'onde, après acidification, l'exaltation est beaucoup plus faible dans le cas de composés de type B. Deux séparations chromatographiques consécutives permettent ainsi d'indexer les composés réagissant à la réaction d'acidification.

Pour effectuer cette réaction sur les éventuels époxycaroténoïdes du plasma sanguin, nous avons acidifié, lors de l'extraction, la solution méthanolique par quelques gouttes d'acide chlorhydrique 0,1 M, suivant les indications de Curl [34]. Nous avons, par ce moyen, modifié la structure des époxycaroténoïdes du plasma sanguin.

Nous observons en chromatographie C.L.H.P. une disparition des pics attribués aux époxydes après une attaque acide lors de l'extrait des caroténoïdes du plasma sanguin (figure 34).

La figure 34 permet d'observer la diminution franche de l'intensité des pics (2), (4) et (5). L'intensité du pic n°(1) semble diminuée.

A la vue de ces résultats, nous pouvons avancer que les composés (2) et (4) ont une structure présentant un ou deux groupements de type 5,6-époxyde sur les cycles terminaux. Cette constatation est moins évidente pour le composé (1); son intensité semble perturbée par l'apparition d'un nouveau composé lors de l'attaque acide.

Cette manipulation permet aussi de constater que tous les autres composés n'ont pas de structure présentant un groupement "époxyde". Il subsiste néanmoins une incertitude sur le composé (5) qui ne présente pas de spectre d'absorption, ni de profil d'excitation caractéristique d'un caroténoïde de type "époxyde" mais qui semble réagir à l'attaque acide.



Figure 34 : Comparaison des chromatogrammes obtenus sans attaque acide (A) et avec attaque acide (B). $\lambda_0 = 488 \text{ nm}$; débit : 2 ml/min ; 60 µl injectés ; masses injectées de 1 a 12 ng.

3 - Comparaison à des composés standards

Cette technique permet de comparer le temps de rétention des caroténoïdes de structure inconnue à des composés standards de structure connue. La fiabilité de cette méthode n'est pas absolue ; deux composés peuvent avoir des structures différentes et ne pas être séparés dans nos conditions chromatographiques. Cependant, elle peut être un complément des autres techniques. L'attribution des pics grâce à des composés standards est une opération longue et qui nécessite un grand nombre de ces composés à l'état pur, ce qui est relativement difficile à obtenir. En effet, ces composés sont obtenus par différentes extractions sur des végétaux ou des fruits. Ces manipulations sont rendues délicates par le manque de stabilité de ces composés.

Nous avons été conduits à effectuer le profil d'excitation de certains caroténoides de référence, que nous possédons, pour ainsi les comparer aux résultats obtenus sur le plasma sanguin.

4 - Indexation des pics

Les quatres techniques citées précédemment permettent de déterminer avec une bonne précision la structure de la plupart des caroténoïdes du plasma sanguin. Les données de la littérature sur l'analyse physico-chimique (absorption UV-visible, RMN, masse) des caroténoïdes sont assez importantes [35-42], ce qui a permis des comparaisons avec nos résultats. Toutes nos données, ainsi que celles tirées de la littérature, sont rassemblées dans le tableau ci-après.

A partir de ce tableau, il est possible de faire certaines remarques :

* Comme nous l'avons déjà signalé, une exaltation des pics (16) et (17), respectivement attribuables aux ζ -carotène et phytofluène, peut être remarquée en détection Raman (raie excitatrice 413,1 nm) sur la figure 24. Cette longueur d'onde coïncide avec la bande O-O du ζ -carotène (16) (figure 31) mais par contre ne coïncide pas du tout avec une bande électronique du phytofluène (17) (figure 31). L'apparition de ce pic est probablement due à la forte fluorescence de ce type de composé [38-39].

* L'attribution exacte ne peut pas être faite pour les pics (1) et (2) mais on peut avec certitude avancer qu'il s'agit de composés de type "diépoxyde" à chaine principale comportant 9 doubles liaisons conjuguées. Trois structures sont proposées pour les pics (1) et (2). La probabilité pour que l'un des deux pics soit la violaxanthine est importante puisque ce caroténoïde est présent en forte quantité dans les végétaux verts consommés par l'homme [40].

	Temps de rétention	Temps du standard utilisé	Maximum observé	Maximum du standard • Réf littérature	Profil observ i	Profil standard	test acide	Nom	Accord : X désaccord : O
1.	3.9'		118 - 110 - 468	417 - 440 - 468	470	Réf. [37]	~	Violaxanthine	xx
2	4,7*		118 - 110 - 468	417 - 440 - 468	472	Réf. [37]	P	Diépoxyde-8-carotèn Diépoxydecrypto.	XXX
3	5.3'		454 - 485	456 - 487 y-carotène	482		N	y-carotène Rubixanthine	xx
•	6'		444 - 470	444 - 472	472		P	5,6 époxyde- B-carolène	xxx
3	7,05'	7'	422 - 445 - 472	421 - 443 - 471	475	475	P	Lutéine	хххо
ô	8,1'	8,1'	448 - 475	448 - 476	475	475	N	Zeaxanthine	xxxx
7	8,8'		418 - 447 - 470		476		N		
8	9,1'		448 - 475		475		N		1
9	9,7'	9,6'	468 - 499	469 - 500	502	502	N	Lycopène	xxxx
10	<u>. 11</u>	11'	428 - 447 - 470	426 - 448	480	480	N	<i>isocryptoxanthine</i>	xxxx
11	11,7'	11,7'	450 - 476	450 - 478	480	480	N	B-cryptoxonthine	xxxx
12	16'	16'	421 - 446 - 472	421 - 446 - 472	475	475	N	a-carotène	xxxx
13	17'	16,9'	448 - 475	448 - 476	480	480	N	β-carotène	xxxx
14	2,7'		325	Réf. [20] 325				Acide rétinoique	xx
15	3,81'	38'	325	Réf. [20] 325				Rétinol	
16	147		378 - 401 - 425	379 - 401 - 425				C-carotène	XX
17	17,6'		331 - 348 - 367	331 - 348 - 366				Phytofluène	xx
18	18.9'		324	Réf. [36] 325	•			Rétinyl palmitate	XX
19	7,3'		< 300	Réf. [20] 298				Y -locopherol	xx
23	8.3'		< 300	Réf. (20) 292				a-tocophérol	XX

* Le nombre de croix correspond au nombre de tests en accord (temps de rétention, max. absorption, max. profil, réaction acide). Le symbole (O) indique un test en désaccord.

-84-

* Le pic (3) ne peut pas être attribué avec certitude à la vue de nos données ; nous pouvons supposer toutefois que ce composé présente dix doubles liaisons conjuguées sur la chaine principale. En effet, celui-ci présente un spectre d'absorption et un profil d'excitation dont les maxima permettent d'établir un nombre de doubles liaisons compris entre 9 et 11. Le déplacement du spectre UV-visible vers les grandes longueurs d'onde est remarqué sur le chromatogramme obtenu à 514,5 nm ; en effet le pic (3) est favorisé comme l'est le pic (9) qui est attribué au lycopène (figure 21 et Figure 24). Parmi les structures possibles, nous proposons le γ -carotène. Il faut signaler que ce composé accompagne généralement le β -carotène dans les végétaux. De plus, la disymétrie de la structure du γ -carotène semble certainement indiquer une polarité comparable aux xanthophylles.

* La spectrométrie UV-visible à détection multicanale a permis de retrouver des composés non caroténoïdiques (vitamines A et E, γ -tocopherol, un acide rétinoïque et le rétinyl palmitate) identifiés dans le plasma sanguin. Ces composés ne nous intéressent pas pour cette étude mais permettent de confirmer l'intérêt de cette technique d'identification.

* Si le résultat de l'attaque acide est en accord avec les résultats spectroscopiques pour les pics (2) et (4), les données sont tout à fait contradictoires pour le pic (5). Ce composé qui correspond avec une forte certitude à la lutéine semble réagir à l'acidification de la solution. Ce pic serait peut-être la composante de deux caroténoïdes ; la lutéine et un caroténoïde de type époxyde.

* Lors de l'attaque acide, on observe l'apparition d'un nouveau pic (figure 34); celui-ci correspond certainement aux composés formés lors de la réaction. Ce ou ces composés se situent près du pic (1), ce qui ne nous permet pas de tirer des conclusions claires en ce qui concerne l'intensité du pic (1).

Enfin, nous présentons sur les figures 35 et 36, la structure développée des caroténoïdes détectés.



Figure 35 : Structures développées des différents composés détectés.

-86-



Figure 36 : Structures développées des différents composés détectés.

-87-

III - CONCLUSION

Cette étude de caractérisation nous a permis de déterminer avec une bonne précision la nature de la plupart des caroténoïdes extraits du plasma sanguin. Six caroténoïdes avaient déjà été indentifiés par d'autres auteurs (β-carotène, α-carotène, lycopène, cryptoxanthine, lutéine et zéaxanthine, ces deux derniers étant mal séparés) [17].

Dans cette étude, 9 composés ont été déterminés de manière certaine et 4 sont fortement présumés. En outre, 3 rétinoïdes et 2 composés à chaine saturée ont pu être également mis en évidence. Il reste toutefois quelques incertitudes sur les composés les plus polaires. Aussi, il n'est pas impossible que plusieurs composés soient présents dans un pic chromatographique.

Il existe actuellement une technique capable d'être plus sélective que la chromatographie C.L.H.P.. Cette nouvelle technique chromatographique appelée C.F.S. (chromatographie avec des fluides à l'état supercritique) permet d'obtenir un nombre de plateaux par mètre plus important que la C.L.H.P. à température ambiante. Récemment, N.M. Frew [41] a utilisé la C.F.S. pour améliorer la séparation des caroténoïdes polaires (xanthophylles) dans les végétaux. Le second avantage de cette technique est sa facilité de couplage à un spectromètre de masse. Ce couplage n'a pas encore été utilisé pour les caroténoïdes mais pourrait, dans notre cas, éliminer les incertitudes sur les structures proposées.

Toutefois, nos connaissances structurales des caroténoïdes du plasma sanguin sont suffisantes pour envisager une quantification de la majorité des caroténoïdes présents. Nous avons ainsi entrepris la quantification que nous présentons dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III

Quantification des caroténoides du plasma sanguin

CHAPITRE III

Quantification des caroténoïdes du plasma sanguin

I - DOSAGE DES DIFFERENTS CAROTENOIDES APRES SEPARATION

<u>С.І.Н.Р.</u>	97
A - <u>Mise au point de la quantification par des standards</u>	97
1 - Méthode de l'étalon interne	97
2 - Méthode de l'étalon externe	98
3 - Choix du type d'étalonnage	99
4 - Application à des mélanges standards	102
a) Evaluation des facteurs de réponses relatifs (FR)	102
b) Quantification de mélanges standards	103
B – Quantification des carotenoïdes du plasma sanguin	104
1 – Extraction des caroténoïdes du plasma sanguin	105
a) Extraction par des solvants organiques	105
b) rôle d'une saponification	106
c) Influences extérieures : lumière, air et conditions	
extérieures	107
d) influences des anticoagulants	109
e) Rendement d'extraction	110
2 - Evaluation de la reproductibilité du système de	
Quantification	112
3 - Quantification de différents plasmas sanguins	116

II - QUANTIFICATION DES CAROTENOIDES TOTAUX	118
1 - <u>Description de la technique</u>	118
2 - <u>Choix et mise au point de l'étalonnage</u>	119
3 - <u>Extraction</u>	122
III - <u>COMPARAISON DES TECHNIQUES MISES AU POINT : ETUDE DE</u>	
<u>HUMAIN (Etude préliminaire)</u>	124
1 - <u>Description de l'étude</u>	125
2 - <u>Résultats</u>	125
3 - <u>Interprétation des résultats</u>	127
a) Comparaison des techniques de quantification	127
b) Evolution circadienne des caroténoïdes	129
IV - <u>CONCLUSION</u>	131

CHAPITRE III

Quantification des caroténoïdes du plasma sanguin

Il existe déjà dans la littérature, des travaux faisant l'objet de la quantification des caroténoïdes du plasma sanguin par la technique de séparation C.L.H.P. couplée à un détecteur d'absorption visible [18]. Cependant ces études sont très fragmentaires et ne concernent bien souvent que les composés non polaires (carotènes). Nous avons voulu, en utilisant la spectrométrie Raman de résonance en tant que détection, quantifier l'ensemble des caroténoïdes avec le maximum de précision.

Pour mener à bien cette étude, nous avons été amenés à étudier séparément les différents paramètres (extraction, choix des étalons, reproductibilité des mesures...) pouvant influencer les résultats.

Les méthodes de quantification individuelles par absorption visible ou Raman de résonance, après séparation C.L.H.P., sont sans doute assez lourdes à mettre en oeuvre dans le cas d'une étude systématique des caroténoïdes du plasma sanguin à l'intérieur d'une population. C'est pour cela que, si on ne cherche à déterminer que la quantité totale des caroténoïdes, la méthode globale par spectrométrie Raman de résonance, telle qu'elle a été présentée dans l'introduction de ce mémoire, permettra un gain de temps considérable. Des résultats obtenus à partir de la méthode C.L.H.P., il est maintenant possible de discuter les résultats obtenus par la méthode globale. Cette comparaison est faite à l'occasion d'une étude de l'évolution circadienne des caroténoïdes chez l'être humain.

I - DOSAGE DES DIFFERENTS CAROTENOIDES APRES SEPARATION C.L.H.P.

Comme nous l'avons vu au chapitre II, le spectromètre RAMAN en tant que détecteur C.L.H.P. permet d'obtenir les mêmes informations que le détecteur UV-visible mais avec une sélectivité et une limite de détection bien meilleure. Nous avons donc utilisé ce détecteur pour effectuer la quantification des caroténoïdes. Compte tenu des profils d'excitation déterminés dans le chapitre précédent, la longueur d'onde excitatrice 488 nm nous semble la plus adaptée pour effectuer ce type de mesure.

L'aire des différents pics des chromatogrammes est déterminée après décomposition en bandes de profil gaussien (voir annexe expérimentale) ; l'étape suivante consiste à trouver la quantité (masse) ou la concentration des composés correspondant à la surface de chaque pic.

A - Mise au point de la quantification par des standards

Deux techniques d'étalonnage peuvent être utilisées : la méthode de l'étalon interne et la méthode de l'étalon externe.

1 - Méthode de l'étalon interne

Cette technique consiste à ajouter une masse connue d'un composé standard ne correspondant pas à un composé présent dans le mélange à analyser. Ce composé est choisi généralement pour sa structure proche des composés à quantifier dans le but d'observer son pic chromatographique voisin de ceux des composés à analyser sans pour cela qu'il se superpose à l'un d'eux.

Les rapports des aires mesurées entre les composés et l'étalon interne ne donnent pas directement les quantités des composés. En effet, il est relativement rare qu'un détecteur fournisse une réponse identique pour tous les composés d'un mélange et ce n'est ni le cas du détecteur Raman ni celui du détecteur UV-visible. Aussi, pour chaque composé, il est nécessaire de déterminer le facteur de réponse f qui est égal au rapport de la concentration (ou de la masse) d'un composé sur l'aire chromatographique de ce composé.



