



الجمهورية الجزائرية الشعبية الديمقراطية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Mouloud MAMMERY Tizi-Ouzou
Faculté de médecine
Département de pharmacie

جامعة مولود معمري تيزي وزو
كلية الطب
قسم الصيدلة

Mémoire de fin d'études

N° D'ordre :

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement le :

06 Juillet 2022

Mise au point et validation d'une nouvelle méthode de dosage de la vitamine E dans le sérum humain par HPLC-UV

Réalisé par :

AZZOUG Rabah
OUAAZ Mohamed Amine

MEZIANE Yasmine
SAADA Fatima

Encadré par :

Dr BELKAID Nawal

Co-encadré par :

Dr BEN SI SAID Hassan

Membre de jury :

Pr. MAMOU.M

MCAHU-Faculté de Médecine UMMTO

Président de jury

Dr. DAHMANI D

MAHU-Faculté de Médecine UMMTO

Examinatrice

Dr. MEHNI MH

Ancien MAHU-Faculté de Médecine UMMTO

Examinateur

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous remercions dieu miséricordieux de nous avoir donné la force, le courage, la volonté et la patience pour mener à bien notre travail.

Nous tenons aussi à adresser nos vifs remerciements

A notre Promotrice Dr BELKAID.N et notre Co-promoteur Dr BEN SI SAID.H pour vos précieux conseils et de nous avoir dirigés tout au long de ce travail,

Merci pour votre gentillesse, vos encouragements, vos conseils judicieux et votre disponibilité. Si ce travail a pu aboutir, c'est grâce à votre soutien.

Nous avons eu le privilège de travailler avec vous et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Le travail à vos côtés est un honneur pour nous, et une partie de plaisir.

Nous adressons notre gratitude aux membres De jury notre président

Pr Mamou.M et nos examinateurs Dr Mehni et Dr Dehmani d'avoir acceptés d'étudier et d'évaluer notre modeste travail.

Nous vous sommes très reconnaissants de l'honneur que vous faites en acceptant de juger ce travail.

Enfin, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Je remercie Dieu le tout puissant d'avoir fait que ce jour arrive et de m'avoir offert les personnes très chères à qui je dédie ce modeste travail.

A toi mon père, mon exemple éternel, mon soutien moral et ma source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie, maman que j'adore. Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A la mémoire de mes grands-parents que Dieu les accueille dans son vaste paradis.

A mes chères sœurs, pour leurs encouragements permanents, et leurs conseils précieux tout au long de mes études. Merci d'être toujours là pour moi.

A mes chers frères, pour leur appui et leur aide, que Dieu préserve notre fraternité.

A tous mes neveux et mes nièces.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.

A OUAAZ Mohamed Amine, SAADA Fatima et MEZIANE Yasmine, mes camarades avec lesquels j'ai partagé ce projet.

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé et soutenu de près ou de loin tout au long de ma vie et de mon parcours durant ces 24 années, à qui je souhaite plus de succès.

Ainsi qu'à tous mes collègues pharmaciens que j'ai eu la chance de rencontrer.

Rabah AZZOUG

Dédicaces

Avant tout, je remercie le bon dieu de m'avoir donné la volonté et le courage pour réaliser ce travail que je dédie,

A mes chers parents RACHID et SALIHA MERABET

Qui n'ont pas cessé de m'encourager durant toutes mes années d'étude. Que dieu vous accorde santé, bonheur et longue vie.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consenti pour mon éducation. Je vous en suis reconnaissante, je vous aime.

A ma chère grand-mère Yamina CHERIFI et ma tante Djouher

C'est à travers vos encouragements, votre soutien et votre amour que j'en suis arrivée à la. Que dieu vous procure longue vie.

A mes adorables sœurs DONIA et AMEL

Merci pour vos conseils et motivation qui me pousser à me donner à fond. Je vous souhaite une vie pleine du bonheur et de la réussite dans la vie privée et professionnelle.

A mes amies TINA.T, FATIMA.S, YAMINA.A, LAMIA.B, TINA.B, LYNDIA.B

Avec qui j'ai partagé des moments inoubliables. Je vous souhaite beaucoup d'accomplissement votre vie.

Une dédicace particulière, à une personne particulière HAKIM.A.



Yasmine MEZIANE

Dédicaces

*Avant tout, je remercie **ALLAH** le miséricordieux, source de tout savoir et sagesse de m'avoir donné la force et la patience pour bien mener à terme ces études ainsi que ce travail*

*À ma très chère Mère « **Tassadit** »,*

A toi qui m'as tout donné, sans rien demander, quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide, ta présence à mes côtés et ton encouragement ont toujours été une source de force sans lesquels je n'aurai jamais réussi.

*À mon très cher père « **Abdelkrime** »,*

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es.

Grâce à toi j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et ma formation. Je vous aime et j'implore le tout-puissant pour qu'il vous accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

*À mes merveilleux frères et Sœurs **Nabil, Souad, Siham, Assia, Hamza, Oumessaad et Imane.***

*Tous les mots ne peuvent exprimer mon amour et ma gratitude à leur égard. Pour leur soutien moral, et leurs précieux conseils tout au long de mon parcours
Une dédicace particulière à ma chère sœur Siham, sans toi rien de cela n'aurait été réalisable, merci.*

À tous mes neveux et nièces.

*À la mémoire de mes **grands parents***

Puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour vos âmes.

*À **Rabah AZZOUG, SAADA Fatima et MEZIANE Yasmine**, mes camarades avec lesquels j'ai partagé ce projet.*

À mes amis et camarades avec qui j'ai partagé des moments pleins d'émotions et des souvenirs inoubliables.

Mohamed Amine OUAZ

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à...

Allah Le Tout Puissant

Louange à dieu, qui nous a permis de réaliser ce travail, et de voir ce jour tant attendu

A mes très chers parents,

Mes remerciements les plus sincères à mes parents Mourad et Farida,

Pour avoir été toujours à mes côtés.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti

Pour mon instruction et mon bien être.

Puisse Dieu, le très Haut, vous accorde santé, bonté, longue vie et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

En ce jour, j'espère réaliser l'un de vos rêves, et j'espère ne jamais vous décevoir, ni trahir votre confiance.

Je vous aime.

A mes chères sœurs Ania, Cirta et Sabrina, qui ont toujours été là pour moi. Puisse dieu, de tout haut, vous procure santé, bonheur et réussite.

A mon cher mari, à mon exemple éternel, mon soutien, ma source de joie et de bonheur, je te remercie pour ta générosité et ton encouragement continu, pour me voir réussir merci du plus profond de mon cœur.

A toute ma famille et ma belle-famille, veuillez retrouver en ce modeste travail l'expression de ma gratitude et mon amour. Que dieu vous garde.

A mes chères amies, plus particulièrement **Celia, Tina, Yasmine, Massila, et Yamina** en souvenir de notre forte et sincère amitié, et des moments de joie inoubliable que nous avons passés ensemble. En témoignage de profond attachement qui nous unit. Que dieu vous protège et vous procure prospérité, longue vie, bonheur et santé.

A tous ceux qui ont contribué de près et de loin à l'élaboration de ce travail

Notre promotrice Dr BELKAID Nawal, et notre Co-promoteur Dr BEN SI SAID Hassane, mes plus vifs remerciements pour tout ce que vous avez fait, pour vos efforts, vos encouragements et votre soutien pour réaliser ce travail.

A mes camarades MEZIANE Yasmine, AZZOUG Rabah, OUAZ Mohamed Amine

Ensemble mes amis ; nous avons pu mener ce travail à terme. Merci pour tous vos efforts. je vous souhaite la réussite pour la suite de votre chemin.

Fatima SAADA

Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	ii
INTRODUCTION.....	1
OBJECTIFS.....	3

PARTIE THEORIQUE : REVUE DE LA LITTERATURE

CHAPITRE I : Vitamine E

1 Les vitamines.....	5
2 Vitamine E.....	5
2.1 Définition.....	5
2.2 Structure et nomenclature.....	6
2.3 Propriétés physicochimiques.....	7
2.3.1 Solubilité.....	7
2.3.2 Stabilité.....	7
2.3.3 Propriétés spectrochimiques.....	7
2.4 Métabolisme.....	8
2.4.1 Absorption intestinale.....	8
2.4.2 Transport et distribution.....	8
2.4.3 Catabolisme.....	9
2.4.4 Elimination.....	10
2.5 Mécanisme d'action.....	11
2.5.1 La vitamine E en tant qu'anti oxydant biologique.....	11
2.5.2 Relation structure activité.....	13
2.5.3 Potentiel pro oxydant de la vitamine E.....	13
2.5.4 Fonctions non antioxydantes de la vitamine E.....	13
2.6 Concept nutritionnel et biochimique.....	14
2.6.1 Sources et apport nutritionnel.....	14
2.6.2 Carences en vitamine E.....	15
2.6.3 Toxicité.....	16
3 Vitamine E et pathologies liées à la carence en vitamine E.....	16
3.1 L'ataxie avec déficit en vitamine E (AVED).....	16
3.1.1 Définition.....	16
3.1.2 Etiologie.....	17
3.1.3 Physiopathologie.....	17
3.1.4 Description clinique.....	17
3.1.5 Méthodes de diagnostic biologique.....	18

3.1.6	Traitement	18
3.1.7	Diagnostic différentiel.....	18
3.2	Autres pathologies liées à la vitamine E	19
3.2.1	Vitamine E et système cardiovasculaire	19
3.2.2	La vitamine E et cancer de la prostate.....	20
3.2.3	Vitamine E et système hématopoïétique	20
3.2.4	L'inflammation et l'immunité	20
3.2.5	Vitamine E et système nerveux.....	20
3.2.6	Vitamine E et Alzheimer	21
3.2.7	Vitamine E et système musculaire.....	21
3.2.8	Vitamine E et infertilité masculine.....	21
3.2.9	Vitamine E et santé oculaires.....	22
3.2.10	Vitamine E et la stabilisation de la membrane cellulaire.....	22
3.2.11	Vitamine E et l'agrégation plaquettaire	23

CHAPITRE II : Validation Analytique

1	Définition	25
2	But de la validation.....	25
3	Aspects réglementaires et normatifs	25
4	Cycle de vie d'une méthode analytique	26
5	Critères de la validation analytique	27
5.1	Spécificité / sélectivité.....	27
5.2	Linéarité	28
5.3	Fidélité ou précision	28
5.4	Justesse (biais)	29
5.5	Exactitude	29
5.6	Sensibilité	29
5.7	Limite de détection	29
5.8	Limite de quantification	30
5.9	Robustesse.....	30
5.10	Profil d'exactitude	30
6	Les différentes approches de la validation	30
6.1	Approche descriptive	30
6.2	Approche globale.....	30