La manière la plus rapide de déterminer la valeur de ces facteurs consiste à analyser un mélange synthétique contenant une masse connue de chacun des composants du mélange à analyser. On établie ainsi la relation suivante pour chaque composé i ainsi que pour l'étalon interne E :

$$mi = fi * Ai$$

 $me = fe * Ae$

(7)

avec :

mi = masse du composé i à déterminer.
me = masse de l'étalon interne E.
Ai = aire correspondant à la masse mi.
Ae = aire correspondant à la masse me de l'étalon interne.
fi = facteur de réponse reliant aire et masse pour le détecteur utilisé.
fe = facteur de réponse reliant aire et masse de l'étalon interne pour le détecteur utilisé.

Les différents facteurs de réponse f peuvent ainsi être déterminés. Si l'on connait tous les facteurs fi, la masse mi dans un échantillon peut être directement calculée en ajoutant à cet échantillon une quantité connue me de l'étalon interne.

$$mi = \frac{Ai}{Ae} \times me \times \frac{fi}{fe}$$
 (8)

Cette méthode permet de s'affranchir de la variabilité due à l'injection ou à l'extraction. En effet, l'étalon interne est généralement ajouté avant la première phase d'extraction. Il est donc placé dans les mêmes conditions opératoires que les autres caroténoïdes à quantifier, ce qui permet de corriger systématiquement les erreurs de dilutions, de concentrations, les pertes au cours de l'extraction ainsi que les variations du volume d'injection.

2 - Méthode de l'étalon externe

Cette méthode de quantification s'effectue en deux étapes. La première consiste à analyser l'échantillon additionné de composés standards qui sont identiques à chacun des composés constituant l'échantillon. La seconde étape est l'analyse de l'échantillon seul. La différence des aires chromatographiques entre les deux analyses peut être corrélée, pour chaque composé, à la masse contenue dans l'ajout ; une extrapolation entre aire réelle et masse du composé à déterminer peut ainsi être obtenue.

On établie les relations suivantes en sachant que la quantité à déterminer est mi :

* avec ajout d'étalon :

$$(mi + mie) = fi \times AT = fi \times (Ai + Aie)$$
 (9)

où :

mie = masse d'étalon correspondant au composé i.

AT = aire totale lue.

Aie = aire correspondant à la masse d'étalon i.

* sans ajout :

$$mi = fi * Ai \tag{10}$$

De ces relations (9) et (10), la masse mi peut être déterminée :

$$mi = \frac{mie \star Ai}{(AT - Ai)}$$
(11)

Cette technique est à priori moins précise que la précédente car les conditions analytiques (dilution et injection) peuvent varier d'une analyse à une autre et aucune correction n'est possible.

3 - Choix du type d'étalonnage.

Comme nous l'avons vu précédemment, les deux types d'analyses nécessitent l'utilisation d'échantillons standards. La précision des résultats dépend en grande partie de la pureté de ces composés. Pour notre analyse, nous avons utilisé six composés étalons purs correspondant aux six caroténoides majoritaires du plasma sanguin. Ces composés ont été mis à notre disposition par la Société Hoffmann-La Roche ; il s'agit du β -carotène, de l' α -carotène, du lycopène, de la cryptoxanthine, de la lutéine et de la zeaxanthine. La difficulté de la méthode de l'étalon interne réside dans le choix même du composé de référence. En effet, il doit avoir les mêmes propriétés physicochimiques, tout en étant élué à un temps différent des autres composés du mélange à étudier.

Dans notre cas, compte tenu du nombre important de constituants, le seul choix possible est un composé dont le temps de rétention est supérieur à celui du β -carotène qui est le dernier composé élué. Le diméthyl- β -carotène (carotène de synthèse), dont la formule développée est présentée ci-dessous, a déjà été utilisé par W.J. Driskell [43], pour quantifier l'a et le β -carotène dans le sérum.



DIMETHYL-B-CAROTÉNE

Cet étalon est effectivement élué après le β -carotène mais son manque de stabilité (ce composé n'est stable que deux semaines à - 70°C) rend son utilisation très délicate. De plus, sa préparation en faible quantité demande des synthèses élaborées. Il ne peut être exploité à grande échelle.

Le décapréno- β -carotène, autre caroténoïde de synthèse dont la formule développée est représentée ci-dessous, a également été utilisé pour d'autres quantifications [40-44].



DECAPRÉNO-β-CAROTÉNE

La figure 37 représente l'élution de ce composé dans nos conditions avec un mélange synthétique de caroténoïdes. Cette solution n'a malheureusement pas pu être retenue car le pic du décapréno- β -carotène est trop éloigné de celui du β -carotène dans le chromatogramme, ce qui engendre une augmentation de 60 % de la durée d'analyse et une déformation importante du pic d'élution de ce composé, ce qui favorise les erreurs de quantification.



Figure 37 : Séparation C.L.H.P. d'un mélange de standards. Le pic en pointillés correspond au pic de la cryptoxanthine. λext = 488 nm ; débit = 1,5 ml/min ; volume injecté = 60 μl.

De plus, ce composé synthétique est très instable, ce qui limite fortement son utilisation. Bien que plus sensible aux erreurs de dilution et d'injection, nous avons préféré utiliser une technique par étalonnage externe.

Les mesures n'ont pas été effectuées comme nous l'avons indiqué précédemment ; l'ajout de standard est uniquement fait pour le β -carotène composé parfaitement résolu pour notre séparation. L'utilisation de facteurs de réponse relatifs entre chaque composé du mélange et le β -carotène évite la surcharge d'autres composés synthétiques dans l'échantillon. Les facteurs relatifs (FR) sont obtenus en calculant les rapports entre les facteurs individuels de chaque composé et celui du β -carotène ; ils ont été déterminés à partir de chromatogrammes obtenus après injection d'un mélange synthétique de caroténoïdes de masses connues. On établie ainsi la relation suivante :

$$mi = fi * Ai$$

$$m \beta - carotène = f \beta - carotène * A \beta - carotène \qquad (12)$$

$$m \beta - carotène = f \beta - carotène * Ai$$

L'utilisation des relations (11) et (12) permet de déterminer les différentes masses désirées :



Avant d'appliquer cette méthode pour la quantification d'un certain nombre de plasmas, nous avons voulu évaluer sa précision.

4 - Application à des mélanges standards

a) Evaluation des facteurs de réponse relatifs (FR)

Les facteurs de réponse relatifs sont déterminés entre les cinq caroténoïdes choisis et le β -carotène. Ces facteurs, qui ne sont en fait qu'une représentation des profils d'excitation, dépendent de la longueur d'onde excitatrice utilisée. Dans notre cas, seule la raie 488 nm du laser Ar^+ a été utilisée. Nous présentons dans le tableau suivant les valeurs déterminées à partir de mesures expérimentales et de la relation (12).

: Lutéine : :	zéaxanthine	: Lycopène :	cryptoxanthine	: : α-carotène :
FR = 0,52 :	FR = 1,08	: FR = 1,30 :	FR = 1,52	: $FR = 0,43$
$\sigma = 2 \times 10^{-2}$	$\sigma = 2 \times 10^{-2}$	$\sigma = 5 \times 10^{-2}$	$\sigma = 4 \times 10^{-2}$: : $\sigma = 2,2 \times 10^{-2}$
cv = 3 %	cv = 1,8 %	cv = 3,8 %:	cv = 2 %	$\frac{cv}{cv} = 5\%$

σ = écart type

cv : coefficient de variation

Ces facteurs ont été établis pour cinq injections de masses différentes de β -carotène et du composé i, chaque manipulation étant répétée deux fois (10 essais en tout).

Nous avons considéré que la distribution de l'échantillonnage suit une loi normale. Les termes σ et cv sont calculés de la façon suivante :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (xj - \bar{x})^2}{N - 1}} \qquad cv = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

avec :xj = FR pour la j ème expérience.

 $\bar{x} = FR$ moyen.

N = nombre d'expériences = 10 dans notre cas.

Le terme σ indique la variation moyenne entre les valeurs expérimentales trouvées et la moyenne calculée.

Le terme cv donne une idée de l'intensité des écarts.

Les concentrations des différentes solutions de caroténoïdes standards ont été déterminées par mesure de la densité optique au maximum d'absorption. Les coefficients d'extinction molaire utilisés sont présentés en annexe.

b) Quantification de mélanges standards

Nous avons effectué la quantification du mélange synthétique composé de 6 caroténoïdes. Les masses injectées pour chacun des caroténoïdes correspondent approximativement aux concentrations plasmatiques. La concentration globale est environ égale à 1000 μ g/l, ce qui correspond à des concentrations individuelles voisines de 160 μ g/l. Une injection de 60 μ l permet d'injecter environ 9 ng de chacun des caroténoïdes. Le tableau suivant présente les valeurs individuelles expérimentales oblenues pour 3 essais , les résultats sont confrontés aux valeurs réelles introduites.

		Essai 1	· · · ·		Essai 2			Essai 3	
Espèce	Masses calculées	Masses réelles	Ecart en %	Masses calculées	Masses réelles	Ecart en %	Masses calculées	Masses réelles	Ecart en %
a-carotène	5,8	6,1	- 5 %	7,8	8	- 2,5 %	9,3	9,4	- 1 %
Cryptoxanthine	9,5	9,6	- 1 %	8,8	8,5	+ 3,5 %	7,4	7,1	+ 4 %
Lycopène	5,9	5,7	+ 4 %	6,1	6,5	- 6,6 %	6,2	6,5	- 5 %
Zéaxanthine	10,8	10,8	0 %	11,3	11,4	- 1 %	8,5	8,2	+ 3,5 %
Lutéine	5,6	5,3	+6%	7,9	7,5	+ 5 %	4,4	4,1	+ 6,5 %
β-carotène		10,1			10,1			10,1	

Ces résultats montrent qu'il est possible de quantifier les constituants d'un mélange synthétique avec une précision d'environ 5 % par notre technique. Ceci ne permet évidemment pas d'avancer que la quantification des caroténoîdes du plasma se fera à 5 % près. En effet, les cas présentés sont des cas idéaux puisqu'ils ne prennent pas en compte toutes les étapes de préparation (prélèvement, saponification, extraction, dilution...) et qu'ils correspondent à des séparations chromatographiques parfaitement maitrisées.

B - Quantification des caroténoïdes du plasma sanguin

Avant d'appliquer notre méthode de quantification à des plasmas sanguins, nous avons voulu établir les conditions d'extraction qui sont généralement mal connues ainsi qu'évaluer les différents paramètres qui peuvent influencer le résultat final et surtout la reproductibilité.

1 - Extraction des caroténoïdes du plasma sanguin

Tous les échantillons de sang ont été fournis par le centre Oscar Lambret de Lille. Après prélèvement en présence d'un anticoagulant, le sang est centrifugé pour récupérer le surnageant qui constitue le plasma sanguin. L'extraction s'effectue directement sur ce plasma.

a) Extraction par des solvants organiques

Les caroténoïdes ne sont pas sous forme libre dans le plasma sanguin mais sont complexés ou liés non chimiquement aux protéines ou aux lipides. L'addition d'un solvant organique (méthanol, éthanol) permet de solubiliser les caroténoïdes, de dissocier les formes liées et de précipiter les protéines et les lipides. Les caroténoïdes ainsi solubilisés dans une phase hydroalcoolique sont ensuite extraits par l'hexane, ce qui permet d'obtenir un échantillon "propre" débarrassé au maximum des résidus mis en solution dans la phase hydroalcoolique, l'hexane étant un solvant très spécifique des caroténoïdes. Toutefois, les coefficients d'extraction de ce solvant ne permettent pas de les extraire totalement en une seule fois de la phase hydroalcoolique. Nous avons cherché à déterminer le nombre d'extractions à effectuer pour récupérer une quantité maximale de caroténoïdes. Trois extractions successives se sont révélées suffisantes d'après les résultats que nous présentons dans le tableau suivant :

N ^{eme} extraction	: : : : : : : : : : : : : : : : : : :	: 2ème : :	3ème	: : 4ème :	: : Totale :
% extrait	: 72,6 % : : : : : : :	: 20,6 % : :	6,7 %	: : 0,2 % :	: : 100 % :

Les différentes phases sont ensuite regroupées puis évaporées sous courant d'azote à température ambiante. Le résidu contenant les caroténoïdes est ensuite solubilisé par l'acétone (solvant miscible avec le solvant C.L.H.P.). L'addition de β -carotène standard est effectuée à ce stade juste avant l'injection.

b) Rôle d'une saponification

Le problème de la technique décrite précédemment vient du fait que certains caroténoïdes sous forme ester sont très solubles dans l'eau et ne peuvent pas être extraits par l'hexane. Une saponification permet de faire passer les caroténoïdes présents, sous forme ester, en une forme acide ou alcool très soluble dans l'hexane. La réaction chimique mise en jeu est rappelée ci-dessous.



La saponification est effectuée comme l'indique Mathew-Roth [45] par addition d'un mélange méthanol-potasse (1 mole/l = 7 % en poids) dans un bain thermostaté à 60°C pendant deux heures à l'abri de la lumière. L'extraction par l'hexane est ensuite effectuée comme décrit auparavant.

Une augmentation de 20 % de la concentration totale est obtenue dans le cas de l'utilisation d'une extraction avec saponification. Un point très important à remarquer est qu'il n'y a pas apparition de nouvelles formes de caroténoïdes et que l'augmentation des caroténoïdes polaires (xanthophylles) et des caroténoides moins polaires (carotènes) sont à peu près identiques, 24 % et 20 % respectivement.

Aucune perte d'un type particulier de caroténoïde n'a été observée. Ces résultats sont contradictoires avec les travaux de F. Khachick [40]. En effet, ce dernier observe une perte significative des xanthophylles et plus particulièrement des époxycaroténoïdes lors d'une extraction avec saponification des caroténoïdes des végétaux. Ces différences sont certainement dues au fait que Khachick utilise de fortes concentrations de potasse dans le méthanol (30 %). Ces fortes teneurs seraient préjudiciables à la stabilité des caroténoïdes, ce qui rejoint les travaux de R.F. Taylor [46] qui trouve que, avec 30 % en potasse dans le méthanol, on peut observer jusqu'à 90 % de perte pour certains caroténoïdes. R.F. Taylor trouve que 6 % de KOH dans MeOH est la limite à 25° C.

c - Influences extérieures : lumière, air et conditions extérieures

Les caroténoïdes sont sensibles à la lumière, surtout en présence d'oxygène. Nous avons donc voulu vérifier si l'air et la lumière pouvaient altérer une partie des caroténoïdes du plasma sanguin lors du protocole d'extraction.

Pour ceci, nous avons effectué une extraction à l'air libre comme indiqué précédemment et une seconde extraction sur un plasma de même origine dans une boîte à gants avec une surpression d'azote. Ces deux manipulations ont été faites pendant la même durée (15 mn environ) avec les mêmes solvants (tous dégazés préalablement) et en limitant les expositions à la lumière. Aucune différence significative n'apparaît sur les chromatogrammes lors de l'injection des deux extraits correspondants. On peut donc affirmer que l'extraction à l'air libre n'engendre pas de perte en caroténoïdes et que l'extrait reste stable 2 à 3 heures à l'air ambiant.

Si une extraction, relativement rapide, n'influe pas sur la concentration des caroténoïdes, un mauvais stockage du plasma peut au contraire être à l'origine de pertes importantes.