6.3	Approche de capabilité	31
7	Le choix du protocole de validation	31
8	Les étapes de la validation	34
9	Démarche statistique	34
9.1	Spécificité	34
9.2	Alignement des observations	36
9.3	Prédiction inverse	37
9.4	Calcul de la justesse et de la fidélité.....	39
9.4.1	Modèle.....	39
9.4.2	La justesse.....	41
9.4.3	La Fidélité	42
9.5	Calcul de l'exactitude.....	42
9.5.1	Erreur totale et profil de l'erreur totale	43
9.5.2	Calcul de l'intervalle de tolérance	44
9.5.3	Etablissement du profil d'exactitude	45
9.5.4	Le choix de la fonction de réponse.....	45
9.6	Linéarité des résultats	46
9.7	Limites de quantification	46

PARTIE EXPERIMENTALE

1	Matériels.....	50
1.1	Appareillages	50
1.2	Verreries et autres	51
1.3	Matières premières et réactifs	52
2	Méthode	52
2.1	Principe de la méthode.....	52
2.2	Choix des paramètres de validation	53
2.3	Choix de diluant	53
2.4	Le choix des niveaux de concentration.....	53
2.5	Optimisation de la méthode.....	53
2.6	Choix du protocole de validation	54
2.7	Conditions chromatographiques.....	55
3	Protocole expérimental.....	55
3.1	Préparations des solutions	55
3.1.1	Préparations des solutions stocks	55

3.1.1.1	Solution stock pour les standard d'étalonnage et les 3 niveaux supérieurs des standards de validation	56
3.1.1.2	Solution stock pour les 2 niveaux inférieurs des standards de validations.....	56
3.1.2	Préparation des standards d'étalonnages et des standards de validations.....	56
3.1.2.1	Préparation des dilutions (solutions mères) à partir des solutions stocks	56
3.1.2.2	Préparation du standard d'étalonnage	59
3.1.2.3	Préparation du standard de validation.....	59
3.2	Méthode d'extraction	60
4	Résultats	63
4.1	Chromatogrammes obtenus du dosage de la Vitamine E.....	63
4.2	Temps de rétention obtenus	64
4.3	Informations concernant les données brutes	64
4.4	Spécificité	64
4.4.1	Comparaison des chromatogrammes.....	64
4.5	Evaluation du rendement et du facteur d'extraction.....	66
4.6	Fonction de réponse	66
4.7	Profils d'exactitude obtenus	74
4.8	Choix de la fonction de réponse	76
4.9	Alignement des observations	76
4.10	Prédictions inverses.....	86
4.11	Justesse	78
4.12	Fidélité.....	78
4.13	Exactitude	79
4.14	Erreur totale et profil d'erreur totale	81
4.15	Intervalle de tolérance	82
4.16	Profil d'exactitude	82
4.17	Linéarité	83
4.18	Limites de quantification	84
5	Discussion	86
5.1	Spécificité	86
La spécificité est évaluée par comparaison des chromatogrammes.....	86	
5.2	Le choix de la fonction de réponse.....	86
5.3	Critères de performance de la fonction de réponse choisie.....	87
5.3.1	Justesse.....	87

5.3.2	Fidélité.....	88
5.4	Critères de décision sur la validation de la méthode	88
5.4.1	Erreur total.....	88
5.4.2	Profil d'exactitude.....	88
5.4.3	Limite de quantification et intervalle de dosage	88
5.5	Linéarité.....	89
6	Fiche technique de la méthode de dosage	90

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

- α -TTP** : Protéine de transfert d'alpha tocophérol
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AFNOR** : Association française de normalisation
- AGPI** : Acides gras poly insaturés
- APO E** : Apolipoprotéine E
- AVED** : Ataxie par déficit isolé en vitamine E
- CEHC** : Carboxy ethyl hydroxy chromone
- CHU** : Centre hospitalo universitaire
- CSH** : Cellule souche hématopoïétique
- CV** : Coefficient de variation
- DMLA** : Dégénérescence musculaire liée à l'âge
- FDA** : Organisation américaine des produits alimentaires et médicamenteux
- FROs** : Formes réactives de l'oxygène
- ECG** : Electrocardiogramme
- EMG** : Electromyogramme
- EROs** : Espèces réactives de l'oxygène
- GAA** : Guanine adénine adénine
- HDL** : Lipoprotéine de haute densité
- HPLC** : Chromatographie liquide de haute performance
- ICH** : Conférence internationale d'harmonisation
- ISO** : Organisation internationale de normalisation
- LDL** : Lipoprotéine de faible densité
- LD** : Limite de détection
- LQ** : Limite de quantification
- MCR** : Matériaux de référence rectifiée
- NPC1L1** : Proteines Niemann-Pick C1
- PCR-PFLP** : Polymerase chain reaction –restriction fragment length polymorphism
- PFC** : Plasma frais congelé
- PGE2** : Prostaglandines E2
- PKC** : Protéine kinase-C

RP : Phase inverse

SFSTP: Société française des sciences technologiques et pharmaceutiques

SR-B1 : Récepteurs de scavenger classe B type 1

TBARS : Marqueur de peroxydation des lipides

UV : Ultra-violet

Vit E : Vitamine E

VLDL : Lipoprotéine de très basse densité

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique des 4 tocophérols et des 4 tocotriénols avec leurs structures de base.	6
Figure 2 : Transport de la vitamine E au sein des lipoprotéines plasmatiques chez l'homme.	9
Figure 3 : Schéma explicatif du métabolisme de l'alpha tocophérol.	10
Figure 4 : Schéma explicatif du métabolisme de la Vit E.	11
Figure 5 : Action antiradicalaire de la vitamine E.	12
Figure 6 : Oxydation des tocophérols par réaction avec des radicaux peroxy.	12
Figure 7 : Cycle de vie d'une méthode analytique.	26
Figure 8 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.	32
Figure 9 : Schéma explicatif de la spécificité.	34
Figure 10 : Fidélité et justesse.	42
Figure 11 : Mode opératoire de validation.	61
Figure 12 : Chromatogramme de la Vitamine E sans matrice.	63
Figure 13 : Chromatogramme de la Vitamine E avec matrice.	63
Figure 14 : Chromatogramme du diluant non chargé.	64
Figure 15 : Chromatogramme de la Vitamine E dans le diluant (sans matrice).	65
Figure 16 : Chromatogramme de la Vitamine E dans le Plasma (avec matrice).	65
Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax + b$ (série 1).	67
Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax + b$ (série 2).	68
Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax + b$ (série 2).	68
Figure 20 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax$ (Série 1).	69
Figure 21 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax$ (Série 2).	70
Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax$ (Série 3).	70
Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 1).	71
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 2).	72
Figure 25 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 3).	72
Figure 26 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 1).	73
Figure 27 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 2).	74
Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 3).	74
Figure 29 : Profil d'erreur totale de la Vitamine E.	81
Figure 30 : Profil d'exactitude de la Vitamine E ($\beta = 85\%$ et $\lambda = 15\%$).	82
Figure 31 : Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Vitamine E.	83

Liste des tableaux

Tableau I : Propriétés physico-chimiques de l' α -tocophérol.	8
Tableau II : Sources de vitamine E dans l'alimentation.	14
Tableau III : Choix du nombre des standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.....	33
Tableau IV : Exemples de fonction de réponse.....	36
Tableau V : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses.....	37
Tableau VI : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse.....	38
Tableau VII : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée.....	39
Tableau VIII : Calcul de l'exactitude.....	43
Tableau IX : Appareillages utilisés dans ce présent travail.....	50
Tableau X : Verreries et autres matériels utilisés dans ce travail.	51
Tableau XI : Matières premières et réactifs utilisés.	52
Tableau XII : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.....	55
Tableau XIII : Préparation des dilutions de la gamme d'étalonnage à partir des solutions mères.	58
Tableau XIV : Préparation des dilutions de la gamme de validation à partir des solutions mères.	59
Tableau XV : Résultats de la superposition des chromatogrammes.	65
Tableau XVI : Résultats obtenus lors de l'évaluation du rendement.	66
Tableau XVII : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Vitamine E avec la fonction : $y = ax + b$ (sans matrice).	67
Tableau XVIII : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Vitamine E avec la fonction : $y = ax$ (sans matrice)	69
Tableau XIX : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Vitamine E avec la fonction : $\ln y = f(\ln x)$ (sans matrice).	71
Tableau XX : Résultats de la Vitamine E obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (sans matrice).	73
Tableau XXI : Profils d'exactitude obtenus pour la Vitamine E.	75
Tableau XXII : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour la Vitamine E.	77
Tableau XXIII : Concentrations calculées par prédiction inverse pour la Vitamine E.	87
Tableau XXIV : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour la Vitamine E.	78
Tableau XXV : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour la Vitamine E. 78	
Tableau XXVI : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour la Vitamine E.....	80
Tableau XXVII : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration de la Vitamine E.	81
Tableau XXVIII : Limites de tolérance de la Vitamine E.	82
Tableau XXIX : Évaluation statistique de la linéarité de la Vitamine E.....	83
Tableau XXX : calcule de la limite de quantification basse de la Vitamine E.....	84
Tableau XXXI : Conditions chromatographiques de la méthode.	90

INTRODUCTION

Introduction

INTRODUCTION

Reconnue au début du siècle comme un facteur de fécondité, l'intérêt pour la vitamine E a été relancé depuis ces dernières années par l'apparition de travaux expérimentaux, cliniques et épidémiologiques suggérant son rôle dans plusieurs pathologies neurologiques, cardiovasculaires, immunologiques ... (1).

La vitamine E joue ainsi un rôle fondamental dans le métabolisme normal de toutes les cellules. Elle possède une activité antioxydante physiologiquement essentielle pour prévenir la peroxydation des phospholipides membranaires qui semble avoir un intérêt majeur dans la lutte contre les troubles liés au stress oxydatif (2).

L'ataxie avec déficit en vit E « AVED » est l'une des indications importantes de dosage de la vit E. cette affection est fréquente dans le bassin méditerranéen, notamment algérien (3).

Cependant son dosage est rarement disponible dans les laboratoires algériens, d'où l'importance de développer une méthode de dosage simple, économique et réalisable en routine. C'est dans ce cadre que s'inscrit le travail réalisé au cours de notre projet de fin d'études, en vue de la mise au point et la validation d'une nouvelle méthode de dosage de la vitamine E par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de biochimie et chimie analytique du département de pharmacie de Tizi Ouzou, et cela conformément au protocole de validation analytique décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutique (SFSTP), publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

En effet, notre manuscrit est organisé en deux parties :

1. Une partie bibliographique présentant la vitamine E et la validation analytique.
2. Une deuxième partie expérimentale où la méthode de notre travail est décrite ainsi que les résultats obtenus, leur discussion et conclure à la fin la validité de la méthode utilisée.