En effet, M. Mathew Roth [45] a observé qu'un stockage à -20°C d'un plasma était insuffisant pour éviter toute perte de caroténoïdes (15 % en 6 mois). Seul un stockage à -75°C semble stabiliser les caroténoïdes. Les travaux de D. Nierenberg [18] ont confirmé ces résultats.

Ayant observé des pertes semblables pour nos plasmas stockés à environ -25°C, nous avons essayé d'améliorer le mode de conditionnement du plasma en utilisant la lyophilisation. Ce traitement permet d'éliminer l'eau, catalyseur des réactions d'oxydation, et de conserver l'échantillon sous vide poussé à -25°C dans une ampoule scellée.

Ce traitement ne modifie en rien la teneur en caroténoïdes comme le montre les chromatogrammes d'un même plasma, avant et après lyophilisation (figure 38).



Figure 38 : Séparations C.L.H.P. des caroténoïdes d'un plasma sanguin. A - sans lyophilisation B - avec lyophilisation $\lambda ext = 488$ nm ; débit = 1,5 ml/min ; volume injecté = 60 µl.

La conservation à -25°C pendant trois mois par ce type de conditionnement n'a également pas fait apparaître de perte significative en caroténoïdes. Des essais à plus long terme seraient évidemment nécessaires pour confirmer ces résultats.

L'oxygène reste l'un des facteurs les plus limitant pour la stabilité des caroténoïdes ; il est donc essentiel d'éliminer l'oxygène dissous dans les solvants (d'extraction et C.L.H.P.) par un dégazage préalable. Nierenberg [18] préconise d'utiliser le B.H.T. (Buthyl-Hydroxy-Toluene) dans les solvants pour stabiliser les composés les plus labiles.
d - Influences des anticoagulants

L'obtention d'un sérum étant relativement longue, il est préférable de doser les caroténoïdes dans le plasma. Les échantillons de sang sont donc prélevés en présence d'un anticoagulant. Différents composés à activité anticoagulante, intervenant à différents stades du processus de coagulation, sont utilisés en pratique courante.

Nous avons essayé de quantifier l'influence de quatre d'entre eux sur le rendement d'extraction des caroténoides.

Le tableau suivant présente leur effet sur la concentration totale. Les résultats sont présentés en pourcentage, le composé le plus efficace est supposé avoir extrait la totalité des caroténoïdes (100 %).

Anticoagulant	:	NaF	:	Héparine	::	E.D.T.A.	:	Citrate
Pourcentage extrait	:	100 %	:	92 %	:	74 %	:	61 %

On constate une forte variation des quantités extraites selon l'anticoagulant utilisé. Par contre, l'analyse C.L.H.P. des 4 extraits indique que le nombre de caroténoïdes ainsi que la proportion relative de chacun d'eux restent constants.

Le mécanisme de la coagulation est très complexe et on peut admettre que les anticoagulants choisis agissent à différents stades de ce processus. Il ne nous est pas possible de donner une explication de ce phénomène. On peut juste remarquer que le rendement d'extraction diminue avec l'acidité de l'anticoagulant.

Compte tenu des résultats du tableau ci-dessus, nous avons utilisé le fluorure de sodium comme anticoagulant pour la suite de notre travail.

e - Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction, représenté par le rapport de la quantité extraite sur la quantité totale de départ, quantifie l'efficacité d'une extraction.

Il est toutefois assez difficile, dans notre cas, d'obtenir cette information pour les caroténoïdes du plasma sanguin. Les quantités réelles des caroténoïdes présents dans le plasma sont inconnues, il est donc nécessaire de reconstituer synthétiquement un milieu plasmatique et exempt de caroténoïde, puis d'y ajouter par la suite des quantités connues de caroténoïdes. Le plasma sanguin est un milieu très complexe et il est impossible de mimer toutes ses caractéristiques. Nous avons essayé, toutefois, de nous rapprocher des conditions plasmatiques en utilisant de l'albumine humaine (3,5 g/l) dans une solution tampon de sel de phosphate (PBS) qui permet de se placer au pH physiologique de 7,4. Une quantité connue de caroténoïde est alors additionnée à ce plasma synthétique. L'extraction est ensuite effectuée comme indiqué précédemment (sans saponification). Les concentrations sont déterminées soit par mesure directe de la densité optique de la solution d'hexane soit par la technique C.L.H.P.-Raman. Les résultats obtenus sur les 6 caroténoïdes pris comme référence sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Туре	•	Rendement en % méthode directe (1)	: Rendement en % : méthode C.L.H.P. (2) :
β-carotène	:	81	: $79 cv = 3 \%$
a-carotène	:	100	86 cv = 4 %
cryptoxanthine	•	87,5	90 cv = 5 %
Lycopène	:	73	: 67 cv = 4 %
Zéaxanthine	:	67	69 cv = 3 %
Lutéine	:	61,5	: 57,6 cv = 4,5 %

(1) Addition d'un seul caroténoïde, puis mesure de la densité optique après extraction à l'hexane.

(2) Addition des six caroténoïdes et mesure par la technique C.L.H.P.-Raman (4 essais).

Nous voyons donc que le protocole utilisé ne permet pas d'extraire la totalité des caroténoïdes. De plus, les rendements varient d'un composé à un autre. Il est évident que ces résultats ne reflètent pas tout à fait la réalité puisque les conditions plasmatiques ne sont pas rigoureusement respectées.

Les interactions caroténoïdes-plasma doivent être de natures totalement différentes des interactions caroténoïdes-albumine.

En aucun cas, ces résultats ne peuvent être utilisés comme facteurs correctifs à la quantification. Mais ils montrent que l'extraction des caroténoïdes est une étape primordiale pour leur quantification. Chaque technique d'extraction aura son propre rendement, il est donc essentiel d'indiquer en détail la technique utilisée pour comparer les résultats avec ceux de la littérature.

Nous pouvons remarquer, aux vues de ces résultats, que l'utilisation d'étalon interne peut engendrer des erreurs si elle n'est pas faite correctement. En effet, l'étalon interne risque, lorsqu'il est ajouté avec le solvant d'extraction, ce qui est souvent le cas [40-44], de présenter un rendement d'extraction différent des autres caroténoïdes.

Ceci provoque des erreurs de concentrations dans la solution finale. La bonne utilisation de l'étalon interne nécessiterait une détermination préalable des rendements d'extraction relatifs entre l'étalon interne et les différents composés à l'aide de plasmas synthétiques.

Nous pouvons résumer les conditions pour lesquelles nous avons extrait les caroténoïdes :

- Prélèvement du sérum en présence de l'anticoagulant NaF.
- Centrifugation et récupération de 100 µl de plasma.
- Saponification à l'aide de 200 µl d'une solution de potasse dans le méthanol (6 % en poids).

 Extraction par 100 μl d'hexane (agitation 3 minutes). Cette opération est répétée 3 fois.

- Evaporation à température ambiante sous azote.

- redissolution par 100 µl d'acétone (avec ou sans étalon suivant les cas).

L'efficacité des différentes étapes de l'extraction étant maintenant connue, il nous faut évaluer la reproductibilité de notre technique de quantification.

2 - Evaluation de la reproductibilité du système de quantification

Pour évaluer la reproductibilité de notre système lors de la quantification des caroténoïdes du plasma sanguin, nous avons analyser plusieurs fois le même plasma. C'est à dire que le protocole d'extraction et de quantification préalablement défini a été appliqué en parallèle sur différentes fractions d'un même plasma. Dans notre cas, nous nous sommes limités à cinq fractions.

Dans le tableau suivant sont présentées les concentrations massiques individuelles en $\mu g/l$ obtenues pour chacune des fractions d'un même plasma. Aucune dilution ou concentration n'a été effectuée au cours des manipulations, la concentration massique se calcule de la façon suivante :

$$t \ \mu g/l = \frac{mi}{\nu i} \times 10^6 \tag{15}$$

avec

mi = masse du composé i déterminée par les relations (13) et (14) en μg . vi = volume d'injection en microlitres.

N° : d'extraction :	1	: 2 :	3	4	5	: : moyenne
β-carotène : μg/l :	897,5	: 797,2 : : :	881,6	758,4	751,9	: : $817 \sigma = 68$: $cv = 8 \%$:
α-carotène : μg/l :	113,98	99,6	113,70	103,4	103,9	: $107 \sigma = 6,5$: $cv = 6 \%$
: Cryptoxanthine: μg/l :	556,5	: 473,4 : :	533,4	468,8	486,5	: : 504 σ= 39 : cv = 7,5 %
Lycopène : μg/l :	230,0	201,9 : : 201,9 :	217,17	185,9	179	: : 203 σ= 21 : cv = 10 %
Zéaxanthine : μg/l :	138,9	: 160,5 :	169,10	164,64	159,1	: $158 \sigma = 11,5$: $cv = 7 \%$
: Lutéine : µg/l : ;	111,4	127,28 :	133,6	109,5	105,6	: : 117 σ= 12 : cv = 10 %

On peut signaler que cette quantification correspond à 87 % du total des surfaces des pics détectés. L'aire restante, non quantifiée, correspond à des carotenoïdes mineurs pour lesquels nous n'avons pas utilisé de standard.

Ces résultats donnent une estimation globale de la reproductibilité de notre méthode de quantification. Les variations observées peuvent etre attribuées à différentes causes intervenant au cours du protocole de quantification. Ces causes d'erreur proviennent de :

- L'extraction : volume d'echantillon et de dilution.

- L'ajout de β -carotène étalon.

- L'injection.

- La décomposition des pics du chromatogramme.

Nous avons essayé d'estimer la reproductibilité de chacune de ces étapes.

Il est très difficile, voir impossible, de quantifier l'incertitude de chaque étape individuellement. Nous considérons que l'analyse d'un seul pic donnera la reproductibilité de l'injection seule, et que la mesure de l'aire totale de chaque chromatogramme de plasma renseignera sur les reproductibilités cumulées de l'extraction, de l'ajout d'étalon et de l'injection. La quantification des pics des chromatogrammes donnera la reproductibilité globale comprenant l'extraction, l'injection, l'ajout d'étalon et la décomposition.

La variation due à l'injection a été déterminée en injectant à intervalles réguliers (1 heure) et après stabilisation de la colonne, une même quantité (7 ng) de β -carotène (le composé le plus retenu). La variation des aires mesurées dépend essentiellement du système d'injection, les perturbations provoquées par la chaîne de détection (laser et photomultiplicateur) pouvant être considérées comme négligeable.

Pour notre système, la variation moyenne observée sur les injections ne dépasse pas 2 % de l'aire moyenne observée. Nous présentons dans le tableau suivant les résultats obtenus lors de cette mesure.

			·			<u></u>		
: : :	Injection	:	Aires	:	:	Injection	: : Aires :	:
:	1	:	33000	:	:	6	: : 32050	:
:	2	:	31900	:	:	7	: 31600	:
:	3	:	32279	:	:	8	: : 32455	:
:	4	:	32856	:	•	9	· 31724	:
: :	5	• : :	31500	:	• • •	10	: 31200	:

moyenne = 32050 σ = 500 cv = 1,8 %

Connaissant l'incertitude apportée par l'injection, il est possible, en mesurant la variation de la surface totale du chromatogramme d'un plasma, de déterminer par différence l'incertitude apportée par l'extraction et l'addition d'étalon. De la même façon, l'incertitude engendrée par la décomposition des pics du chromatogramme est estimée par différence entre la reproductibilité globale et la reproductibilité avant décomposition du chromatogramme. Nous présentons sur le schéma suivant les différentes estimations de l'incertitude apportée par chacun des stades de la quantification.



Les coefficients de variation individuels sont :

cv β-carotène = 8 %; cv α-carotène = 6 %; cv cryptoxanthine = 7,5 % cv lycopène = 10 %; cv zéaxanthine = 7 %; cv lutéine = 10 %

Ceci permet d'estimer que notre technique de quantification pour les caroténoïdes du plasma sanguin a une sensibilité d'environ 8 %. C'est à dire qu'une variation de concentration individuelle ne sera observable par notre technique que si cette variation correspond à une différence de concentration individuelle supérieure à 8 %.

Nous pouvons à présent passer à la quantification de différents plasmas.

3) Quantification de différents plasmas sanguins

Nous présentons dans le tableau suivant, les résultats de la quantification des caroténoïdes de 5 plasmas d'origines différentes.

	: 1	2	3	: 4	: : 5 :
β-carotène	: : 817 (⁺ _15) :	: 188 (- 15)	: 289 (- 23)	: : 279 (* 22) :	: : 263 (- 21) :
a-carotène	: 107 (+ 6)	46 (+3)	34 (-2)	: : 32 (+ 2) :	: 34 (⁺ 2)
Cryptoxanthine	: : 504 (+ 38) :	749 (- 56)	: : 137 (- 10)	: 66 (+ 5) :	: : 101 (- 7) :
Lycopène	: : 203 (+20) :	15 (- 1,5)	955 (+ 95)	: : 659 (+ 66) :	: : 68 (+ 7)
Zéaxanthine	: : 158 (+ 11) :	34 (- 2)	275 (+ 19)	: : 297 (- 21) :	: : 128 (+ 9) :
Lutéine	: : 117 (+ 11) :	131 (-13)	: 287 (- 28)	: : 294 (- 29) :	: : 115 (- 11) :
Concentration totale	: : 1906 :	1163	1977	: : 1626 :	: : 709 :

Variations des concentrations en $\mu g/l$

Nous voyons que les concentrations individuelles varient fortement d'un plasma à un autre ; les variations observées sont nettement supérieures à l'incertitude de la mesure.

Nos résultats permettent de montrer que le β -carotène n'est pas le constituant majoritaire dans bien des cas, contrairement à ce qui a été considéré pendant longtemps. Ainsi, l'utilisation du β -carotène comme seule référence lors de quantifications globales par mesure de la densité optique du mélange dans l'hexane peut engendrer très certainement des erreurs importantes ; ce point particulier sera évoqué par la suite.

Nous avons rassemblé dans le tableau suivant, le rapport de l'aire du pic chromatographique individuel de chaque caroténoïde quantifié sur l'aire totale des pics du chromatogramme.

en %	:	1	:	2	:	3	:	4 :	5
β-carotène	:	38	::	12,7	:	8,6	:	: 10,4 :	25,5
a-carotène	:	11,1	:	7,3	:	2,3	:	2,7 : :	7,6
Cryptoxanthine	:	15,6	:	33,5	:	2,7	:	: 1,6 :	6,4
Lycopène	:	7,5	:	0,8	:	21,9	:	: 18,9 :	5,1
Zéaxanthine		5,5	:	2,1	::	7,6	:	: 10,3 :	11,5
Lutéine	:	8,96	::	16,8	:	16,3	::	20,8 : :	21,5
% Aire connue	:	86,5 %	:	74 %	:	60 %	::	65 % : :	78 %

A la vue des résultats de ce tableau, l'aire quantifiée est comprise entre 60 et 80 % de l'aire totale. Mais ceci ne correspond pas tout à fait à la proportion réellement quantifiée. En effet, le lycopène n'est pas en exaltation maximale à la longueur d'onde excitatrice 488 nm et donc participe relativement peu à la surface, mais il fait partie des composés quantifiés et peut, dans certains cas, être majoritaire (plasmas 3 et 4). Ainsi, la proportion des caroténoïdes quantifiés est donc supérieure à la proportion de la surface chromatographique supposée connue. Nous pouvons donc avancer que sur les 5 plasmas présentés, 80 % environ de la quantité totale des caroténoïdes sont quantifiés. De plus, dans les 20 % des composés restant non quantifiés, aucun pic n'apparaît majoritairement même avec des radiations excitatrices différentes. Dans ce dernier tableau, des variations importantes de proportions sont remarquées entre plasmas, mais aussi entre caroténoïdes. Nous pouvons donc en conclure qu'il n'existe pas de proportions relatives constantes entre les caroténoïdes d'un plasma à un autre, bien que le nombre de caroténoïdes semble conservé.