OBJECTIFS

Objectifs

Objectifs

L'objectif du présent travail est la mise au point et validation d'une nouvelle méthode de dosage de la vitamine E dans le plasma humain par chromatographie liquide à haute performance en vue d'être appliquée en routine en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision, décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

Outre cet objectif principal, les objectifs secondaires assignés à notre travail sont :

- Meilleure connaissance des étapes critiques de la validation.
- Perfectionner l'utilisation de l'HPLC.

CHAPITRE I
LA VITAMINE E

1 Les vitamines

Parmi les nutriments nécessaires aux nombreuses fonctions physiologiques essentielles à la vie, on trouve les vitamines.

Les vitamines sont des substances organiques indispensables sans valeur énergétique propre, que l'homme ne synthétise pas ou en quantité insuffisante. Elles doivent donc être apportées par l'alimentation. Elles participent à la construction de l'organisme (croissance, développement du squelette...), au fonctionnement et à l'entretien du corps (transformation et utilisation des macronutriments, vision, coagulation du sang, systèmes musculaires, nerveux, immunitaire, fabrication d'ADN...). Elles sont divisées en deux groupes en fonction de leur solubilité : les vitamines liposolubles (A, D, E, K) qui sont particulièrement sensibles à la lumière et à l'oxydation, et les vitamines hydrosolubles [B1(Thiamine), B2(Riboflavine), B3(niacine), B5(acide pantothénique), B6(pyridoxine), B8(biotine), B9(Folate), B12(cobalamine) et C(acide ascorbique)], sont de leurs parts généralement plus sensibles à l'humidité, aux agents réducteurs, aux acides et aux bases.

Les vitamines peuvent être classées selon leurs fonctions physiologiques. On distingue les vitamines à action pseudo-hormonale (vitamines A et D), des vitamines ayant une fonction de coenzyme (vitamine B1, B2, B3, B5, B6 et B8), des vitamines impliquées dans le transfert inter- ou intramoléculaire de groupements (vitamines B9 et B12) ou ayant un rôle antioxydant (vitamines C et E).

La plupart des vitamines sont peu ou non toxiques. Deux vitamines justifient une surveillance particulière : les vitamines A et D. La vitamine A est considérée comme tératogène pendant le premier trimestre de grossesse. L'intoxication à la vitamine D a des conséquences graves (2).

2 Vitamine E

2.1 Définition

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs. Ce nom provient du grec tokos pour progéniture et pherein pour porter.

La vitamine E est une vitamine liposoluble (soluble dans les graisses) et insoluble dans l'eau ; le terme générique vitamine E regroupe deux grands groupes de molécules qui recouvre un

ensemble de huit molécules organiques, quatre tocophérols et quatre tocotriénols, qui sont respectivement: α -tocophérol, β -tocophérol, γ -tocophérol et δ -tocophérol, ainsi que l' α -tocotriénol, le β -tocotriénol, le γ -tocotriénol et le δ -tocotriénol. La forme la plus active biologiquement est l' α -tocophérol.

Cette vitamine jouit d'un certain nombre de particularités. C'est l'anti-oxydant majeur des milieux lipidiques (huiles, membranes biologiques, lipoprotéines), ce qui fait l'objet d'une large majorité des travaux effectués actuellement sur cette vitamine (4,5).

2.2 Structure et nomenclature

L'étude détaillée de la structure chimique de la vitamine E est importante pour la compréhension de la méthode d'analyse, de son métabolisme ainsi que de son mode d'action.

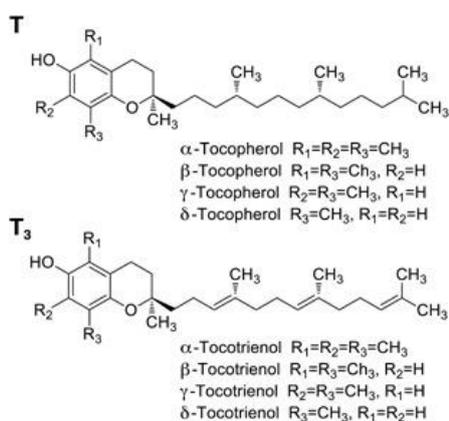


Figure 1 : Structure chimique des 4 tocophérols et des 4 tocotriénols avec leurs structures de base (6).

La structure commune présente deux parties : un noyau 6-OH-chromanol (chromanol) mono-, di-, ou tri-méthylé qui possède la fonction anti-oxydante, auquel se trouve rattachée à une chaîne latérale saturée de 16 atomes de carbone de structure isoprénique, celle-ci définissant deux grandes familles : les tocophérols à chaîne latérale saturée et les tocotriénols avec une chaîne latérale présentant trois doubles liaisons. Les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol.

Chaque forme de la vit E existant sous différentes formes stéréoisomériques dont une seule, parmi les huit formes possibles, est naturelle c'est la forme RRR.

La chaîne latérale détermine la lipophilicité et la stéréochimie de la molécule. C'est la stéréochimie de la molécule qui détermine à son tour la reconnaissance préférentielle de la forme RRR- α -tocophérol par un transporteur hépatique spécifique dont le rôle physiologique est aujourd'hui reconnu (5).

2.3 Propriétés physicochimiques

2.3.1 Solubilité

Tous les tocophérols se présentent, à température ambiante, sous la forme d'une huile visqueuse de coloration jaune pâle. Ils sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (éthers, acétone, chloroforme, méthanol, alcools méthyliques et éthyliques) (7,8).

2.3.2 Stabilité

Les propriétés qui font des tocophérols des antioxydants efficaces les rendent également instables dans des conditions aérobies. Ils sont facilement oxydés et peuvent être détruits par les peroxydes, l'ozone et le permanganate dans un processus catalysé par la lumière et accéléré par les AGPI et les sels métalliques. Ils sont résistants aux acides ; dans des conditions anaérobies, ils sont stables aux bases. Les esters de tocophérols et notamment l'acétate de α -tocophérol sont relativement stables ; ils sont donc les formes de choix pour les compléments alimentaires (7,8).

2.3.3 Propriétés spectrochimiques

Les tocophérols et leurs acétates ont des maximum d'absorption dans la gamme de 280 à 300 nm (α -tocophérol, 292 nm).

La capacité d'absorption d' α -tocophérol au spectrophotomètre UV-Visible est à 220 nm.

Leur fluorescence est importante (excitation : 294 nm ; émission : 330 nm), en particulier dans les solvants polaires (par exemple: l'éther diéthylique ou les alcools) (7).

Tableau I : Propriétés physico-chimiques de l' α -tocophérol (7).

Propriétés	α -tocophérol	
Masse molaire (g/mol)	430.71	
Solubilité	Organique	+
	H2O	-
Maxima d'absorption (nm)	292	
Fluorescence	Excitation (nm)	295
	Emission (nm)	320
Point de fusion (oC)	2.5	
Couleur/Forme	Jaune/Huile	

2.4 Métabolisme

2.4.1 Absorption intestinale

La vitamine E est apportée par l'alimentation sous différentes formes moléculaires.

La vitamine E étant lipophile, donc son absorption suit le flux des lipides alimentaires. Son taux d'absorption est évalué entre 20-80%.

Au niveau du tube digestif, la vitamine E est extraite et incorporée dans les micelles mixtes qui seront absorbés dans le duodénum par 2 mécanismes :

- Diffusion passive.
- Transport par récepteurs : la protéine SR-B1 et la protéine NPC1L1 (localisés dans le pôle apical des entérocytes) (9).

2.4.2 Transport et distribution

La vitamine E absorbée est incorporée dans les chylomicrons et HDL pour gagner la circulation sanguine.

Durant la lipolyse, la vitamine E est captée par les hépatocytes via les récepteurs LDL. Ensuite,

elle est incorporée aux VLDL, ce qui va permettre sa distribution aux tissus périphériques. Cette incorporation met en jeu la protéine α -TTP qui protège contre la dégradation et l'excrétion urinaire.

Une fraction de la vitamine E non transférée dans le foie subit de nombreux échanges entre les différentes classes de lipoprotéines et une autre distribuée aux différents tissus extra-hépatiques (10,11).

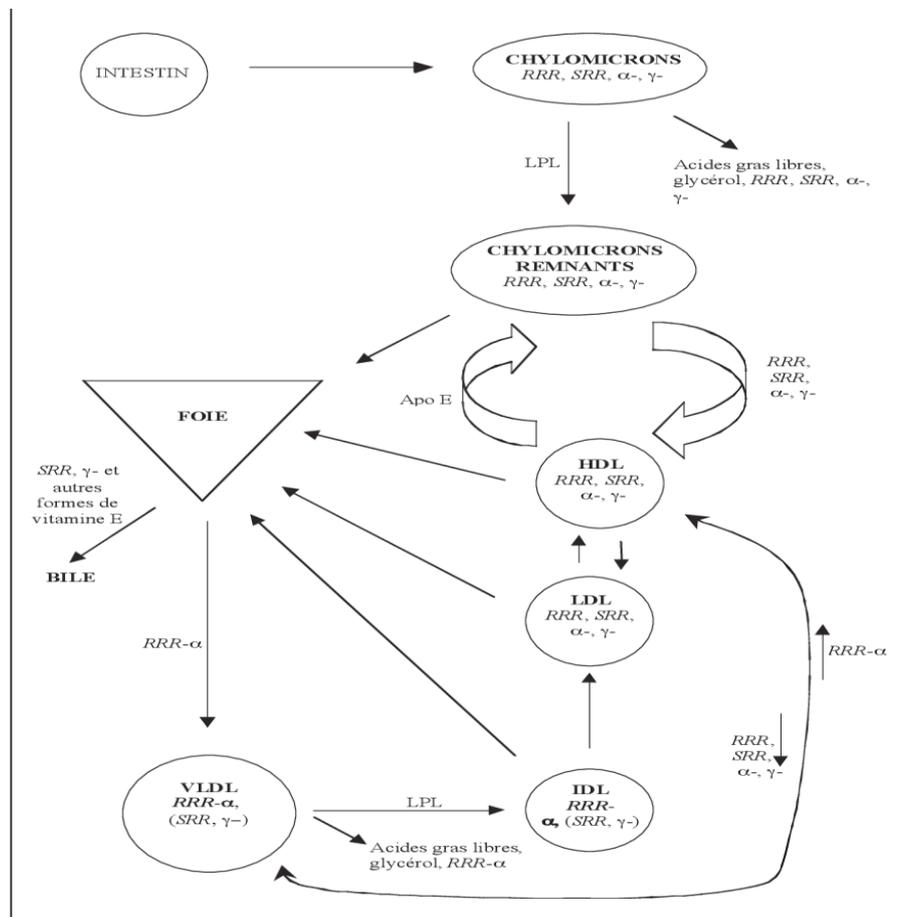


Figure 2 : Transport de la vitamine E au sein des lipoprotéines plasmatiques chez l’homme (12).

2.4.3 Catabolisme

Toutes les formes de vitamine E sont dégradées au niveau hépatique par un mécanisme commun d’ ω -hydroxylation, catalysée par des enzymes à cytochrome P450 4F2 suivie d’une β -oxydation.

Les métabolites finaux ainsi obtenus, le carboxyethyl hydroxy-chromanes et carboxyethyl

butyl hydroxy-chromane conservent leur noyau chromanol mais présentent une chaîne latérale raccourcie (13,14).

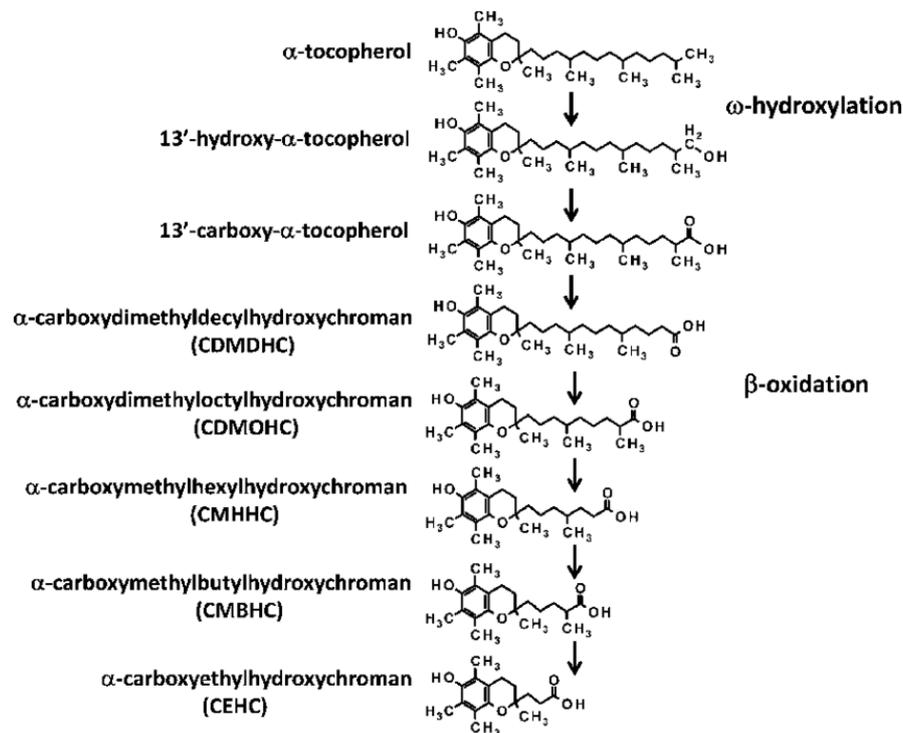


Figure 3 : Schéma explicatif du métabolisme de l'alpha tocophérol (15).

2.4.4 Elimination

Pendant le catabolisme, c'est sur la chaîne latérale que les modifications sont induites. Les métabolites à chaîne courte conjugués sont plus hydrophiles et se retrouvent donc principalement sous forme glucuronidée dans l'urine humaine. En revanche, les métabolites à longue chaîne et leurs précurseurs métaboliques sont sécrétés via la bile dans l'intestin et les métabolites dans les échantillons de selles ne sont pas conjugués. La voie fécale est considérée comme la principale voie d'excrétion de la Vit E (4).

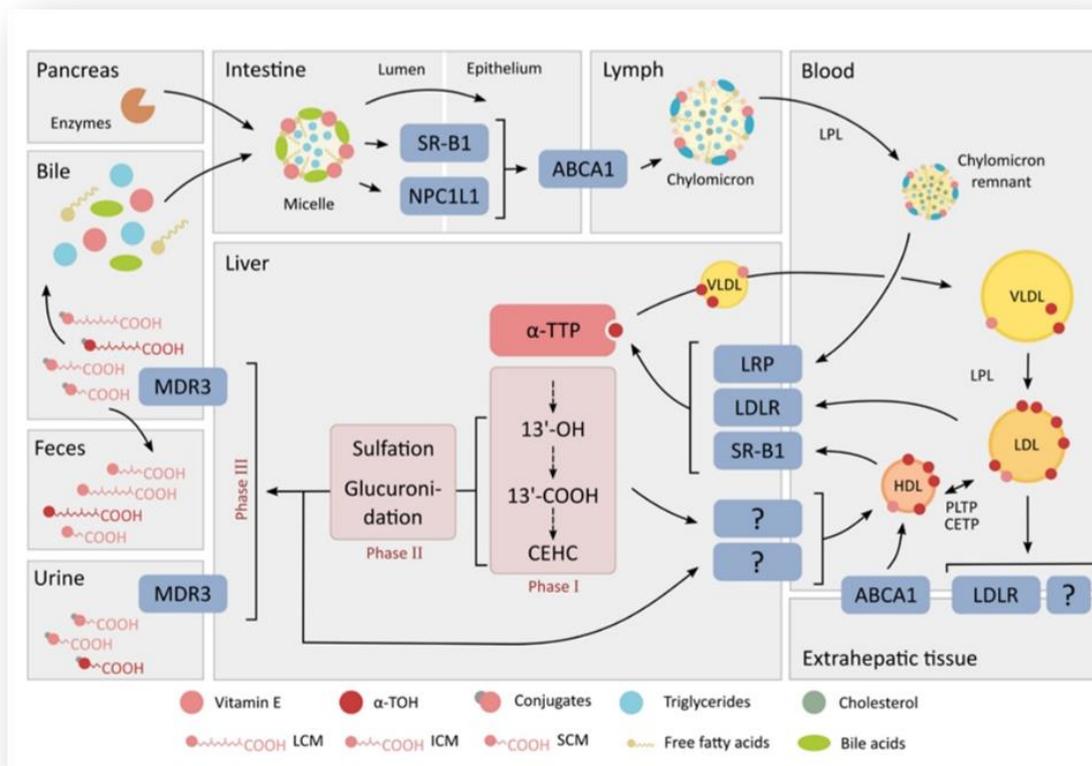


Figure 4 : Schéma explicatif du métabolisme de la Vit E (9).

SR-B1: récepteur scavenger classe B1; **NPC1L1:** Niemann-Pick C1-like protein 1; **ABCA1:** transporteur de la famille des ATP cassette; **HDL:** lipoprotéine de haute densité; **VLDL:** lipoprotéine de très basse densité; **LDL:** lipoprotéine de faible densité; **LDLR:** récepteurs de LDL; **LRP:** protéine liée aux récepteurs de lipoprotéine; **α -TTP:** protéine de transfert d'alpha tocophérol; **LPL:** lipoprotéine lipase; **PLTP:** protéine de transfert des phospholipides; **CETP:** protéine de transfert d'ester de cholestérol; **13'-OH:** 13 hydroxy chromanol; **13'-COOH:** 13 hydroxy carboxy chromanol; **CEHC:** carboxyethyl hydroxychromanol.

2.5 Mécanisme d'action

2.5.1 La vitamine E en tant qu'anti oxydant biologique

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre prononcé entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers et de leurs effets potentiellement néfastes. Le principal rôle nutritionnel de la vitamine E est celui d'un antioxydant biologique, grâce à sa capacité d'inhibition des peroxydations lipidiques.

En réduisant les radicaux libres, il protège contre les réactions potentiellement délétères de ces espèces oxydantes hautement réactives, et a donc une importance fonctionnelle dans le maintien de l'intégrité des membranes dans toutes les cellules de l'organisme.

Il est utile d'identifier la position de la vitamine E parmi les mécanismes de défense contre les formes réactives de l'oxygène (FROs) :

- ❖ La prévention des phénomènes oxydants ;
- ❖ L'inactivation des FROs en les transformant en éléments stables et par la captation de l'électron radicalaire : éléments hydrophiles (acide ascorbique, glutathion, etc) et éléments hydrophobes (vitamine E, caroténoïdes, flavonoïdes, ubiquinol, bilirubine, mélatonine).

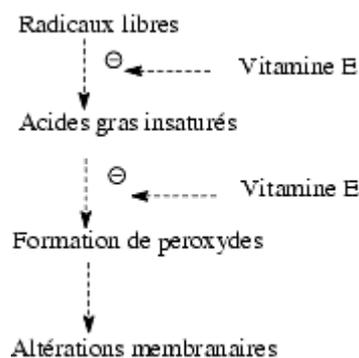


Figure 5 : Action antiradicalaire de la vitamine E (16).

- ❖ La réparation des lésions induites par les FROs (endonucléases, glycosylases, etc) (5,7).

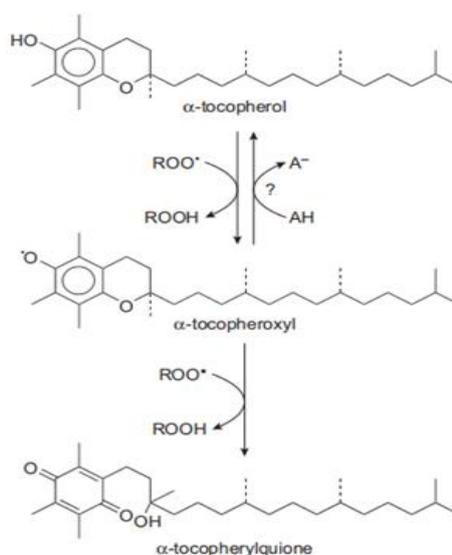


Figure 6 : Oxydation des tocophérols par réaction avec des radicaux peroxy (7).

2.5.2 Relation structure activité

La caractéristique structurelle obligatoire pour une activité biologique de la vitamine E (propriétés anti oxydantes) est une liaison hydroxyle ou ester libre en C-6 du noyau chromanol.

Cette activité anti oxydante est modulée par une méthyl-substitution, la perte des groupements méthyles comme dans les β , γ et δ tocophérols diminue significativement l'activité, en revanche, elle ne dépend pas de la stéréochimie de la molécule.

L'activité de la vitamine E est exprimée à différents degrés par plusieurs isomères de la chaîne latérale et analogues méthylés du tocophérol et du tocotriénol. La configuration épimérique en position 2 étant importante pour déterminer l'activité biologique (7,17,18).