II - QUANTIFICATION DES CAROTENOIDES TOTAUX

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la détermination exacte de la composition en caroténoïdes d'un plasma sanguin est relativement longue et complexe si on veut procéder par une séparation suivie d'une quantification individuelle.

En analyse clinique, cette démarche ne peut pas être mise en place pour des raisons évidentes de rapidité et de coût, c'est pour cela que, bien souvent, une méthode d'analyse globale est utilisée. Généralement, cette méthode utilise la loi de Beer Lambert appliquée à l'ensemble des caroténoïdes extraits dans l'hexane. Nous avons vu dans l'introduction que l'effet Raman de résonance pouvait avantageusement être utilisé avec un gain de temps d'analyse significatif. Nous présentons dans cette partie, la mise au point de cette technique.

1 - Description de la technique

Le protocole de dosage est assez simple puisqu'il suffit d'additionner une certaine quantité de solvant organique au sérum, de centrifuger et d'enregistrer le spectre Raman de résonance du surnageant. Le solvant utilisé est l'acétone qui présente des raies Raman proches de celles des caroténoïdes et qui, dans le cas présent, sont toutes regroupées dans le même intervalle spectral. Le rapport des aires des bandes Raman correspondant aux caroténoïdes (A caroténoïdes) et à l'acétone (A solvant) est fonction de la concentration en caroténoïdes et de la raie excitatrice. Un étalonnage préalable permet, en mesurant le rapport R = Acaroténoïde / A solvant, de déterminer la concentration en caroténoïdes (cf figure 2).

Comme pour l'absorption UV-visible, la difficulté de cette technique réside dans le choix des caroténoïdes de référence. En effet, comme l'a montré l'étude C.L.H.P., le plasma sanguin contient plusieurs caroténoïdes possédant chacun un profil d'excitation particulier et l'utilisation d'un seul composé standard comme le β -carotène peut conduire à une grande distorsion des résultats pour un dosage global. Pour effectuer un tel dosage, il faudrait donc faire intervenir plusieurs standards dans l'étalonnage. Le rapport R à une longueur d'onde λ serait alors décrit par la relation suivante :

$$R\lambda = \sum_{i=1}^{m} \alpha_{i,\lambda} \times Ci$$
 (16)

avec :

m : nombre de caroténoïdes présents dans le plasma.

 $\alpha i, \lambda$: coefficient de proportionnalité entre le rapport Aire caroténoïde i/ Aire acétone et la concentration du caroténoïde i à la longueur d'onde λ . Ce coefficient est déterminé à partir de l'analyse de composés standards.

Ainsi, lors de l'analyse du plasma sanguin, l'utilisation de m longueurs d'onde permettrait d'établir m équations identiques à l'équation (16) et par suite de déterminer les m concentrations Ci.

1 - Choix et mise au point de l'étalonnage

Nous voyons d'une part que l'utilisation d'un seul standard conduirait à un résultat faux et d'autre part qu'il serait très long et très complexe d'utiliser un nombre de composés standards égal au nombre de caroténoïdes du plasma sanguin.

Compte tenu des résultats obtenus sur différents plasmas (tableau page 117), nous avons pu remarquer qu'un écart important entre la surface totale du chromatogramme (surface proportionnelle au signal Raman) et la quantité totale des caroténoïdes quantifiés est observé quand le lycopène est en forte proportion.

C'est donc ce dernier qui serait en partie responsable de la forte disparité des résultats si on utilise un seul standard à cause de son profil d'excitation fortement décalé vers le rouge. Nous avons donc, pour simplifier la mesure, considéré uniquement deux groupes de caroténoïdes.

Le premier groupe correspond aux caroténoïdes à 9 doubles liaisons conjuguées, le second groupe, aux caroténoïdes à 11 doubles liaisons conjuguées. Dans ces conditions, les standards utilisés sont respectivement le β -carotène et le lycopène et seules deux longueurs d'onde excitatrices sont nécessaires d'après l'équation (16) pour déterminer les 2 espèces. Pour augmenter la précision, une troisième longueur d'onde a été utilisée. Ces trois raies excitatrices sont choisies les plus éloignées les unes des autres, ce qui permet d'obtenir des fortes variations du rapport R et de favoriser ainsi la précision des mesures. Pour cela, nous avons utilisé les raies 457,9 nm ; 488,0 nm ; 514,5 nm du laser à argon ionisé.

Nous obtenons de cette manière, un système de trois équations à deux inconnues. Pour résoudre ce système, nous utilisons la méthode des moindres carrés qui permet de trouver les concentrations (C β -carotène, C Lycopène) telles que la somme des différences (R observé - R calculé) au carré soit minimale. Un moyen informatique simple calcule très rapidement les concentrations en tenant compte de ces impératifs.

Il nous a fallu dans un premier temps déterminer expérimentalement les coefficients a β -carotène, λ et a lycopène, λ pour appliquer cette technique à des mélanges synthétiques puis aux solutions plasmatiques.

Les droites d'étalonnage, représentant le rapport R en fonction de la concentration du β -carotène et du lycopène pour les trois longueurs d'onde utilisées, sont présentées sur la figure 39. Ces résultats sont obtenus pour la raie 1525 cm⁻¹ des caroténoïdes rapportée à la raie 1710 cm⁻¹ de l'acétone.



Figure 39 : Droites d'étalonnage pour le β -carotène (---) et le lycopène (---).

Les pentes de ces droites représentent les coefficients de proportionnalité ($\alpha i, \lambda$). Nous avons déterminé ces coefficients par la technique des moindres carrés et les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

λext nm	: β-carotène α en l/µg :	: : Lycopène : α en l/μg :
457,9	: : 1603 ⁺ 15	: : 1878 ⁺ 19 :
488	: : 2970 ⁺ 28	: : 3436 ⁺ 33
514,5	: $511 \stackrel{+}{-} 6$:	: : 5225 ⁺ 52 :

Les possibilités de cette technique ont été testées sur des mélanges synthétiques des deux composés standards, le lycopène et le β -carotène. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

C déterminées en µg l	C réelles en µg/l	Erreurs
C B-carotène = 449	568	- 23 %
C lycopène = 536	482	+ 11 %
C totale = 985	1050	- 6,5 %
C β-carotène = 847	756	+ 11 %
C lycopène = 356	323	+ 8 %
C totale = 1203	1079	+ 11 %
C B-carotène = 328	375	- 13 %
Clycopène = 702	643	+ 8 %
C totale = 1030	1018	+ 1 %
Cβ-carotène = 373	305	+ 20 %
Clycopène = 391	375	+ 4 %
C totale = 764	680	+ 11 %
Cβ-carotène = 445	418	+ 6 %
C lycopène = 295	273	+ 7%
C totale = 740	691	+ 7 %
Cβ-carotène = 447	525	- 15 %
Clycopène = 101	80	+ 22 %
C totale = 548	605	- 9,5 %

Ces résultats permettent d'évaluer la précision sur les mesures. Cette précision est d'environ 11 % pour la concentration du β - carotène et d'environ 9 % pour celle du lycopène. Ces valeurs semblent relativement élevées mais il faut avoir à l'esprit qu'elles englobent les incertitudes sur les coefficients α , les mesures d'aire, les concentrations réelles. Les valeurs relativement proches pour α β -carotène et α lycopène aux longueurs d'onde 457,9 nm et 488 nm accentuent l'imprécision des résultats. L'incertitude obtenue lors de l'analyse du plasma sanguin risque d'être supérieure.

En effet, si les profils d'excitation sont voisins dans chaque groupe, l'intensité relative de chaque profil d'excitation est différente. La lutéine qui présente à peu près le même profil que le β -carotène, possède une intensité de profil deux fois plus importante que le β -carotène. Il n'est pas toutefois possible d'utiliser des coefficients correctifs modifiant les a β -carotène, λi et a lycopène, λi . En effet, les concentrations relatives entre caroténoïdes varient énormément comme nous l'avons vu lors de la quantification par la chromatographie C.L.H.P..

Avant de passer à la détermination des concentrations plasmatiques, les conditions d'extraction sont à préciser.

3 - Extraction

L'étape d'extraction par cette technique est très simple puisqu'il suffit d'ajouter de l'acétone au plasma, à la fois pour précipiter les protéines et pour extraire. Un problème apparaît quant au volume d'acétone à utiliser. En effet, le plasma sanguin est constitué essentiellement d'eau. Ainsi, lors de l'extraction, les caroténoïdes se trouvent dans un mélange eau-acétone qui est peu favorable à leur solubilité. Les caroténoïdes ne sont pas solubles dans l'eau et donc peu solubles dans un mélange eau-acétone.

Salarés [32] a trouvé de fortes variations des spectres d'absorption de caroténoïdes pour différents mélanges eau-acétone. Il y a formation, dans ces mélanges, d'agrégats de caroténoïdes par interactions hydrophobes, ce qui engendre un déplacement du spectre d'absorption vers de plus hautes énergies ainsi qu'une diminution d'intensité. Le spectre Raman de résonance est perturbé de manière analogue. Pour vérifier ces variations, nous avons effectué différentes solutions de β -carotène dans des mélanges eau-acétone. La figure 40 représente l'évolution de l'intensité relative de la bande v_1 à 1525 cm⁻¹ après normalisation pour le β -carotène en fonction du pourcentage d'eau dans l'acétone.



Figure 40 : Evolution de l'intensité de la bande v_1 du β -carotène en fonction de la proportion d'eau dans l'acétone. $\lambda ext = 488 \text{ nm}$; C β -carotène $\simeq 10^{-6}$ mole/l.

La courbe obtenue indique qu'en dessous d'une proportion de 15 % d'eau dans l'acétone, l'intensité de la bande v_1 n'est plus modifiée. A partir de cette constatation, nous avons recherché le volume optimal d'acétone à utiliser lors de l'extraction des caroténoïdes du plasma sanguin. Le volume d'acétone est choisi afin d'éviter les problèmes d'agrégation tout en ne faisant pas apparaître une trop forte dilution.

La figure 41 représente l'évolution de l'intensité relative de la bande v_1 après normalisation pour le mélange des caroténoïdes du plasma sanguin en fonction du volume d'extraction d'acétone. Un volume compris entre 3 et 4 cm³ est la condition optimale d'extraction.



Figure 41 : Evolution de l'intensité de la bande v_1 des caroténoïdes extraits du plasma sanguin en fonction du volume d'acétone. $\lambda ext = 488$ nm.

III - <u>COMPARAISON DES TECHNIQUES MISES AU POINT :</u> <u>ETUDE DE L'EVOLUTION CIRCADIENNE DES CAROTENOIDES CHEZ</u> <u>L'ETRE HUMAIN (étude préliminaire)</u>

Nous présentons dans cette partie la comparaison des deux techniques Raman de quantification, C.L.H.P. et directe. Celles-ci seront comparées par la suite à la technique de quantification globale par absorption UV-visible.

L'étude que nous avons menée pour la comparaison des méthodes de quantification, a également été le moyen d'appliquer ces techniques à une étude de l'évolution circadienne des caroténoïdes chez l'être humain.

On sait depuis longtemps que la concentration d'un grand nombre de composés naturels varie dans l'organisme en fonction de l'heure de la journée. La chronobiologie tente de préciser la nature de ces rythmes, leurs rôles et les implications de leurs éventuelles perturbations. La recherche d'un rythme circadien des caroténoïdes n'a, à notre connaissance, jamais été entreprise. Les raisons de cette absence d'étude sont la nécessité de contrôler l'apport exogène par l'alimentation mais surtout la difficulté pour doser correctement les caroténoïdes. Il était donc important de montrer que les techniques mises au point pouvaient servir à entreprendre des études biologiques non encore réalisées.

1 - Description de l'étude

Nous avons quantifié les caroténoïdes d'échantillons de sang prélevés toutes les 4 heures et pendant 24 heures chez une personne à jeun. La personne était allongée et recevait par perfusion intraveineuse une solution nutritive ne contenant aucun caroténoïde. De plus, la personne était synchronisée depuis plusieurs jours sur le rythme de l'hôpital, à savoir 8 à 9 heures de sommeil et 15 à 16 heures de veille. La personne était consentante et l'étude a été réalisée à l'occasion d'une intervention chirurgicale bénigne. Un échantillon de sang de la même personne a été prélevé 96 heures après le dernier prélèvement destiné à l'étude de l'évolution circadienne, dans le but d'observer les variations apportées sur la concentration individuelle des caroténoïdes par le rétablissement d'une alimentation normale.

Chaque échantillon a été analysé par les techniques suivantes :

- Technique C.L.H.P. spectromètre Raman.
- Technique globale par spectrométrie Raman de résonance.
- Technique globale par spectrométrie d'absorption.

Cette dernière technique a été utilisée avec l'extrait d'hexane destiné à la technique C.L.H.P. mais aussi avec l'extrait acétonique destiné à la technique directe Raman de résonance. Dans les deux cas, la concentration globale est donnée par mesure de l'absorbance à 450 nm ; le coefficient d'extinction molaire utilisé est celui du β -carotène dans le solvant approprié.

2 - Résultats

Nous présentons les résultats obtenus dans le tableau suivant :

			Technique (C.L.H.P.				Technique giv	obale R.R.	Technique gi par absorp	abate tion
Heures	Lutéine	Zéaranthine	L ycopène	Cryptoxanthine	a-carotène	B-carotène	Concentrations totales	Concentrations trouvées	Ecarts/ à la tech. C,L.H.P.	Concentrations trouvées	Ecents / à la lech. C.L.H.P.
18 H	130	128	6 9	8	R	262	720 + 25 % + 900	CT' = 600 C Lycopène = 176 CT = 776	- 33 % + 60 % - 14.5 %	CT dans = 1500 herane = 1500 CT dans = 2520	+ 66 % • 180 %
22 ^H	811	131	2	104	5		052 120 120	CT'= 589 C Lycopène = 161 CT = 750	- 34 %		
4.8	115	115	75	Š	27	257	685 4 • 877	CT' = 536 C Lycopène = 214 CT = 750	- 38 % + 92 % - 15 %	1	
78	121	811	89	16	31	251	677 4= 853	CT' = 643 C Lycopène = 167 CT = 810	- 18 % + 140 % - 5 %	1	1
Hol	136	132	99	16	33	277	728 + 910	CT' = 620 C Lycopène = 142 CT = 762	- 28 % + 136 % - 16 %		
H¢H	142	125	99 19	2	31	280	- + - + 529	CT' = 662 C Lycopène = 181 CT = 843	- 22 %		
18 ^H	141	121	12	102	8	266	735 - + 918	CT' = 625 C Lycopène = 160 CT = 787	- 25 % + 122 % - 14 %		
1 N D Z	129 10 8 %	124 6,9 5 %	69 5 7 %	96 25 25 25	30 3 10	286 10 4 %	900 26 2,9 %	CT = 782 34 4 %	ACT = - 13 %		
H96 +	118	901	92	26	30	261	680 + <u>30 % -</u> 898	CT' = 618 C Lycopène = 18 CT = 865	8 1 - 8 8 -	CT dans 1661 herane = 1661 CT dans 2733 l'acétone	* 200 *
	•	najoration de 23	5 % correspond	lant à la surfact	1 des pics restu	jijuong non int	liés				

-126-

3 - Interprétation des résultats

a) - comparaison des techniques de quantification

La technique globale utilisant la spectrométrie Raman de résonance (RR) est en bon accord avec la technique C.L.H.P. en ce qui concerne la concentration totale (écart moyen = 14 %). Par contre, la technique directe RR ne permet pas d'approcher la valeur de la concentration du lycopène (écart de 77 % par rapport à la technique C.L.H.P.). Cette erreur est certainement due au composé correspondant au pic n° (3) attribuable très certainement au δ -carotène qui présente une exaltation proche du lycopène (cf. chapitre II). Dans le plasma étudié, celui-ci présente une aire chromatographique équivalente à celle du lycopène.