2.5.3 Potentiel pro oxydant de la vitamine E

L' α -tocophérol peut également favoriser la peroxydation lipidique dans les LDLs en l'absence d'autres antioxydants (par exemple, l'acide ascorbique, coenzyme Q10, urate). Dans ces conditions, l'oxydation à électron unique du tocophérol le transforme en radical tocophéroxyl qui se déplace dans le noyau de la particule où il peut extraire l'hydrogène d'un cholestérol pour produire un radical peroxyde.

La présence d'antioxydants secondaires est nécessaire pour empêcher l'oxydation des LDLs. Sinon, la vitamine E devient un agent de transfert de chaîne qui propage la peroxydation des lipides dans le noyau lipidique (peroxydation lipidique). En conséquence, une dose très élevée (1050 mg/jour) d' α -tocophérol augmente la sensibilité à la peroxydation (7).

2.5.4 Fonctions non antioxydantes de la vitamine E

Des recherches ont démontré des effets antiprolifératifs, pro-apoptotiques, anti-inflammatoires et anti-angiogéniques des tocophérols et tocotriénols qui ne semblent pas impliquer leurs fonctions antioxydantes.

Régulation enzymatique : Pour plusieurs enzymes, l' α -tocophérol semble participer à un recrutement complexe au niveau de la membrane, processus affectant les fonctions cellulaires par inhibition de la PKC, NADPH oxydase, phospholipase A2, et activation de la protéine phosphatase 2A, de la diacylglycérol kinase et de l'HMG-CoA réductase.

Expression génique : La vitamine E semble également participer à la régulation transcriptionnelle. Les effets transcriptionnels de l' α -tocophérol impliquent l'existence de récepteurs nucléaires du tocophérol et d'éléments correspondants sensibles à l'ADN.

L' α -tocophérol semble également affecter l'expression des gènes de manière post transcriptionnelle en affectant l'expression de petits gènes non spécifiques. Par conséquent, elle est impliquée dans la régulation d'une variété de processus cellulaires, tout en induisant son propre transport et son catabolisme, qui sont tous deux significativement affectés par le statut oxydant/antioxydant et l'apoE (7).

2.6 Concept nutritionnel et biochimique

2.6.1 Sources et apport nutritionnel

Les sources alimentaires de vitamine E sont soit d'origine végétale, soit d'origine animale :

- Les produits d'origine **végétale** constituent la source majeure de vitamine E, les éléments les plus riches étant les céréales (seigle, blé, avoine...) et les huiles (olive, soja, tournesol, maïs, olive, arachide...).

Tableau II: Sources de vitamine E dans l'alimentation (4).

Apport alimentaire et recommandé	Teneur en alpha-tocophérol (mg / portion)	Pourcentage de la valeur quotidienne
Huile de germe de blé, 1 cuillère à soupe	20,3	100
Graines de tournesol, grillées à sec, 30g	7,4	37
Amandes, grillées à sec 30g	6,8	34
Huile de tournesol, 1 cuillère à soupe	5,6	28
Huile de carthame, 1 cuillère à soupe	4,6	25
Noisettes, grillées à sec, 30g	4,3	22
Beurre de cacahuète, 2 cuillères à soupe	2,9	15

- Les céréales contiennent généralement 4 formes de tocophérol et très souvent aussi des tocotriénols. Il apparaît que la concentration en α -tocophérol est relativement faible par rapport à celle en tocotriénols.
 - Les huiles végétales constituent la meilleure source de tocophérols/ tocotriénols.
 - Les fruits et légumes sont également des sources de vitamine E, mais dans une moindre mesure.
- Au niveau des produits d'origine animale, il faut signaler que la vitamine E est présente essentiellement sous forme d' α -tocophérol mais en quantité assez restreinte dans les tissus animaux (muscles et organes). Dans le lait de vache, la forme α -tocophérol est largement prédominante. La richesse en vitamine E du lait et des produits qui en dérivent dépend de l'alimentation des vaches (4,5).

2.6.2 Carences en vitamine E

L'organisme a besoin de la vitamine E pour fonctionner comme toutes autres substances essentielles, elle est liposoluble; Par conséquent il faut que les matières grasses du régime alimentaire soient bien absorbées. Les carences en vitamine sont souvent les conséquences de malabsorption digestives, qui peuvent être dues à certaines anomalies à savoir un problème hépatique.

La vitamine E est absorbée au niveau de l'intestin grâce à la présence de selles biliaire (bile) qui emmagasine certaines vitamines, et de lipase pancréatique, puis elle est transportée vers le foie et elle est à nouveau libérée dans la circulation sanguine pour rejoindre les organes cibles, et être stockée dans les tissus adipeux et les muscles.

En effet, toute affection hépatobiliaire, peut mettre en jeu un défaut dans l'absorption de la vitamine E et donc engendrer un déficit qui peut être sévère.

La carence en vitamine E est rare; La valeur physiologique est habituellement comprise entre 6,75-15,73 mg/L, cette valeur peut varier en fonction de l'âge.

Un taux bas de vitamine E peut engendrer :

- ❖ Une faiblesse musculaire.
- ❖ Problème de coordination et de marche.
- ❖ Des engourdissements et des picotements.
- ❖ Une détérioration de la vision.
- ❖ Des problèmes du système immunitaire.

La faiblesse musculaire et le problème de coordination et de marche sont des signes neurologiques qui peuvent causer des dommages dans le système nerveux central et périphérique (4).

2.6.3 Toxicité

Des quantités relativement importantes de Vit E ne causent habituellement pas de troubles, mais parfois une faiblesse musculaire, une fatigue et une diarrhée.

La toxicité de la Vit E est basée sur l'historique d'utilisation des suppléments de Vit E et sur les symptômes.

- Une supplémentation alimentaire en Vit E > 2000 mg/j peut augmenter de manière significative le risque de cancer de la prostate parmi les hommes en bonne santé.
- Une supplémentation à des doses >1000 mg/j peut interférer avec la coagulation sanguine, provoquer des hémorragies et entraîner un AVC (11,19–21).

3 Vitamine E et pathologies liées à la carence en vitamine E

3.1 L'ataxie avec déficit en vitamine E (AVED)

3.1.1 Définition

L'ataxie par déficit en vitamine E (AVED) est une maladie autosomique récessive très invalidante, avec un phénotype semblable à l'ataxie de Friedreich. Elle est associée à un défaut de la protéine de transfert de l'alpha-tocophérol codée par le gène TTPA (22,3).

3.1.2 Etiologie

Cette maladie est associée à un défaut dans une protéine hépatique qui intervient dans le transfert de l'alpha-tocophérol (l'alpha-tocophérol transfer protein « α -TTP»), et qui est responsable du recyclage de la vitamine E, cette protéine est codée par un gène TTPA localisé sur le bras long du chromosome 8 (23).

3.1.3 Physiopathologie

Les patients AVED ont une absorption intestinale normale de la vitamine E mais, en raison de l'absence d' α -TTP, qui est une protéine hépatique cytosolique supposée impliquée dans le transport intracellulaire de l'alpha-tocophérol. L'incorporation intra-hépatocytaire de la vitamine E dans les lipoprotéines de très basse densité (VLDLs) avant sa libération dans la circulation sanguine est défectueuse, ce qui entraîne une réduction importante des taux de vitamine E sériques. À l'heure actuelle, la base pathogénique de ces ataxies semble impliquer deux grands types de processus :

les lésions radicalaires et les défauts de réparation des cassures simple ou double brin de l'ADN (23,24).

3.1.4 Description clinique

Le phénotype et la gravité de l'ataxie avec carence en vitamine E (AVED) sont très variables. Bien que l'âge d'apparition et l'évolution de la maladie tendent à être plus uniformes au sein d'une même famille, les symptômes et la gravité de la maladie peuvent varier d'une fratrie à l'autre.

Les premiers symptômes sont une ataxie progressive, une maladresse des mains et une perte de proprioception, notamment de la vibration et de la sensation de position des articulations. L'écriture manuscrite se détériore. Chez de rares individus, les performances scolaires diminuent secondairement à la perte des capacités intellectuelles. Les réflexes tendineux des membres inférieurs sont généralement absents et les réflexes plantaires augmentent en intensité. Un pourcentage élevé de personnes atteintes (par exemple, 8/11 personnes dans une série) ont une acuité visuelle réduite.

Chez de nombreux individus, des signes cérébelleux tels que la dysdiadochokinésie et la dysarthrie avec un schéma d'élocution en balayage sont présents. Un tiers des individus présentent un tremblement de tête caractéristique (titubation de la tête). Chez certaines

personnes, des épisodes psychotiques, un déclin intellectuel et des épisodes dystoniques ont été décrits. Dans de rares cas, l'AVED peut se manifester par une dystonie du bras ou du cou.

La plupart des personnes non traitées deviennent dépendantes d'un fauteuil roulant en raison de l'ataxie et/ou de la faiblesse des jambes entre 11 et 50 ans (25).

3.1.5 Méthodes de diagnostic biologique

Le diagnostic moléculaire est basé essentiellement sur un moyen génétique utilisant un test PCR. Une mutation c.744delA dans le gène TTPA, étant quasi exclusivement responsable du phénotype AVED (3).

3.1.6 Traitement

Le traitement consiste en une supplémentation en vitamine E jusqu'à 800 mg/jour. L'administration de suppléments de vitamine E a permis d'arrêter la progression des symptômes et des signes neurologiques chez la plupart des patients et d'améliorer les anomalies neurologiques établies chez certains d'entre eux. Dans d'autres cas, il n'y a pas eu d'amélioration. L'étendue de la récupération est clairement liée au moment où la thérapie est commencée: plus le déficit est avancé, plus la réponse à la thérapie est limitée. Cela suggère qu'une caractérisation génétique rapide de l'AVED peut entraîner un traitement efficace précoce de la maladie. Par conséquent, le diagnostic précoce de la carence en vitamine E peut apporter une amélioration considérable de la qualité de vie des patients atteints d'AVED (23).

3.1.7 Diagnostic différentiel

Le principal diagnostic différentiel reste l'ataxie de Friedreich car les deux affections partagent le même phénotype. Les premiers signes apparaissent en général à l'âge de 10-15 ans (et toujours avant 25 ans). Cliniquement, l'association d'une ataxie progressive et d'une dysarthrie rendant l'élocution très difficile survenant chez un sujet jeune est évocatrice. L'électromyogramme (EMG) montre la présence d'une neuropathie axonale sensitive. On trouve aussi une perte des réflexes ostéo-tendineux et de la sensibilité profonde. Ces signes, liés principalement à une dégénérescence des fibres sensibles des cordons postérieurs de la moelle et des faisceaux spino-cérébelleux, évoluent de manière progressive et entraînent la perte de la marche vers l'âge de 20-25 ans en moyenne. Dans la quasi-totalité des cas, l'échographie cardiaque et l'électrocardiogramme (ECG) sont anormaux en raison de

l'existence d'une cardiomyopathie hypertrophique (qui peut être discrète). La scoliose est fréquente.

Enfin, les patients présentent un risque accru de diabète.

Le diagnostic repose sur l'étude de l'ADN qui permet de mettre en évidence l'expansion du triplet GAA caractéristique, cette expansion pouvant être présente sur les deux allèles. La découverte du gène responsable a permis d'élargir le spectre clinique en particulier des formes de l'adulte (âge de début jusqu'à 70 ans) et à des patients avec conservation des réflexes ostéotendineux aux membres inférieurs (26,27).

3.2 Autres pathologies liées à la vitamine E

3.2.1 Vitamine E et système cardiovasculaire

Il existe des arguments de plus en plus nombreux pour penser que l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) joue un rôle important dans l'athérogenèse.

Le catabolisme des LDLs oxydés se fait par la voie des macrophages ou ils sont mieux captés que les LDLs non oxydés, ce qui conduit à la formation des cellules spumeuses contenant des lipides que l'on trouve dans les premiers stades de l'athérogenèse. Ils pourraient également avoir un effet cytotoxique sur les cellules endothéliales, par conséquent une augmentation de la vasoconstriction artérielle.

Étant riches à la fois en cholestérol et en AGPI, les LDLs sont sensibles à la peroxydation par les espèces réactives de l'oxygène.

La vitamine E est un puissant antioxydant liposoluble présent dans les LDLs, elle inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses in vitro et elle augmente la résistance des LDLs à l'oxydation.

Il existe un risque accru de maladies cardiovasculaires chez les sujets dont les apports de vitamine E sont les plus faibles, ou chez ceux dont les taux sériques de vitamine E (ajustés au taux de cholestérol) sont les plus bas. Alors qu'une supplémentation en vitamine E prévient le risque de coronaropathie.

Des données indiquent que la vitamine E peut également réduire l'adhérence et l'agrégation des plaquettes, pour retarder la progression d'une strie graisseuse et de la prolifération cellulaire vers des lésions avancées (1, 7, 28).

3.2.2 La vitamine E et cancer de la prostate

Les espoirs étaient grands de trouver dans la prise de vitamine E un moyen de prévenir le cancer de la prostate. Malheureusement les études ont montrées que les personnes qui sont sous vitamine E sont les plus affectées. Les auteurs concluent que la supplémentation en vitamine E, contrairement à ce que l'on espérait, augmente significativement le risque de cancer de la prostate (29).

3.2.3 Vitamine E et système hématopoïétique

La vitamine E joue un rôle primordial dans le maintien de l'état primitif des cellules CD34+ de sang placentaire.

Le maintien de l'activité de CSH est lié à son état métabolique anaérobie, à savoir une faible activité de phosphorylation oxydative et une forte activité glycolytique. Des études ont montrés un effet inhibiteur de l'alpha-tocophérol de manière dose-dépendante, sur la phosphorylation oxydative des cellules CD34+ de sang placentaire.

La vitamine E à dose élevée diminue l'activité de la cyclo-oxygénase, la coagulation thromboxane-dépendante et les facteurs II et VII de la coagulation. Elle peut donc aussi potentialiser les effets anticoagulants de l'aspirine. Ainsi, un traitement par vitamine E au long cours impose une surveillance de la coagulation (10,30).

3.2.4 L'inflammation et l'immunité

La vitamine E, un puissant antioxydant liposoluble, présent en plus forte concentration dans les cellules immunitaires par rapport aux autres cellules du sang, est l'un des nutriments les plus efficaces connus pour moduler la fonction immunitaire. La vitamine E module la fonction des cellules T en ayant un impact direct sur l'intégrité de la membrane des cellules T, la transduction du signal et la division cellulaire, et aussi indirectement en affectant les médiateurs inflammatoires générés par d'autres cellules immunitaires tels que les cytokines pro-inflammatoires et PGE2. Il a été démontré qu'une carence en vitamine E altère les fonctions normales du système immunitaire (30).

3.2.5 Vitamine E et système nerveux

La vitamine E est essentielle à la fonction neurologique. Elle est conservée par les tissus neuronaux, vers lesquels elle est redistribuée à partir d'autres tissus dans des conditions de

carence. Les neurones sont susceptibles de subir les effets délétères du stress oxydatif. Ils contiennent de grandes quantités d'AGPI et de fer, mais ne disposent pas de systèmes de défense antioxydants étendus. Ils sont différenciés en phase terminale et ne peuvent se répliquer lorsqu'ils sont endommagés. Des dommages neuronaux de type parkinsonien ont été constatés après exposition à des médicaments qui génèrent des espèces réactives d'oxygène.

Des études épidémiologiques ont montré qu'un apport élevé en vitamine E était associé à une réduction des risques de la maladie d'Alzheimer et de la maladie de Parkinson (7).

3.2.6 Vitamine E et Alzheimer

De nombreux éléments de preuve suggèrent que le stress oxydatif est important dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. En particulier, la β -amyloïde, que l'on trouve en abondance dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, qui est toxique pour les cellules neuronales par un mécanisme impliquant des radicaux libres. En raison du potentiel antioxydant de la vitamine E qui protège les lipides de la peroxydation dans les membranes, il a été suggéré qu'une supplémentation en vitamine E serait bénéfique dans la maladie d'Alzheimer. En plus de leurs propriétés antioxydantes, les molécules de la famille de la vitamine E exercent des activités neuroprotectrices, anti-inflammatoires et hypocholestérolémiques (31,32).

3.2.7 Vitamine E et système musculaire

Les troubles des muscles squelettiques, dont la sarcopénie, sont fréquents au cours du processus biologique complexe du vieillissement. La perte de masse et de force musculaires couramment observée dans la sarcopénie est induite par une altération de l'innervation neuromusculaire, une transition du type de fibre musculaire squelettique et une capacité de régénération musculaire réduite, toutes attribuables à une inflammation chronique, au stress oxydatif et à un dysfonctionnement mitochondrial. Grâce à la capacité antioxydante et anti-inflammatoire de la vitamine E, elle peut atténuer le dysfonctionnement squelettique associé à l'âge et améliorer la régénération musculaire, atténuant ainsi la sarcopénie (33).

3.2.8 Vitamine E et infertilité masculine

Pro- et anti-oxydants sont en équilibre dans l'environnement du spermatozoïde. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des produits physiologiques du métabolisme cellulaire, indispensables à l'acquisition du pouvoir fécondant. Toutefois, des facteurs endogènes et

exogènes peuvent rompre cet équilibre, en stimulant la production des EROs et/ou en diminuant les défenses anti-oxydantes ce qui provoque des anomalies structurales des spermatozoïdes et une réduction de la capacité de conjugaison spermatozoïdes-ovocytes, ce qui entraînerait une réduction du taux de la fécondation, situation qualifiée de stress oxydant. Le stress oxydant est aujourd'hui décrit comme une des causes majeures de l'infertilité masculine.

La vitamine E a une capacité antioxydante en inactivant les EROs et en piégeant les radicaux libres mais va aussi interagir directement avec les composants des membranes. Elle va donc avoir un effet direct sur la qualité du sperme. Une faible concentration en vitamine E dans le sperme se traduit par l'altération de l'ADN des spermatozoïdes. Chez l'animal, une carence en vitamine E entraîne une déplétion des testicules en cellules germinales, une diminution de production de sperme et une dégénérescence testiculaire. la supplémentation en vitamine E à un effet bénéfique sur la qualité du sperme selon plusieurs études chez l'animal et chez l'homme infertile: diminution de la quantité des TBARS dans le plasma séminal avec amélioration de la mobilité et la vitesse des spermatozoïdes, augmentation de leur concentration et diminution des spermatozoïdes anormaux.

À l'inverse, un excès de vitamine E a des effets délétères sur la fertilité masculine, ce qui provoque l'augmentation de la concentration d' α -tocophérol dans le sperme qui, à son tour, a une influence négative sur les paramètres spermatiques : diminution du nombre total de spermatozoïdes et augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux (34,35).

3.2.9 Vitamine E et santé oculaires

La vitamine E peut protéger les cellules des yeux contre les dommages causés par les radicaux libres qui dégradent les tissus oculaires sains.

Parmi les affections ophtalmologiques liées à cela, on trouve : la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) qui est une maladie dégénérative de la rétine, et la cataracte qui correspond à l'opacification du cristallin dans l'œil.

La vitamine E réduit la progression de la DMLA et retarde la formation de cataracte (4).

3.2.10 Vitamine E et la stabilisation de la membrane cellulaire

Les tocophérols sont des composés indispensables de la bicouche lipidique des membranes biologiques, une diminution de leur quantité entraîne des altérations structurelles et

fonctionnelles des membranes. Et grâce à sa chaîne latérale, la vitamine E participe à la stabilisation structurale de la membrane.

La vitamine E participe à la formation et à la structure des phospholipides membranaires. Elle s'encastre dans les poches des doubles liaisons cis de l'acide arachidonique et se lie à l'ester d'acide gras.

Ainsi la vitamine E supprimerait un certain nombre de perturbations au niveau membranaire induites par les produits de l'hydrolyse des phospholipides, telles que l'augmentation de la perméabilité membranaire, l'inhibition de l'activité de certaines protéines par la phospholipase A2 (18,36).

3.2.11 Vitamine E et l'agrégation plaquettaire

L'hyperagrégabilité plaquettaire est un facteur important dans le développement de l'athérosclérose et d'autres maladies vasculaires. La vitamine E interviendrait sur ce facteur en inhibant d'une part l'agrégation plaquettaire et d'autre part la production des prostaglandines qui stimule cette agrégation.

L' α -Tocophérol inhibe l'agrégation des plaquettes humaines par un mécanisme dépendant de la PKC, à la fois in vitro et in vivo et retarde la formation de thrombus intra-artériels.

Les plaquettes sont particulièrement riches en vitamine E, un déficit induit des microthromboses. Ainsi la vitamine E diminuerait l'activité de la lipoxigénase des plaquettes (18,36,37).

CHAPITRE II
VALIDATION ANALYTIQUE

1 Définition

Selon la norme ISO 17025 : il s'agit de la « confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » (44).

2 But de la validation

L'utilisation de toute méthode analytique vise de façon générale à pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que l'on cherche à déterminer. En d'autres termes, les résultats fournis par la méthode doivent être tels que la différence, entre la valeur obtenue et la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon, soit la plus petite possible, ce qui permette aux laboratoires et aux autorités compétentes d'appréhender l'erreur totale et de minimiser le risque (38).