Si l'estimation de la concentration totale par la technique directe RR est correcte, cette méthode ne permet pas d'observer de faible variation de concentrations individuelles. La différence remarquée lors des analyses C.L.H.P. entre plasma de la personne à jeun et alimentée, n'est pas observée par la technique directe. En effet, la variation du pic n° ③ (variation de + 102 %) ainsi que la variation du pic n° 7 de la zéaxanthine (-17 %) n'engendrent pas une variation notable de la concentration totale (figure 42).



Figure 42 : Séparations C.L.H.P. des caroténoïdes du plasma sanguin. A - personne à jeun B - même personne mais alimentée 96 heures plus tard.

 $\lambda ext = 488 \text{ nm}$; débit = 1,5 ml/min ; 60 μ l injectés.

-127-

La détermination de la concentration totale par mesure d'absorption visible semble inadaptée à la vue des résultats obtenus. La mesure de la densité optique dans la solution d'hexane engendre un écart de + 66 % sur la concentration totale. Cette trop forte estimation est certainement en partie due, comme le montre la figure 43, à la présence du pied de la forte absorption UV d'autres espèces (vitamine, acide rétinoïque...) qui perturbe l'absorption visible des caroténoïdes. La mesure de la densité optique à 454 nm est ainsi majorée d'environ 20 %.



Figure 43 : Spectre d'absorption UV-visible des caroténoïdes extraits du plasma sanguin. Solvant utilisé : hexane.

Si par contre la mesure de densité optique se fait directement sur la solution d'extraction acétonique utilisée pour la technique directe RR, un écart considérable apparait sur l'estimation de la concentration totale (+ 180 %). L'extraction par l'acétone solubilise beaucoup d'espèces qui absorbent et perturbent l'absorption propre des caroténoïdes.

Nous voyons donc l'intérêt d'utiliser la technique directe RR pour la détermination de la concentration globale des caroténoïdes. Cette technique a le gros avantage d'utiliser une technique d'extraction rapide qui permet de mettre à profit l'avantage de sélectivité de la spectrométrie RR par rapport à l'absorption UV-visible. Si toutefois une étude plus fine des concentrations individuelles des caroténoïdes est désirée, la technique C.L.H.P. est nécessaire.

b - Evolution circadienne des caroténoïdes

Les variations observées sont faibles, tant au point de vue de la concentration globale qu'individuelle. En effet, la concentration totale des 6 caroténoïdes est moyennée à 716 μ g/l avec une variation qui n'est que de 3 %. Il en est de même pour les concentrations individuelles de ces 6 caroténoïdes ; C β -carotène = 266 μ g/l (cv = 4 %) ; C α -carotène = 30 μ g/l (cv = 10 %) ; C cryptoxanthine = 97 μ g/l (cv = 5 %) ; C lycopène = 69 (cv = 7 %) ; C zéaxanthine = 124 μ g/l (cv = 5 %) ; C lutéine = 129 μ g/l (cv 8 %).

Les variations observées sont du même ordre de grandeur ou à peine supérieures aux incertitudes données par notre technique C.L.H.P. - spectromètre Raman. La figure 44 représente les concentrations en $\mu g/l$ des 6 caroténoïdes majeurs en fonction de l'heure de la journée.

Ces résultats permettent de penser que les variations de la concentration individuelle ou globale des caroténoïdes dans le plasma sanguin au cours d'une journée, si elles existent, sont faibles et restent dans l'ordre de grandeur de l'incertitude de notre technique (dans le cas d'une personne non alimentée). Nous observons toutefois, dans certains cas, une remontée de la concentration individuelle sans apport exogène. Ces constatations paraissent inattendues puisque certains caroténoïdes sont davantage "provitamine A" que d'autres et donc consommés en plus grande quantité. Des variations relatives entre caroténoïdes ainsi qu'une diminution continue de la concentration totale devraient ainsi apparaître. Ce n'est pas le cas et ce phénomène peut, peut-être, s'expliquer par des raisons de consommations très faibles en caroténoïdes qui ne pourraient être détectées par notre système de quantification.

Par contre, nous observons une remontée systématique des concentrations individuelles entre 6 H. du matin et 18 H. ainsi qu'un rythme circadien casis parfait pour la lutéine.

Il existe peut-être dans le corps humain un système capable de réguler la concentration individuelle et totale en ayant accés à une "réserve" en caroténoïdes. Dans ce cas, les variations en concentrations ne s'observeraient qu'après consommation totale des "réserves" en caroténoïde.



Figure 44 : Evolution circadienne individuelle des principaux caroténoïdes du plasma sanguin chez une personne à jeun.

L'analyse du plasma de la même personne, mais alimentée pendant 96 heures, permet d'observer des variations plus importantes. Notamment, comme on l'a vu (figure 42), une forte variation apparaît pour le composé n° (3), attribuable certainement au δ -carotène, avec une augmentation de l'aire du pic chromatographique de 102 % par contre l'aire du pic correspondant à la zéaxanthine (pic n° (7)) a diminué de 17 %.

Il convient enfin de remarquer que les conclusions de cette étude restent très préliminaires car on sait que l'intensité des phénomènes chronobiologiques peut être très différents d'une personne à l'autre. Il serait donc souhaitable de confirmer les résultats sur un nombre plus grand de cas.

IV - CONCLUSION

La technique chromatographique C.L.H.P. couplée à un détecteur Raman nous a permis de quantifier individuellement les 6 caroténoïdes majoritaires du plasma sanguin avec une incertitude sur la mesure d'environ 8 %. Pour cela, nous avons été amenés à étudier la réponse "Raman" des 6 caroténoïdes par l'utilisation de composés standards.

Au cours de cette étude, nous avons pu étudier l'influence des différents paramètres intervenant lors de l'extraction, ceci nous a permis d'utiliser par la suite les conditions optimales d'extraction. Le temps d'analyse total (extraction et séparation C.L.H.P.) est de 1 H 15.

En ce qui concerne la quantification globale des caroténoïdes, la technique C.L.H.P. n'est pas nécessaire. En effet, nos travaux montrent que la technique globale par spectrométrie RR donne avec une bonne estimation la concentration totale des caroténoïdes. Les avantages apportés par cette technique sont sa rapidité (10 mn pour 1 analyse) et sa précision par rapport à la technique globale d'absorption (60 mn avec saponification pour 1 analyse).

Cette étude a également été l'occasion d'apporter des informations sur l'évolution circadienne des caroténoïdes chez l'être humain. Sans apport alimentaire, les variations observées en concentration sont faibles et à peine supérieures aux incertitudes de notre technique (environ 8 %), ce qui prouve que l'utilisation des caroténoïdes du plasma est, soit faible, soit compensée par un apport provenant d'une "réserve".

CONCLUSION GENERALE



CONCLUSION GENERALE

Au terme de ce travail, il nous est possible de tirer certaines conclusions quant au dosage des caroténoïdes du plasma sanguin ; ces conclusions présentent différents aspects que nous pouvons analyser les uns après les autres :

- Cette étude nous a fourni l'occasion de mettre au point une nouvelle méthode de détection après séparation sur colonne C.L.H.P.. Pour les caroténoïdes, la spectrométrie Raman de résonance s'avère être beaucoup plus sensible que la traditionnelle détection en absorption visible. Avec notre installation, et après avoir étudié les différents paramètres pouvant intervenir sur la sensibilité, une limite de détection de 50 picogrammes injectés a pu être atteinte. Cette limite pourrait être dépassée en optimisant les conditions chromatographiques (utilisation d'une microcolonne...) et les caractéristiques d'observation (emploi de l'effet SERS par exemple). Le profil de résonance peut être mis à profit à des fins de caractérisation. L'utilisation de la spectrométrie multicanale, même si ses performances limites n'ont pas été recherchées au cours de cette étude, semble très prometteuse surtout pour la caractérisation de composés en sortie de colonne. En connaissant la réponse individuelle de chaque caroténoïde à la longueur d'onde d'excitation utilisée, il est possible de quantifier chaque pic du chromatogramme avec une précision d'environ 4 %.

- La composition en caroténoïdes du plasma sanguin n'était connue que très partiellement. Au cours de cette étude, nous avons pu détecter 13 caroténoïdes dont 9 ont pu être indexés avec certitude. Si la concentration totale ainsi que les concentrations individuelles varient fortement d'un individu à l'autre, nous avons pu montrer que le nombre de caroténoïdes reste constant pour tous les plasmas analysés. Devant la complexité du mélange, donc des chromatogrammes Raman obtenus, il est très difficile de quantifier la totalité des caroténoïdes présents ; cependant, nous avons pu montrer que l'analyse des 6 composés majoritaires permet de quantifier plus de 80 % de la quantité totale des caroténoïdes du plasma sanguin. A cet effet, nous avons été amenés à étudier les différents facteurs intervenant au cours de l'analyse (rendement d'extraction, reproductibilité des mesures etc...). Nous pouvons estimer que la quantité totale des caroténoïdes caroténoïdes extraits peut être obtenue avec une précision d'environ 15 %. - Si seule, la connaissance de la quantité totale des caroténoïdes du plasma sanguin est désirée, une détermination globale peut être utilisée ; la spectrométrie Raman de résonance est d'un très grand intérêt car elle évite de nombreuses manipulations et permet d'obtenir un spectre de vibration caractéristique, même dans un milieu complexe comme peut l'être un extrait brut contenant des caroténoïdes. Comme le lycopène possède un profil d'excitation très particulier et très différent des autres caroténoïdes, il est possible, en utilisant différentes longueurs d'onde d'analyse, d'exprimer la concentration totale à l'aide de deux termes ; l'un pour le lycopène (associé aux caroténoïdes à 10 et 11 doubles liaisons), l'autre pour les caroténoïdes à 9 doubles liaisons. La concentration totale ainsi obtenue est, à 14 % près, celle déterminée après séparation C.L.H.P.. La méthode utilisant l'absorption visible, généralement employée lors de telles analyses, s'avère être beaucoup plus longue à mettre en oeuvre et moins précise car elle majore la quantité totale d'environ 80 %.

- Un travail préliminaire, destiné à mettre en évidence l'existence d'un rythme circadien des concentrations plasmatiques de caroténoïdes chez l'homme, a permis d'illustrer l'intérêt des techniques mises au point. Ce travail a montré que des variations journalières pourraient exister même si celles observées sont très faibles, à peine supérieures à l'incertitude de mesure de notre méthode. Des travaux complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ce résultat.

- Cette application met, toutefois, en évidence toute la difficulté que peut représenter un dosage précis des caroténoïdes du plasma sanguin. Une détermination exacte, qualitative et quantitative, nécessite des techniques relativement lourdes à mettre en oeuvre et un temps important si de très nombreuses analyses sont nécessaires pour pouvoir tirer des conclusions. La méthode globale par spectrométrie Raman de résonance peut apporter des éléments de réponse plus rapides et relativement précis. Mais la question peut être posée quant à la signification biologique d'une valeur globale.

Néanmoins, quelque soit le problème biologique posé, la très forte exaltation du signal Raman des caroténoïdes obtenue par effet de résonance nous semble offrir aux biologistes un nouvel outil d'analyse extrêmement sensible. Nous espérons que ces techniques pourront servir à la connaissance du processus de métabolisation des caroténoïdes à l'intérieur du corps humain et aussi à l'étude plus précise du rôle des caroténoïdes dans les processus de protection du développement cancéreux, voire dans leur utilisation pour une éventuelle prévention ou un éventuel traitement.

ANNEXE



ANNEXE

I - <u>LES CAROTENOIDES</u>	142
II - <u>ACTIVITE PROVITAMINE A</u>	144
III - SPECTRES D'ABSORPTION ULTRAVIOLET ET VISIBLE	
DES CAROTENOIDES	145
1 - Généralités	145
2 - Le modèle de l'électron libre	151
IV - SPECTRES DE VIBRATION DES CAROTENOIDES	155
1 - Spectroscopie Raman de résonance des caroténoides	155
2 - Intensité de la lumière diffusée en Raman de résonance	158
V - LA FLUORESCENCE DES CAROTENOIDES	163
1 - Origine de la fluorescence des caroténoïdes	163
2 = Drofile downitation Daman + fluoroscance	164
2 - riorits d'excitation raman + ridorescence	

I - LES CAROTENOIDES - Otto Isler [42]

Plus de 500 caroténoïdes peuvent être dénombrés à ce jour et leur nombre ne cesse d'augmenter ; la plupart dérivent de la structure du lycopène par déshydrogénation, hydrogénation, oxydation, cyclisation ou introduction de groupements terminaux.



Les principaux caroténoîdes sont des composés spécifiques en C40 hydrocarbonés (carotènes) et des composés portant des fonctions oxygènés sur les groupements terminaux (xanthophylles). Deux structures types sont représentées ci-après :



Etant donné le nombre important de doubles liaisons que renferment ces molécules, elles peuvent présenter l'isomérie <u>cis</u> - <u>trans</u>. La figure 45 représente les différents isomères du β -carotène avec leurs nomenclatures.

Dans la pratique, les noms chimiques sont peu utilisés, les substances étant désignées par un nom commun souvent dérivé de leur origine.



Figure 45 : Les différents isomères structuraux du B-carotène.

A l'état pur, cristallisé, les caroténoïdes sont très sensibles à l'oxydation. Il est indispensable de les conserver sous vide ou sous un gaz inerte. L'oxydation est accélérée par la lumière. Ils sont insolubles dans l'eau et peu solubles dans les huiles.

Dans la nature, les caroténoïdes sont sous forme libre, quelquefois sous forme de glycosides, le plus souvent estérifiés par un ou plusieurs acides gras à chaîne longue, et parfois combinés à des protéines (caroténoprotéines).

De nombreuses publications décrivent de manière exhaustive les caroténoïdes présents dans le monde animal et végétal [33-42].

II - ACTIVITE PROVITAMINE A

Les caroténoides ont une activité provitamine A. Certains d'entre eux sont transformés au cours de leur passage au niveau de la muqueuse intestinale ou du foie, par clivage oxydatif en deux molécules de rétinol, plus souvent appelé vitamine A. Le schéma suivant résume ce processus :


La vitamine A est connue en tant que facteur de croissance indispensable, mais aussi pour son rôle dans la vision. D'autres aspects ont été découverts récemment et continuent encore à susciter de nombreux travaux. C'est par exemple, son rôle dans les facteurs de glycosylation des protéines, dans la différenciation cellulaire, dans l'immunité. Ces derniers points ont suscité un grand intérêt en cancérologie. La commission Vitamine A a rédigé un document général sur la vitamine A et les rétinoïdes qui résume toutes les propriétés biologiques de ces molécules [48].