3 Aspects réglementaires et normatifs

De nombreux textes réglementaires à portée régionale ou internationale ont été édictés sur la validation des méthodes analytiques; et constituent des références légales on peut citer ; les guidelines ICH particulièrement le guideline ICH Q2(R1) publié en 2005 : « validation of Analytical Procedures : Text and Methodology » ce document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement, c'est une exigence réglementaire ; il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires comme les guides de validation analytique de la SFSTP (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques) (39,40).

- Documents ISO 17025
- Documents ISO 5705
- Documents de FDA
- Documents AFNOR
- Documents ICH

4 Cycle de vie d'une méthode analytique

Comme le présente la figure ci-dessous une procédure analytique peut se décomposer essentiellement en quatre phases successives exposées sous forme d'un cycle :

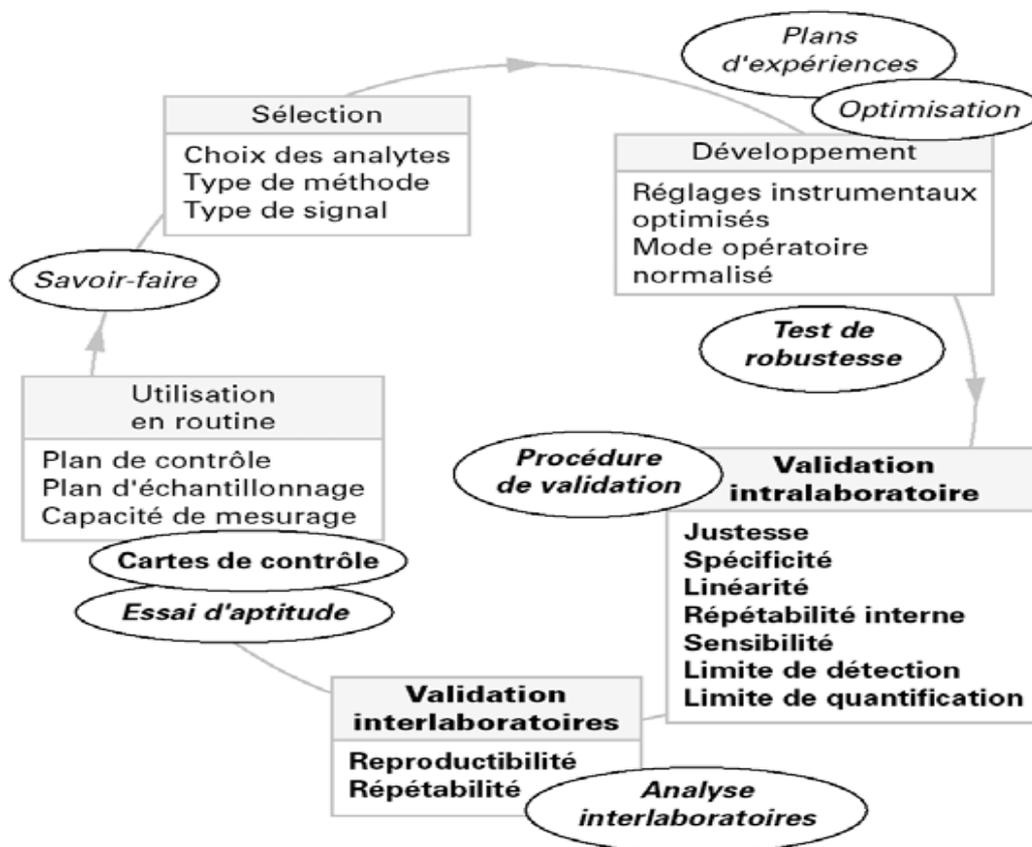


Figure 7 : Cycle de vie d'une méthode analytique (41).

- a) **Phase de sélection** : c'est une étape qui permet de définir les conditions opératoires initiales (choix des analytes, type de méthode, outils, type de signal...).
- b) **Phase de développement** : optimisation, robustesse, plan d'expérience, description de la procédure....
- c) **Phase de validation** : Spécificité, Répétabilité interne/Fidélité intermédiaire (une caractérisation intra-laboratoire et au besoin interlaboratoire), Justesse, Linéarité, Limite de détection/ Limite de quantification ; Reproductibilité...

- d) **Phase d'application (utilisation en routine)** : planification des contrôles, essais d'aptitude, capacité de mesure, plan d'échantillonnage...

En effet, pour le développement d'une nouvelle procédure d'analyse, la validation de cette dernière est donc un élément important qui doit être envisagé (42, 43).

Rappelons toutefois que l'objectif de la procédure analytique n'est pas sa validation mais bien son utilisation en routine. Par conséquent, cet usage en routine doit nécessairement s'accompagner de la mise en place d'un système de contrôle de qualité dans le but d'une part valider les résultats obtenus sur les différents échantillons, et d'autre part le contrôle de la pérennité des performances de la procédure lors de son exploitation (44).

5 Critères de la validation analytique

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont :

- Spécificité-sélectivité
- Linéarité
- Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)
- Justesse
- Exactitude
- Sensibilité
- Limite de détection
- Limite de quantification
- Robustesse
- Profil d'exactitude

5.1 Spécificité / sélectivité

Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser. Il s'agit de démontrer que la ou les substance(s) quantifiée(s) au sein de la matrice sont bien le ou les analyte (s) recherché(s)

Dans tous les cas, la spécificité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à la validation à ne pas donner de réponse quand la cible n'est pas présente (44).

5.2 Linéarité

Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats proportionnels à la quantité en analyse à doser dans l'échantillon pour laboratoire.

Le terme « linéarité » concerne la relation entre les concentrations calculées à l'aide de la fonction d'étalonnage et les concentrations théoriques. L'étude de la linéarité est en fait une évaluation du biais de justesse (44).

5.3 Fidélité ou précision

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essai d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (inter-laboratoires).

La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. La mesure de fidélité est calculée à partir de l'écart type des résultats d'essais.

Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées. Peuvent ainsi être distinguées les conditions de :

- **Répétabilité** : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

- **Fidélité intermédiaire** : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.

- **Reproductibilité** : conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents (44,45).

5.4 Justesse (biais)

La justesse exprime la différence entre un ensemble de valeurs mesurées à l'infini et une valeur de référence. La vraie valeur de la justesse est déterminée par rapport à un matériau de référence certifié (MRC). Dans le cas d'absence de MRC, une valeur qui est acceptée comme une valeur conventionnellement vraie peut être utilisée (44).

5.5 Exactitude

L'exactitude sera déterminée par comparaison d'une valeur de concentration théorique avec la valeur expérimentale (44).

5.6 Sensibilité

La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte.

Ou autrement dit, elle correspond au pourcentage de résultats positifs trouvés parmi les résultats positifs attendus.

Dans tous les cas, la sensibilité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à validation à donner une réponse positive quand la cible est présente (44).

5.7 Limite de détection

Elle correspond à la plus petite concentration de la substance pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Autrement dit, il s'agit de la limite en-dessous de laquelle l'analyte est considéré comme "non détecté" (44).

5.8 Limite de quantification

Elle correspond à la plus petite concentration de la substance pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode (44).

5.9 Robustesse

Qualité d'une méthode capable de donner des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables dans des conditions diverses (44).

5.10 Profil d'exactitude

- Selon la norme ISO 17025 : combinaison, présentée sous forme graphique, d'un ou de plusieurs intervalles de tolérances au niveau β calculés à différentes concentrations, et d'un ou de plusieurs intervalles d'acceptation (44).

- ❖ L'intervalle de confiance (IC) déterminé au risque α % est un intervalle de valeurs qui a $(1-\alpha)$ % de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé.
- ❖ L'intervalle de tolérance est l'intervalle dans lequel on s'attend à avoir une proportion ($\beta\%$) des futurs résultats.

6 Les différentes approches de la validation

6.1 Approche descriptive

C'est l'approche la plus couramment utilisée. Il existe plusieurs manières de valider une méthode de dosage par ses critères de performance; essentiellement la fidélité et la justesse.

Cette approche présente comme principal avantage, d'être une procédure facile à réaliser. En opposition, elle ne permet aucune gestion du risque si elle est utilisée seule (46).

6.2 Approche globale

Fondée sur le concept d'erreur totale (la méthode du profil d'exactitude) constitue une nouvelle approche qui se base sur des critères décisionnels objectifs. Une bonne méthode de dosage doit minimiser la différence entre le résultat rendu et la vraie valeur, ou au moins inférieur à la

limite d'acceptation fixée par l'analyste en fonction de la finalité de la méthode telle qu'elle sera utilisée en routine. Cette approche permet aux laboratoires de valider leurs méthodes et estimer leur incertitude de mesure associée (46,47).

6.3 Approche de capabilité

La capabilité est un indicateur de qualité largement utilisé dans l'industrie pour analyser la performance d'une méthode analytique en routine. C'est une approche mise en place pour éviter le rejet à tort des produits acceptables du fait de l'erreur de dosage (46).

7 Le choix du protocole de validation

Le guide SFSTP propose plusieurs protocoles de validation. Le choix du protocole se fait en fonction des connaissances antérieures de la procédure de dosage (la présence ou non de l'effet matrice).

Si ces connaissances sont non disponibles, une pré-validation sera nécessaire.

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode analytique, on prépare deux gammes de standards :

Standards d'étalonnage (SE): Solutions de concentrations connues, préparées à partir de la substance à doser dans un milieu renfermant ou pas la matrice et ce, en fonction de l'absence ou la présence de cet effet matrice. Ces solutions servent à tester les différentes fonctions de réponse : Signal de l'équipement en fonction de la concentration (quantité) de la substance.

Standards de validation (SV): solutions de concentrations connues, préparées obligatoirement avec matrice. Elles ont pour but la détermination de l'erreur totale de chaque niveau de concentration, calcul de l'intervalle de tolérance et l'établissement de profil d'exactitude avec la détermination de l'intervalle de dosage.

En ce qui concerne les préparations des SE et SV (niveaux de concentrations, nombres de séries et de répétitions), celles-ci dépendent du protocole de validation choisi. Le logigramme présente la démarche proposée dans le guide SFSTP pour sélectionner un plan expérimental de la validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage (48).