L'activité provitamine A varie beaucoup d'un caroténoïde à un autre comme le montre le tableau suivant établi par Beecher et coll [49].

Espèces		Activité provitamine A
	:	en %
	:	
Rétinol	:	100
Trans β-carotène	:	17
9-cis β-carotène	:	6
Trans α-carotène	:	9
Lycopène	:	0
β-cryptoxanthine		10
Lutéine	:	0
Echinénone	:	9
β-carotène - 5,6-époxyde	:	4

La faible activité provitamine A (voir nulle) de certains caroténoïdes n'exclue pas un possible rôle d'inhibiteur de tumeurs cancéreuses.

III - SPECTRES D'ABSORPTION ULTRAVIOLET ET VISIBLE DES CAROTENOIDES

1 - Généralités

Lorsque deux chromophores (groupe insaturés présentant une absorption dans l'UV ou le visible) sont conjugués, ceux-ci se comportent comme un nouveau chromophore. Dans le cas simple du butadiène, la longueur d'onde d'absorption maximale se trouve à 217 nm alors qu'elle n'est que de 170 nm pour l'éthylène. L'addition d'un nouveau chromophore entraîne un déplacement supplémentaire vers le rouge accompagné d'une augmentation de l'intensité de la bande.

Pour les caroténoïdes où l'effet de conjugaison est très important, l'effet bathochrome est tel que l'absorption ne se produit plus seulement dans l'ultraviolet mais aussi, et surtout, dans le domaine du visible d'où l'apparition de couleur. C'est également la forte conjugaison qui accroît la section efficace d'absorption du système électronique ; on assiste alors à une augmentation très forte de l'intensité d'absorption (ε peut être voisin de 10⁶ mole⁻¹.l.cm⁻¹ pour des chaînes à 9 doubles liaisons).

Dans le cas de l'isomère <u>trans</u> du β -carotène (figure 45) de symétrie C_{2h} , et en ne considérant que les électrons II de la chaîne principale, l'état fondamental peut être décrit par 9 orbitales moléculaires liantes IIC-C pleines et 9 orbitales moléculaires antiliantes II* C-C vides. Cet état fondamental a une symétrie électronique de type Ag. L'absorption de la lumière provient de l'excitation d'un des électrons d'une orbitale II liante jusqu'à une orbitale II* antiliante.

Les différents états excités peuvent être décrits par la théorie des orbitales moléculaires. Les symétries prévues pour ces états sont respectivement Bu , Ag , 2Bu .

Les transitions électroniques rencontrées seront donc du type :

 $\begin{array}{rcl} {}^{1}\!Ag & \rightarrow & {}^{1}\!Bu \\ {}^{1}\!Ag & \rightarrow & {}^{1}\!Ag \ (\ transition \ interdite \ par \ le \ centre \ de \ symétrie \ de \ la \\ & molécule). \end{array}$ $\begin{array}{rcl} {}^{1}\!Ag & \rightarrow & {}^{2}\!{}^{1}\!Bu \end{array}$

De façon analogue, les transitions électroniques de l'isomère 15-15' cis du β -carotène (groupe C₂) sont :

$$\begin{array}{ccc} {}^{1}\!A_{1} & \rightarrow & {}^{1}\!B_{1} \\ {}^{1}\!A_{1} & \rightarrow & {}^{1}\!A_{1} \\ {}^{1}\!A_{1} & \rightarrow & {}^{2}\,{}^{1}\!B_{1} \end{array}$$





Figure 46 : Transitions électroniques et spectres d'absorption des isomères tout-trans et 15-cis du β-carotène.

A l'absorption électronique, sont en général associées des bandes de vibration responsables de la structure fine des bandes électroniques. La figure 46 résume les différentes transitions observées.

Les spectres d'absorption électronique des caroténoïdes sont très voisins comme le montre la figure 47 ; la position des bandes d'absorption est fonction du nombre de doubles liaisons conjuguées.



Figure 47 : Variation des spectres d'absorption de caroténoïdes en fonction du nombre de doubles liaisons conjuguées (réf. 42).

La structure fine de la bande électronique correspondant à la transition la moins énergétique est plus ou moins prononcée suivant la nature des groupements terminaux de la chaîne polyénique principale. Dans le cas de groupements terminaux cycliques (appelés groupements β -ionones), la répulsion des groupements méthyles en position 5 et 5' avec la chaîne polyénique engendre une perte de planéité de la molécule. Cette distorsion limite ainsi le recouvrement des orbitales II du groupement β -ionone avec celles de la chaîne polyénique, ce qui provoque un élargissement de la transition O-O. Comme le montre la figure 48, le groupement

 β -ionone du β -carotène engendre une perte de structure fine par rapport au spectre du lycopène. Dans le cas de la canthaxanthine, la conjugaison avec le groupement carbonyle du cycle terminal a fait perdre totalement cette structure fine.



Figure 48 : Variation de la structure fine des spectres d'absorption UV-visible pour quelques caroténoïdes [réf : 42].

Des études cristallographiques [50-51] ont montré que l'angle entre le plan du cycle et le plan de la chaîne est d'environ 40° pour le β -carotène et de 54° pour la canthaxanthine. Bayliss [52] émet l'hypothèse d'une plus grande interaction entre solvant et molécules dans le cas de la canthaxanthine, plus polaire que le β -carotène, ce qui provoquerait ainsi un élargissement de la bande O-O.

L'écart entre les maximums pour une structure fine correspond à la séparation des niveaux vibrationnels dans l'état excité (de l'ordre de 1500 cm⁻¹). La forte intensité de la composante 1-O indique une modification de la géométrie de l'état excité, sans doute provoquée par un allongement des doubles liaisons C=C.

Il est à noter que la position ainsi que le coefficient d'extinction molaire (ε) de ces bandes sont très dépendants de la nature du solvant utilisé. La variation du maximum d'absorption en fonction des différents substituants possibles sur la chaîne et sur le cycle et ainsi que de la nature du solvant utilisé sont disponibles dans la littérature sous forme de tableau [53]. Un tableau de ce type est présenté ci-dessous.

Effets des substituants et des solvants sur le principal maximum d'absorption des caroténoïdes

addition	: : position :	:	déplacement			
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	•	:	·····			
Double liaison	: chaîne	:	+ 7 à 35 nm			
Double liaison	: cycle	:	+5à9nm			
Groupement carbonyle	: chaîne	:	+ 28 nm			
2ème carbonyle	: chaîne	:	+1à7nm			
Groupement carbonyle	: cycle	:	+ 7 nm			
2ème carbonyle	: cycle	:	+ 5 à + 9 nm			
1 ou 2 époxydes	: 5,6-Epoxyde	:	- 8 nm			
1 ou 2 époxydes	: 5,8-Epoxyde	:	- 20 nm			
Trans – cis	:	:	- 4 nm			
Effet de solvant	: Ethanol, hexane,	:				
	: éther de pétrole	:	très peu d'effet			
	: Benzène, chlroroforme	:	+ 15 nm			
	: CS ₂	:	+ 35 nm			
	:	:				

Les coefficients d'extinction molaire de différents caroténoïdes dans les solvants utilisés sont présentés dans le tableau suivant d'après [35].

	:	Hexane *	:	Acétone *	: : λ : nm
β-carotène	:	138930	:	138280	: : 453 :
a-carotène	:	150080	:	149500	: : 444 :
Cryptoxanthine	:	131700	:	130800	: : 452 :
Lycopène	:	184920	:	184380	: : 472 :
Zéaxanthine	:	133480	:	132912	: 452 :
Lutéine	:	143292	:	142810	: : 445 :

* ε en l·mole⁻¹ · cm⁻¹

Dans le cas des caroténoïdes, le modèle de l'électron libre prévoit assez bien les maximums d'absorption.

2 - Le modèle de l'électron libre [54]

Ce modèle admet que les électrons Π peuvent se déplacer librement tout le long de la chaîne polyénique, sans restriction. Par cette hypothèse, l'énergie potentielle de l'électron serait constante et égale à zéro tout au long de la molécule et infinie aux extrémités de celle-ci (schéma 1). En conséquence, les électrons Π du polyène se comportent comme des particules libres dans une boîte [55].



Schéma 1

L'équation d'onde de ce système est donnée par la relation :

$$\frac{-h^2 d^2 \psi}{8 \pi^2 m dx^2} = E \psi \quad (o < x < a) \tag{17}$$

avec :

- x = distance le long de la boîte.
- n = nombre quantique.
- m = masse de l'électron.
- h = constante de Planck.

La solution de cette équation est :

$$\psi n = \sqrt{2/a} \sin \left[\frac{\pi \cdot n}{a} \right]_{x} \quad (o < x < a) \quad (18)$$

Kauzman W. [55] prévoit l'énergie correspondant à chaque fonction d'onde électronique ψn .

$$En = \frac{n^2 h^2}{8ma^2} \tag{19}$$

Pour un polyène comportant k doubles liaisons conjuguées, les 2 k électrons Π se répartissent dans les k premiers niveaux d'énergie. La différence d'énergie entre le premier niveau électronique excité (n = k + 1) et l'état fondamental (n = k) est donnée par :

$$\Delta E = \frac{(2k+1)h^2}{8 ma^2} \tag{20}$$

La longueur de la boîte peut être remplacée dans cette relation par a = ao (2k+1) où ao est la longueur moyenne d'une liaison c-c dans le cas des polyènes conjugués.

L'équation (20) devient, sachant que $\Delta E = hc/\lambda$:

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{h}{8ma_0^2 (2k+1) \star c} = \frac{cste}{(2k+1)}$$
(21)

Cette relation (21) peut être vérifiée dans le cas des caroténoïdes. Les valeurs expérimentales de Goodwin T.W. [33] présentées dans le tableau suivant justifient ce modèle.

	:	Nb. de doubles		Maxima				
Type de polyène	:	liaisons	:	0-0	:	O-1	:	O-2
	:	conjuguées	:		:		:	
	:		:		:		:	
Phytofluène	:	5	:	366	:	347	:	331
ζ-carotène	:	7	:	425	:	401	:	380
a-zéacarotène	:	8	:	449	:	421	:	398
Neurosporène	:	9	:	470	:	440	:	416
ε-carotène	:	9	:	471	:	440	:	418
δ-carotène	:	10	. :	487	:	456	:	431
Lycopène	:	11	:	504	:	472	:	443
1-2 Dihydro-3,4-déhydrolycopène	:	12	:	518	:	483	:	457
3-4-Déhydrolycopène	:	13	:	535	:	500	:	468

En effet, une relation linéaire est obtenue en traçant $1/\lambda$ (avec λ de la transition O-O) en fonction de 1/(2k+1) (figure 49). La pente de la droite permet de retrouver la distance ao séparant deux carbones dans une liaison polyénique. La valeur obtenue1,4 A est intermédiaire entre une double liaison seule (1,34) et une liaison simple (1,54).



Figure 49 : Vérification de la relation (21).

La droite obtenue ne passe pas par l'origine, ce qui signifie que les hypothèses de départ ne sont pas totalement vérifiées, à savoir un potentiel constant et nul tout au long de la molécule et des parois infinies. Ce phénomène conduit à une limite pour λ nommée limite de Kuhn [56]. Celui-ci stipule qu'il existe une répulsion entre l'état fondamental et le premier état excité pour des polyènes à chaîne infinie. La séparation minimale de ces deux états correspond au maximum d'absorption limite des polyènes à chaîne infinie et se situe entre 600 et 700 nm dans le cas de polyènes linéaires. En résumé, la position des maximums d'absorption ainsi que la forme de la bande électronique de plus grande longueur d'onde donnera une bonne indication sur la structure des caroténoïdes : délocalisation le long de la chaîne et nature du groupement terminal. De plus, la présence d'une bande dans les courtes longueurs d'onde attribuable à la transition $A_1 - A_1$, interdite pour un isomère <u>trans</u>, permise pour un isomère <u>cis</u>, permettra de préciser la conformation de la molécule. Il existe de nombreuses tables regroupant les valeurs des longueurs d'ondes correspondant aux maximums d'absorption pour les caroténoïdes [35-57].

IV - SPECTRES DE VIBRATION DES CAROTENOIDES

Les spectres IR et Raman du β -carotène ont été largement étudiés et attribués dans le détail [70]. La spectroscopie infrarouge qui n'a pas été utilisée dans ce travail ne sera pas présentée ici. Seule la spectroscopie Raman de résonance, très spécifique des caroténoïdes, sera détaillée dans cette partie.

1 - Spectroscopie Raman de résonance (S.R.r.) des caroténoïdes

Il y a effet de résonance lorsque la fréquence de la radiation excitatrice vo est voisine ou coïncide avec une bande d'absorption électronique de la molécule étudiée. Dans ces conditions, il se produit une exaltation de certaines raies du spectre Raman. Ce phénomène résulte du couplage entre les transitions électroniques et vibrationnelles. Les raies exaltées sont propres à des groupes d'atomes (chromophores) dont les transitions électroniques sont responsables de l'absorption électronique.

C'est ce qu'on observe en enregistrant le spectre Raman de résonance d'un caroténoïde lorsque les longueurs d'onde excitatrices sont choisies entre 400 et 500 nm. Le spectre Raman de résonance des caroténoïdes fait apparaître 3 raies principales, comme le montre le spectre du <u>trans</u> β -carotène présenté sur la figure 50.



Figure 50 : Spectre Raman de résonance du β -carotène dans l'acétone (A). c = 10⁻⁵ mole/l ; λ ext = 488 nm ; résolution = 5 cm⁻¹.

- 1005 cm⁻¹ : vibration de valence des groupements méthyles latéraux (v_3) .

- 1158 cm⁻¹ : vibration de valence des simples liaisons oléfiniques couplées à des déformations angulaires C-C-H dans la chaîne polyéniques (v_2).

- 1525 cm⁻¹ : vibration de valence des doubles liaisons C=C pour laquelle toutes les liaisons c=c vibrent approximativement en phase (v_1).

L'état de substitution des cycles terminaux n'influe pratiquement pas sur les spectres Raman de résonance. Seules de légères variations de la fréquence du mode v_1 et de l'intensité des modes v_1 et v_2 peuvent rendre compte de l'état de délocalisation de la chaîne polyénique. On relie généralement le nombre d'onde v_1 au nombre de doubles liaisons. Dans le cas des caroténoïdes, une relation linéaire relie ces deux termes :

$$\nu C=C = A + \frac{B}{2(N+1)}$$
 (22)

Comme le montre la figure 51 ; la droite obtenue dans le cas des caroténoïdes (en pointillé) est proche de celle déterminée par Kuzmany [58] dans le cas des polyacétylènes (en trait plein).



Figure 51 : Relation entre la fréquence de vibration C=C (v_1) et le nombre de doubles liaisons (N) des caroténoides (---) et des polyacétylènes (----).

La spectroscopie Raman de résonance s'avère une méthode relativement pauvre pour différencier les caroténoïdes de longueur de chaîne identique. Mais, elle permet par contre de différencier les isomères de conformation [59].

Dans le cas du β -carotène, comme le montre la figure 52, la zone 1100-1300 cm⁻¹ est très sensible à la conformation de la molécule. Les vibrations C-C similaires dans le cas du composé tout <u>trans</u> deviennent différentes pour un composé <u>cis</u>. Une attribution théorique des spectres Raman des différentes conformations du β -carotène a été effectuée par S. Saito et M. Tasumi [60].



Figure 52 : Variation de la zone 1100-1300 cm⁻¹ des spectres Raman de résonance des différents isomères structuraux du β-carotène [60].

Le facteur d'intensification des trois bandes dépend de la longueur d'excitation. Par un choix judicieux de la longueur d'onde d'excitation, on peut obtenir des spectres Raman pour des solutions à très faibles concentrations, jusqu'à 5×10^{-9} mole/l (dans le cas des caroténoïdes) alors que la limite de détectivité pour le Raman conventionnel est voisin de 10^{-2} mole/l. Comme nous allons le voir par la suite, on trace généralement l'intensité d'une raie Raman en fonction de la fréquence de la radiation excitatrice. Cette représentation s'appelle profil d'excitation.

2 - Intensité de la lumière diffusée en Raman de résonance

L'intensité totale d'une raie Raman correspondant à une transition entre un état initial O et un état final u, suivant un angle solide 4 Π est donnée par [61]:

$$I_{u,o} = \frac{2^7 \pi^5}{3^2 c^4} \quad I_o (v_o - v_{u,o})^4 \sum_{\rho,\sigma} |(\alpha \rho \sigma)_{u,o}|^2 \quad (23)$$

ou : v_0

 v_o : fréquence du laser d'intensité I_o : composantes du tenseur de diffusion pour une transition vibrationnelle du niveau O au niveau u.

: fréquence Raman correspondant à la transition u,O.

Les caroténoïdes ne possèdent pas une structure de symétrie élevée et seuls les modes totalement symétriques (taux de dépolarisation voisin de 0,33) sont intensifiés. Dans ce cas, un seul terme du tenseur de diffusion est donc à prendre en compte. Ce terme est éaal à :

$$\alpha_{zz} = \frac{1}{h} (f \mid M_{z} \mid e)_{0}^{2} \Sigma \frac{(0 \mid v) (v \mid u)}{v_{u,0} - v_{0} + i\Gamma}$$
(24)

ou :

v_{u,o}

(f | Mz | e) est le moment de transition électronique suivant z pour une transition de e à f.

 (O/v) et (v/u) sont les intégrales vibrationnelles de Franck-Condon.
Γ est une constante d'amortissement qui tient compte de la durée de vie finie de chaque état moléculaire. Généralement, Γ est déterminée expérimentalement.

 $v_{u,0} = v_{00} + \Sigma_i v_i v_i$ est la transition électronique impliquée dans le phénomène de résonance.

On peut représenter une transition en Raman de résonance par le schéma suivant :



Transitions vibrationnelles stokes en spectrométrie Raman et Raman de résonance.

-159-

L'équation (24) et le schéma ci-dessus montrent que l'intensité d'une raie Raman dépend d'une façon complexe des propriétés des niveaux vibrationnels dans l'état excité. Cependant dans l'approximation d'une bande d'absorption fine et isolée, l'intensité donnée par l'équation (23) peut être simplifiée en considérant que seul le plus bas niveau vibrationnel de l'état excité intervient. Dans ce cas si l'intensité est gérée par la seule transition O-O, on a d'après [61] :

$$= \frac{K \times (v_{0} - v_{u,0})^{4}}{(v_{00} - v_{0})^{2} + \Gamma^{2}}$$
(25)

où K est une constante.

I

Nous avons voulu vérifier cette approximation pour deux caroténoïdes : le β -carotène et l'astaxanthine.

Sur la figure 53, nous reportons les profils d'excitation du mode v_1 (vers 1525 cm⁻¹) du β -carotène et de l'astaxanthine superposés aux profils d'absorption de ces deux caroténoïdes. Nous pouvons remarquer que le maximum d'intensité correspond à la transition O-O du spectre d'absorption.



Figure 53 : Spectres d'absorption (traits pleins) et profils d'excitation (traits discontinus) du mode v_1 pour le béta-carotène (1) et l'astaxanthine (2) en solution dans l'acétone.

Avant d'être reportée sur la courbe, l'intensité mesurée doit être corrigée de l'absorption et de la loi de diffusion en ν^4 .

Une forte densité optique de l'échantillon peut se traduire par une diminution notable des intensités du faisceau excitateur et du faisceau diffusé.

L'influence de l'absorption sur l'intensité du faisceau excitateur peut être négligée si on utilise une bande du solvant comme référence interne. L'intensité relative observée sera de la forme [62] :

$$I \text{ obs} = I \text{ réel } \times e^{-2,303 \times C \times y \times \Delta \varepsilon}$$
(26)

avec :c = concentration de l'espèce diffusante.

y = longueur traversée par le faisceau diffusé à l'intérieur de l'échantillon. $\Delta \varepsilon$ = la différence des coefficients d'extinction molaire entre la fréquence diffusée étudiée et la fréquence diffusée prise comme référence (raie du solvant).

La raie du solvant prise comme référence interne n'est pas soumise à un phénomène de résonance ; cependant, elle obéit à la loi de diffusion en v^4 :

$$Is = K' \times (v_0 - v_{u,'0})^4$$
 (27)

L'intensité relative pour le caroténoïde sera donc sous la forme :

$$\frac{I}{I_s} = \frac{K \times (v_o - v_{u,o})^4}{K' \times (v_o - v_{u,o})^4} \times \frac{1}{(v_{oo} - v_o)^2 + \Gamma^2}$$
(28)

Le terme correctif, $(v_0 - v_{u,0})^4 / (v_0 - v_{u',0})^4$ pourra être négligé dans le cas où la fréquence de la raie de référence ($v_{u',0}$) sera suffisamment proche de la fréquence de la raie étudiée ($v_{u,0}$).

La vérification de la loi de résonance pourra se faire à partir de l'intensité relative corrigée (Ir,c) ; l'équation (28), mise sous une forme linéaire, pourra s'écrire :

$$\frac{1}{I_{r,c}} = \frac{(v_{oo} - v_{o})^{2}}{cte} + \frac{\Gamma^{2}}{cte}$$
(29)

Sur la figure 54, nous portons 1/Ir,c en fonction de $(v_{00} - v_0)^2$. Il est possible de vérifier la loi linéaire et de déterminer le terme d'amortissement pour le β -carotène et l'astaxanthine en solution dans l'acétone.



Figure 54 : Vérification du modèle simplifié du phénomène de résonance, (1) β -carotène, (2) astaxanthine.

Nous voyons donc que l'effet Raman de résonance des caroténoïdes entre 460 et 520 nm peut être décrit par un modèle très simple ne faisant intervenir que la transition O-O.

En ce qui concerne les modes v_2 et v_3 , le profil d'excitation montre qu'ils sont couplés avec le mode v_1 principal. En effet, ces profils présentent un maximum bien défini, très proche du niveau vibronique O-O.

Ainsi pour tous les caroténoïdes, l'exaltation des raies est donc due à l'interaction vibrationnelle avec un seul état électronique excité.

De ce qui précède, se dégage les caractéristiques intéressantes de la S.R.r. pour les caroténoïdes. Son principal avantage est que, par un choix judicieux de la fréquence excitatrice, il est possible d'exalter les vibrations de certains chromophores. De ce fait, on atteint une sélectivité que ne possède pas l'absorption UV-visible. De plus, dans le cas des caroténoïdes, cette spectroscopie permet de travailler à très forte dilution $(5 \times 10^{-9} \text{ mole/l})$, ce qui est favorable à l'étude des milieux biologiques tel que le plasma sanguin [63-64-65].

V - LA FLUORESCENCE DES CAROTENOIDES

Le phénomène d'émission qui accompagne le plus souvent l'effet Raman de résonance est l'émission de fluorescence. Il est généralement très intense et masque parfois le phénomène Raman.

Nous essayerons dans cette partie d'analyser la nature de la lumière émise par les caroténoïdes lors d'une excitation laser. Ceci permettra de mieux comprendre l'origine du signal obtenu lors d'une détection par un spectromètre Raman après séparation C.L.H.P..

Cette analyse est réalisée à partir d'études bibliographiques et de données expérimentales que nous avons été amenés à développer au cours de ce travail.

1 - Origine de la fluorescence des caroténoides

Le spectre Raman de résonance des caroténoïdes se superpose sur un fond de fluorescence présentant un maximum dans la région du visible (\simeq 540 nm). Lejeune et coll [66] ont mis en évidence cette fluorescence et ont quantifié le rendement quantique de fluorescence du β -carotène et du lycopène. Ils trouvent des valeurs relativement faibles qui sont respectivement de l'ordre de 10⁻⁴ et 3×10^{-4} .

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'origine de cette fluorescence. La première hypothèse serait de relier l'émission de fluorescence aux impuretés éventuelles présentes dans la solution ou aux produits de photodégradation des carotènes [66]. Par la suite, cette explication n'a pas été justifiée puisque Van Riel et Coll [67] montrent que le phénomène rencontré est une fluorescence intrinsèque. L'utilisation d'un spectromètre Raman à balayage rapide lors d'une séparation C.L.H.P., nous a permis d'éliminer l'hypothèse de la fluorescence amenée par des impuretés ou par des produits de dégradation. Trash et coll [68] suggèrent l'existence d'un niveau énergétique non prévu par la théorie des orbitales moléculaires. Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette annexe, le premier niveau excité d'une chaîne polyénique possède une symétrie du type Bu. En contradiction avec cette prévision, Trash et coll [68] indiquent qu'un niveau excité interdit de symétrie Ag se situe juste en dessous du niveau fortement autorisé. Ce niveau inférieur ne peut pas être décrit par un modèle simple mais par un modèle plus élaboré appelé méthode Pople-Pariser-Porr.

De l'existence de ce niveau, le mécanisme mis en jeu pourrait être décrit par le schéma suivant :



Expérimentalement, le maximum de la bande absorption électronique correspondant à la transition ${}^{1}Ag \longrightarrow {}^{1}Bu$ se trouve à 457 nm (21904 cm⁻¹) pour le β -carotène dans le méthanol. Le maximum de fluorescence se trouve par contre à 542 nm (18500 cm⁻¹). Ces valeurs concordent avec les hypothèses de Trash et coll [68] qui donnent une différence d'énergie entre les deux niveaux excités égale à 3500 cm⁻¹.

2 - Profils d'excitation Raman + Fluorescence

L'intensité du fond de fluorescence n'est pas négligeable devant l'intensité des bandes RAMAN. On voit donc que si un couplage C.L.H.P.-spectromètre Raman est envisagé, le signal utilisé pour la détection sera une somme de deux types d'émissions : Raman et fluorescence.

Nous avons voulu, à partir de ces résultats connaître la variation de l'intensité de fluorescence par rapport à l'intensité Raman en fonction du caroténoïde, mais aussi de la longueur d'onde laser.

Les figures 55 à 58 représentent les profils d'excitation que nous avons obtenus pour quatres des caroténoïdes présents dans le sang. Les courbes profils Raman + fluorescence sont l'image exacte du signal obtenu en détection C.L.H.P. à largeur de fentes constante. Il faut signaler que dans notre cas, le signal de fluorescence représente un signal de fluorescence synchrone, c'est-à-dire que l'écart entre la fréquence de la raie excitatrice et la fréquence d'observation est maintenu constant.

Les résultats obtenus indiquent que le profil d'excitation RAMAN + fluorescence est homothétique du profil d'excitation RAMAN des caroténoïdes ; le rapport intensité RAMAN sur intensité totale varie en fonction du type de caroténoïde mais reste constant pour un caroténoïde donné dans un domaine de concentration inférieure à 5×10^{-7} M (densité optique < 0,05).



Figure 55 : Profils d'excitation Raman + fluorescence (1) et profils d'excitation Raman (2) pour les modes v_1 et v_2 du β -carotène dans le solvant C.L.H.P. ; conc. = 4,35 × 10⁻⁷ M ; fentes = 1750 microns.



Figure 56 : Profils d'excitation Raman + fluorescence (1) et profils d'excitation Raman (2) pour les modes v_1 et v_2 de l'a-carotène dans le solvant C.L.H.P. ; conc. = 3,46 × 10⁻⁷ M ; fentes = 1750 μ .



Figure 57 : Profils d'excitation Raman + fluorescence (1) et profils d'excitation Raman (2) pour les modes v_1 et v_2 du lycopène dans le solvant C.L.H.P. ; conc. = 1,36 × 10⁻⁷ M ; fentes = 1750 μ .



ĵ

ţ

Figure 58 : Profils d'excitation Raman + fluorescence (1) et profils d'excitation Raman (2) pour les modes v_1 et v_2 de la lutéine dans le solvant C.L.H.P. ; conc.=7 × 10⁻⁷ M ; fentes 1750 μ .

ANNEXE EXPERIMENTALE



ANNEXE EXPERIMENTALE

I - SPECTROMETRE RAMAN CONVENTIONNEL RTI30	174
1 - <u>Principe</u>	174
2 - Enregistrement des chromatogrammes sur microordinateur	175
3 - <u>Décomposition des chromatogrammes</u>	176
II - <u>SPECTROMETRE RAMANOR HG2S</u>	176
III - <u>SPECTROMETRE RAMAN MULTICANAL OMARS 89-DILOR</u>	178
IV - <u>SPECTROMETRES UV-VISIBLE</u>	179
V - <u>LASERS UTILISES</u>	179
VI - POMPES CHROMATOGRAPHIQUES	179

I - SPECTROMETRE RAMAN CONVENTIONNEL RTI30

1 - Principe

Ce spectromètre est constitué d'un triple monochromateur. Chaque étage de 800 mm de focale est équipé d'un réseau plan de 1800 traits/mm; transmission d'environ 95 % pour l'ensemble du système. Le taux de lumière parasite de cet instrument est très faible $(10^{-12} à 50 \text{ cm}^{-1} \text{ de la raie Rayleigh})$, la réjection de la radiation excitatrice est donc excellente. Les quatres fentes (F_1 , F_2 , F_3 , F_4) sont réglables de manière continue entre 0 et 18,5 mm (figure 59).



Figure 59 : Schéma optique du triple monochromateur.

Le compartiment porte-échantillon assure la focalisation optimale du faisceau laser dans l'axe de la cellule C.L.H.P. et le transfert de la lumière diffusée sur la fente d'entrée du monochromateur.

La détection est assurée par un photomultiplicateur (Hamamatsu, type 943-02, photocathode GA-AS) refroidi par effet Peltier afin de diminuer le bruit thermique. La tension enregistrée aux bornes du circuit RC est amplifiée puis envoyée sur un enregistreur potentiométrique, soit transmiseà un microordinateur (Apple IIe). Ce dernier est piloté par un train d'impulsions provenant du mécanisme de balayage du monochromateur.

2 - Enregistrement des chromatogrammes sur microordinateur

Dans le cas d'une détection C.L.H.P., le balayage mécanique assurant la rotation des réseaux n'est pas utilisé. En effet, le spectromètre est positionné à un nombre d'onde caractéristique des composés à détecter. Aussi, les impulsions normalement émises par le moteur assurant la rotation des réseaux ne sont plus disponibles pour le pilotage du microordinateur. Un générateur d'impulsions que nous avons placé entre le spectromètre Raman et le microordinateur remplace cette fonction.

Les logiciels informatiques, habituellement utilisés pour le traitement des spectres (lissage, soustraction, correction de ligne de base, etc...), peuvent ainsi être employés pour le traitement des chromatogrammes.

3 - Décomposition des chromatogrammes

Il est indispensable, pour effectuer une quantification, de connaître l'aire des pics chromatographiques. La décomposition des chromatogrammes en composantes gaussiennes permet d'accéder à ce résultat, surtout dans le cas des massifs mal résolus. Pour effectuer cette décomposition, les chromatogrammes enregistrés sur Apple IIe sont transférés sur un miniordinateur (mini 6 de la Société Bull) capable d'effectuer ce type de calcul très rapidement. Le programme de décomposition utilise la méthode des moindres carrés non linéaires appliquée à des bandes symétriques qui peuvent être décrites comme une somme de composantes gaussienne et lorentzienne ; cette dernière est considérée comme nulle dans notre cas.

Nous présentons sur la figure 60, la décomposition d'un chromatogramme résultant de la séparation des caroténoïdes d'un plasma sanguin en 14 composantes gaussiennes.



Figure 60 : Décomposition d'un chromatogramme résultant de la séparation des caroténoïdes d'un plasma sanguin.

II - SPECTROMETRE RAMANOR HG2S

Le spectromètre Ramanor HG2S est constitué d'un double monochromateur équipé de réseaux holographiques concaves ; le schéma optique de cet instrument est décrit sur la figure 61. La qualité des pièces optiques confère à ce monochromateur une excellente réjection de la lumière parasite pour une transmission voisine de 27 %. R_1, R_2 = Réseau holographique concave (2000)raits/mm; focale de 1 métre) M_c = Miroir concave (focale de 50 cm)



Figure 61 : Schéma optique du double monochromateur Ramanor HG2S.

La détection est assurée par un photomultiplicateur Hamamatsu, type R 943.

Comme pour la majorité des spectromètres Raman, la rotation des réseaux est assurée par une barre conséquente guidée par un système d'entrainement vis-écrou.

Un mécanisme de balayage rapide [69] a été adapté à cet instrument. Une came rapportée entre le système vis-écrou et la barre conséquente permet de donner au bloc porte réseaux un mouvement de rotation alternatif. La géométrie de la came impose un retour trois fois plus rapide que le balayage du spectre. Les durées d'enregistrement peuvent varier entre 1 et 12 secondes pour un domaine spectral maximum de 1500 cm⁻¹.

Un enregistreur rapide à stylet chauffant (Gould Allco) est utilisé pour ces mesures.

III - SPECTROMETRE RAMAN MULTICANAL OMARS 89 - DILOR

-178-

Le spectromètre ne comporte plus de système de balayage du spectre. Il fonctionne comme un spectrographe couplé à un détecteur photoélectrique multicanal comportant un grand nombre de canaux de détection (barette de photodiodes au silicium) ; il permet d'analyser simultanément un grand nombre d'éléments spectraux.

La figure 62 représente le schéma optique de l'OMARS 89 commercialisé par la Société DILOR. Cet appareil utilise deux réseaux holographiques plans de 1800 traits/mm pour le prémonochromateur (focale 500 mm). Ils peuvent être utilisés en mode additif comme en mode soustractif. Un ensemble appelé spectrographe permet une nouvelle fois de disperser la lumière et de la détecter. Suivant la dispersion voulue, deux réseaux plans de 1800 traits/mm et 600 traits/mm sont montés dos à dos. La détection est assurée par une barette de 512 photodiodes au silicium.



Figure 62 : Schéma optique de l'OMARS 89 (DILOR).

IV - SPECTROMETRES UV-VISIBLE

* Technique classique

Les spectres d'absorption UV-visible ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman UV 5240 à température ambiante, les solutions étant contenues dans une cellule de quartz de trajet optique égal à 1 cm.

-179-

* Pour détection C.L.H.P.

- Détecteur monocanal à longueur d'onde variable (210-700 nm) Modèle 481 "Lambda Max" de la Société Waters.

- Détecteur multicanal : Modèle 1040A de la Société Hewlett-Packard (domaine spectral 200-600 nm).

V - LASERS UTILISES

Deux lasers ont été utilisés :

* Le laser à Argon ionisé (Ar^+) de type série 2000 de la Société Spectra-Physics qui nous a permis d'utiliser les radiations : 457,9 ; 465,8 ; 472,7 ; 476,5 ; 488,0 ; 496,5 ; 501,7 ; 514,5 nm.

* Le laser à Krypton ionisé (Kr⁺) de type série 2000 de la Société Spectra-Physics qui nous a permis d'utiliser les radiations : 406,7 ; 413,1 ; 482,5 ; 520,2 ; 530,9 nm.

VI - POMPES CHROMATOGRAPHIQUES

Nous avons utilisé deux types de pompes, la première est une pompe de type "6000 A" de la Société Waters à double piston, la seconde pompe est de type "12 Solvent Delivery Module" de la Société Beckman à un seul piston. Ces deux pompes ont été utilisées sans gradient de solvant. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
BIBLIOGRAPHIE

- L. Israel, J. Aguilera ; Pathologie Biologie, 28, nº4, 253-259(1980).
- [2] R.B. Shekelle, S. Liu, W.J. Raynor, M. Lepper, C. Malika, A.H. Rossof; Lancet II, 1185-1190(1981).
- [3] B. Nodan, H. Cuckle, F. Lubin ; Int. J. Cancer, 28, 421-424(1981).
- [4] M. Mathews-Roth ; Pure and Appl. Chem., Vol. 57, n°5, 717-722(1985).
- [5] D. Suda, J. Schwartz, G. Sklar;Carcinogenesis, Vol. 7, n°5, 711-715(1986).
- [6] R. Peto, R. Doll, J.E. Buckley, M.B. Sporn; Nature, 290,201-208(1981).
- [7] P. Rüedi ; Pure and Appl. Chem., vol. 57, n°5, 793-800(1985).
- [8] R.F. Taylor;
 Adv. Chromatogr., Vol. 22, n°2, 182-194(1983).
- [9] S.K. Hajibrahim, P.J.C. Tibbetts, C.D. Watts, J.R. Maxwell, G. Englinton, H. Collin, G. Gulochon; Anal. Chem., 50,549-553(1978).
- [10] B. Stancher, F. Zonta ; Journal of chromatography, 238,217-225(1982).
- [11] K. Tsukida, K. Saiki, T. Takü, Y. Koyama ; Journal of Chromatography, 245,359-364(1982).
- [12] A. Fiksdahl, J.T. Mortensen, S. Liaaen-Jensen; Journal of Chromatography, 157,111-117(1978).
- [13] R. Ohmacht, G. Toth, G. Voigt ; Chromatographia, Vol. 22, n°1-6, 189-190(1986).
- [14] R. Ohmacht, G. Toth, G. Voigt ; Journal of Chromatography, 395,609-612(1987).
- [15] N. Zakaria, K. Simpson, P.R. Braon, A. Krstulovic; Journal of Chromatography, 176,109-117(1979).
- [16] D.R. Lauren, D.E. Mc. Naughton ; Journal of liquid Chromatography, 9(9), 2013-2033(1986).
- [17] J.G. Bieri, E. D. Brown, J.C. Smith ; Journal of liquid Chromatography, 8(3), 473-484(1985).

- [18] D.W. Nierenberg ; Journal of Chromatography, 339,273-284(1985).
- [19] H.J.C.F. Nells, A.P. De Leenheer; Anal. Chem., 55,270-275(1983).
- [20] L.A. Kaplan, J.A. Miller, E.A. Stein ; Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1,147-152(1987).
- [21] Y. Ito, R. Sasaki, M. Minohara, M. Otani, K/ Aoki ; Clinica Chimica Acta, 169,197-208(1987).
- [22] D.R. Lauren, M.P. Agnew, D.E.Mc. Naughton; Journal of liquid Chromatography, 9(9),1997-2012(1986).
- [23] E.S. Yeuny, R.E. Synovec ; Analytical Chemistry, Vol. 58, nº12, 1237-1256(1986).
- [24] A. Chapput, B. Roussel, J. Monstatier;
 C.R. Acad. Sc. Paris, t.289, Série C, 283-286(1979).
- [25] K. Iriyama, Y. Ozaki, K. Hibi, T. Ikeka ; Journal of Chromatography, 254,285-288(1983).
- [26] H. Koizumi, Y. Suzuki ; Journal of High Résolution Chromatography and Chromatography Communications, vol.10, 173-176(1987).
- [27] R.H. Callender, A. Doukas, R. Crouch, K. Nakaniski ; Biochem., Vol.15, n°8, 1621-1629(1976).
- [28] J.M. Dudik, C.R. Johnson, S.A. Asher; J. Chem. Phys., 82,1732(1985).
- [29] J.G. Skinner, W.G. Nilsen ; Journal of the Optical Society of América, vol.59, nº1, 113-119(1968).
- [30] R.D. Freeman, R.M. Hammaker, C.E. Meloan, W.G. Fateley; Applied Spectroscopy, vol. 42, n°3, 456-460(1988).
- [31] A. Berthod, J.J. Laserna, J.D. Winefordner;Applied Spectroscopy, Vol.41, N°7, 1137-1141(1987).
- [32] V.R. Salares, N.M. Young, P.R. Carey, H.J. Bernstein; Journal of Raman Spectroscopy, vol.6, nº6, 282-288(1977).
- [33] T.W. Goodwin; Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Second. Edition, Vol.1, 197(1976).
- [34] A.L. Curl, G.F. Bailey; J.Agric. Food. Chem., n°9, 403(1961).
- [35] T.W. Goodwin ; Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Second Edition, vol.2, (1976).

- [36] C.R. Broich, L.R. Gerber, J.W. Erdman; Lipids, 18, nº3, 253-258(1983).
- [37] L. Hoskins, M.C. Carthy;
 J. Chem. Phys., 5(3), 1322-1326(1985).
- [38] J.N. Thompson ;
 J. Cancer. Clin. Oncol., Vol.19, nº11, 1645-1646(1983).
- [39] T.W. Goodwin; Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments Second Edition, Vol.2, 133-134(1976).
- [40] F. Khackik, G.R. Beecher, N.F. Whittaker ; Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol.34, n°4, 603-616(1986).
- [41] N.M. Frew, G.G. Johson, R.M. Bromund, B.A. Charpentier and M.R. Severenants (Eds);
 Supercritical Fluid Extraction and Chromatography, A.CS Symposium Series, n°366, Américan Chemical Sociéty, Washington DC., 208-228(1988).
- [42] O. Isler ; Birkhäuser Verlag-Caroténoids, (1971).
- [43] W.J. Driskell, M.M. Basher, J.W. Neese; Clin. Chem., 29,6,1046-1044(1983).
- [44] F. Khachik, G.R. Beecher; Journal of Chromatography, 346,237-246(1985).
- [45] M.M. Mathew-Roth, M.J. Stampfer; Clinical Chemistry, vol. 30, n°3, 459-461(1984).
- [46] R.F. Taylor, C.K. Hinckey, D.M. Ekland, J.G. Marenchic ; 8th International Symposium on carotenoids, 27-31 Jully 1987.
- [47] D.I. Thurnham, E. Smith, P.S. Flora ;
 8th International Symposium on carotenoids, 27-31 Jully 1987.
- [48] J.C. Jardillier, F. Belleville-Nabet, M.J. Cals, M. Clerc, E. Delacoux,
 J.C. Delarue, D. Duchassaing, B. Hecquet, M. Nicol, M. Pailet, J.P. Peyrat et M. Succari ;
 Vitamine A et Rétinoides, 1ère partie, 1-35(1985).
- [49] G.R. Beecher, F. Khachik; Journal of National Cancer Institut, vol. 73, nº6, 1397-1404(1984).
- [50] C. Sterling ; Acta Crystallogr., 17,1224(1964).
- [51] J.C. Bart, C.H. M. Gillary;Acta Crystallogr., Sect. B, 24,1587(1968).
- [52] N.S. Bayliss, E.G.M. Rae;J. Phys. Chem., 58, 1002(1054).

- [53] W. Vetter, G. Englert, N. Rigassi, U. Schwieter; Carotenoids, Burkhauser Verlag, 192-202(1971).
- [54] H.H. Jaffé, M. Horchin ; Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, 220-225(1970).
- [55] W. Kauznan ;Quantum Chemistry, Académic Press, New-York, 183(1957).
- [56] H. Kuhn ;J. Chem. Phys., 17,1198(1949).
- [57] E.D. Ritter, A.E. Purcell ; Carotenoids as Colorants and Vitamine A Precussors, Bauernfeind, J.C. Ed, Academic New York, Chapter 10, 883(1981).
- [58] H. Kuzmany ; Phys. Statuo Solidi, B97,521(1980).
- [59] Y. Koyama, T. Kakü, K. Saiki, K. Tsukida ; Photobiochem. Photobiophys., 5,209(1983).
- [60] S. Saito, M. Tasumi ; Journal of Raman Spectroscopy, vol.14, nº5 (1983).
- [61] L.C. Hoskins ; Chem. Phys., 72,4487(1980).
- [62] J.C. Merlin ; Thèse Docteur es. Sciences, Lille (1979).
- [63] K. Larson, L. Hellgren ; Experientia, 30, 481-483(1974).
- [64] A.J. Rein, D.D. Saperstein, S.H. Pines, P.C. Radlick ; Expérientia, 32, 1452-1354(1976).
- [65] M.H. Heyde, D. Gill, R.G. Kilponen, L. Rimai ; J.Am. Chem. Soc., 93, 6777(1971).
- [66] V. Lejeune et C. Tric ; Photochemistry and Photobiology, vol.12, 339-343(1970).
- [67] M.V. Riel, J.K. Hammans, M.V.D. Ven, W. Werner, Y.K. Levine; Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 113, n°1, 102-107(1983).
- [68] R.I. Trash, H.L.B. Fang, O.E. Leroi ;
 J. Chem. Phys., 67(12), 5930-5933(1977).
- [69] J.M. Beny ; Thèse Docteur de troisième cycle (1978).
- [70] S. Schigeki et coll ; Journal of Raman Spectroscopy, Vol.14, n°5 (1983).



RESUME

Au cours de ce travail, nous avons abordé le problème du dosage des caroténoïdes dans le plasma sanguin ; en effet, des études récentes semblent montrer que ces molécules peuvent avoir une influence sur l'évolution de certaines formes de cancer.

La composition en caroténoides du plasma sanguin est relativement mal connue aussi, dans un premier temps, nous avons entrepris une étude qualitative et quantitative après séparation C.L.H.P.. Cette étude a été l'occasion de mettre au point une nouvelle méthode de détection utilisant l'effet Raman de résonance qui s'ovère être beaucoup plus sensible que la détection par absorption visible.

Si le nombre loial de caroténoïdes semble rester constant d'un plasma à l'autre, leurs proportions relatives varient beaucoup. Cependant, nous avons pu montrer qu'à partir des 6 caroténoïdes majoritaires, 80 % de la quantité totale peut être quantifiée.

La concentration totale des caroténoïdes peut être déterminée par spectrométrie Raman de résonance, directement à partir d'un extrait brut dans l'acétone. Cette technique s'avère être très rapide et précise.

La comparaison des différents techniques mises au point a été réalisée au cours d'une étude de l'évolution circadienne des caroténoïdes chez l'être humain.

<u>Mots clés</u> : carotenvides – plasma sanguin – chromatographie liquide haute performance – Raman de résonance