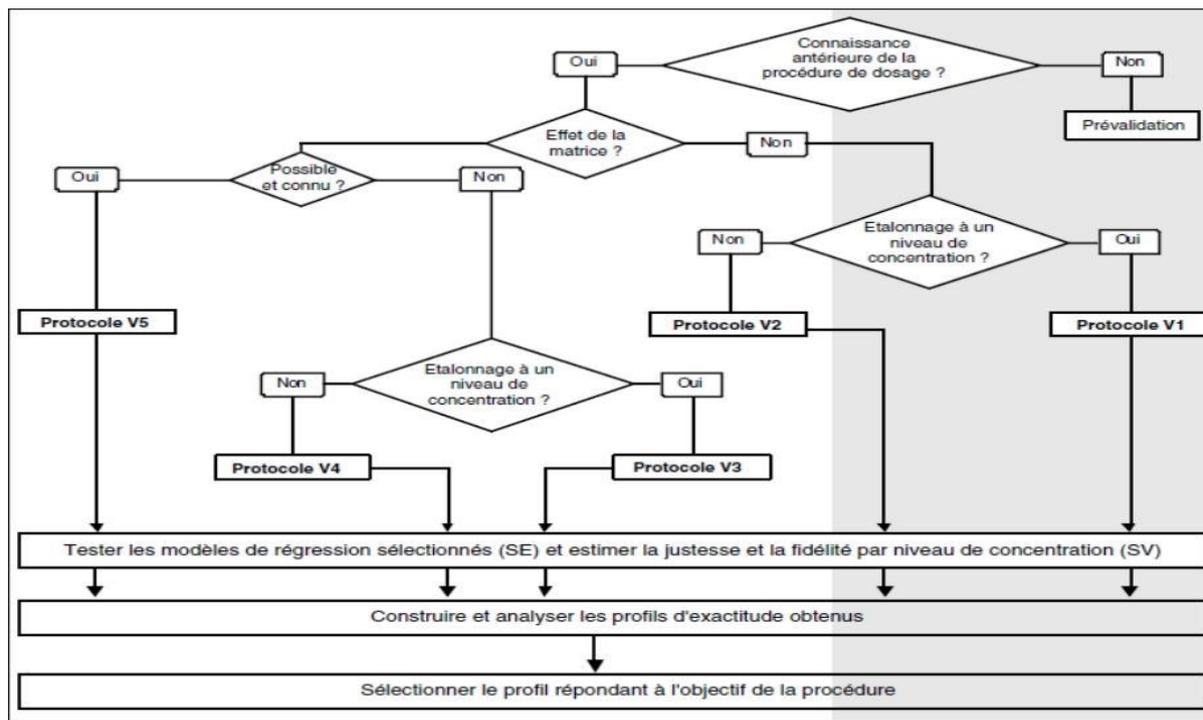


Figure 8 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation (48).

SE: standard d'étalonnage; **SV:** standard de validation

Le tableau suivant résume les différents protocoles de validation. Il présente également les types de standards (SE, SV), niveaux de concentration à utiliser en fonction de protocole choisi ainsi le nombre total d'essais à réaliser pour valider la méthode.

Tableau III : Choix du nombre des standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi (48).

Standards	Niveaux de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	
	Haut	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Haut			2 ⁽¹⁾	2	2
	Additif					2 ⁽³⁾
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre minimum de séries		3	3	3	3	3
Nombre total d'essais (min)		33	45	39	63	45

- ❖ Sélection d'un niveau de concentration supérieure à la concentration cible pour l'étalonnage (exemple : 120% de la concentration cible).
- ❖ Suppression possible du niveau de concentration médian pour l'étalonnage sur la base du modèle de régression retenu pour exprimer la fonction de réponse (exemple : modèle plus simple comme le modèle mathématique des moindres carrés). Dans ce cas, le nombre total est de 39 essais pour les protocoles V2 (sans matrice) et V5 (avec la matrice). Le nombre d'essais est de 51 pour le protocole V4.

Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe (exemple : fonction logistique à quatre paramètres) (48).

8 Les étapes de la validation

Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude sont les suivantes :

1. Disposer du mode opératoire et définir le mesurande.
2. Choisir le domaine de validation (gamme de concentration) et préciser l'objectif de validation (limite d'acceptabilité).
3. Sélectionner les échantillons de validation et leur établir une valeur de référence).
4. Planifier les essais de validation (choisir le nombre de séries, répétitions et niveaux de validation)
5. Planifier l'étalonnage (choisir le nombre de séries, répétitions et niveaux de l'étalonnage).
6. Réaliser les essais.
7. Calculer les concentrations prédites inverses.
8. Calculer les critères de validation.
9. Construire le profil d'exactitude.
10. Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non (49).

9 Démarche statistique

9.1 Spécificité

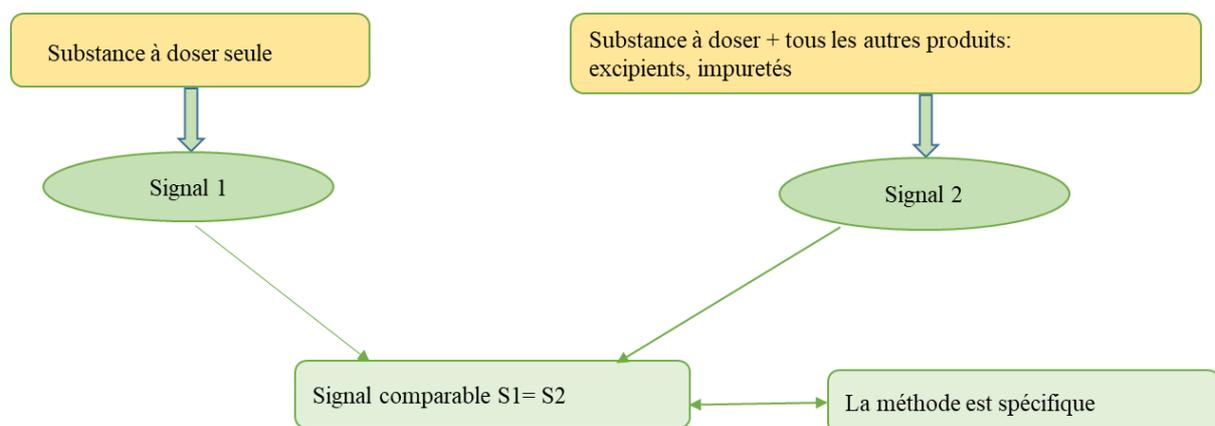


Figure 9 : Schéma explicatif de la spécificité (50).

La spécificité est démontrée de deux façons :

Approche empirique : basée sur la comparaison des chromatogrammes obtenus à partir des quatre solutions suivantes :

1. Diluant (solution standards sans matrice).
2. Solution placebo (matrice seule).
3. Solution standards 100% préparée dans le diluant.
4. Solution placebo rechargée 100% (forme reconstituée).

Les chromatogrammes obtenus à partir des solutions du diluant et de placebo ne doivent pas présenter un pic au même temps de rétention de l'analyte.

Les chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard 100% et l'échantillon sont comparables.

Approche statistique : basée sur la comparaison des droites obtenues avec les standards de validation (avec matrice) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage.

La comparaison des droites est basée sur le test t de Student (Annexe II) selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et aussi pour la forme reconstituée (48).

Une fois les expériences réalisées et les données collectées, il convient tout d'abord de déterminer, sur la base des standards d'étalonnage (SE), la relation entre la réponse (signal ou réponse de l'instrument) Y et la quantité (concentration) x. Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé :

$$y = f(x) + \varepsilon$$

ε représente l'erreur associée à la fonction de réponse f appelée communément erreur résiduelle. Il faut donc ajuster la fonction de réponse, c'est-à-dire évaluer les paramètres du modèle, de manière à ce que l'erreur résiduelle soit minimisée.

A partir de cet ensemble on distingue deux familles de fonctions : les fonctions dites linéaires dans leurs paramètres et les fonctions non linéaires.

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré au tableau suivant. Le choix dépend du type de méthode (méthode physico-chimique, bio analytique, immunodosage ...)(51).

Tableau IV : Exemples de fonction de réponse (51).

Type	Equation	Paramètre	Linéaire
Droite passant par l'origine	$y = \beta x$	B	Oui
Droite	$y = \alpha + \beta x$	$\alpha ; \beta$	Oui
Fonction quadratique	$y = \alpha + \beta x + \gamma x^2$	$\alpha ; \beta ; \gamma$	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + (\frac{x}{\gamma})^\beta}$	$\alpha ; \beta ; \gamma ; \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{[1 + (\frac{x}{\gamma})^\beta]}$	$\alpha ; \beta ; \gamma ; \delta ; \psi$	Non

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non). Pour les méthodes bio-analytiques, la fonction quadratique pourra être envisagée dans certains cas.

Des transformations mathématiques sont également envisageables. Par exemple, le logarithme népérien ou la racine carrée pourrait être appliqué à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y. Il est cependant recommandé de n'appliquer ce type de transformation qu'avec les modèles linéaires du tableau précédent.

9.2 Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour des raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est

indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire). Cela consiste à transformer les réponses observées ($y_{ijk} \rightarrow y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne. Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite.

En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonction de réponses obtenues avec les standards d'étalonnage. Ainsi l'alignement des n_{ij} répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit (51) :

$$y_{ijk,c} = y_{ijk} + f(\bar{x}_{ij}) - f(x_{ijk})$$

\bar{x}_{ij} : Moyenne des concentrations introduites du niveau j de la série i .

x_{ijk} : Concentration introduite du niveau j de la série i répétition k .

Tableau V : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses (51).

Fonction de réponse	Règles d'alignement
Droite passant par l'origine Règles d'alignement	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} \cdot x_{ijk}]$
Droite	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} \cdot x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} \cdot x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij}^2 - x_{ijk}^2]$
Logistique à 4 paramètres	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[\frac{1}{1 + (\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}})^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + (\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}})^{\hat{\beta}_i}} \right]$

9.3 Prédiction inverse

Avant d'effectuer les prédictions inverses, c'est-à-dire calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse, il est préférable de s'assurer qu'au sein d'un niveau de concentration, les concentrations sont toutes identiques. Si ce n'est pas le cas, il vaut mieux les aligner comme décrit dans la section précédente (51).

Les prédictions inverses pour les différents modèles s'obtiennent comme suit :

Tableau VI : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse (51).

Fonction de réponse	Concentration calculée
Ligne droite passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Ligne droite	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i (\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{\hat{\beta}_i}$
Quatre paramètres logistiques	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Cinq paramètres logistiques	$y_{ijk} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y_{ijk} par $y_{ijk,c}$ dans le tableau précédent.

Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse après ce calcul en retour. Par exemple, après une transformation logarithmique ou racine carrée de la droite les concentrations calculées se font de la manière suivante :

Tableau VII : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée (51).

Fonction de réponse	Concentration calculée (logarithme)	Concentration calculée (racine carrée)
Droite	$x_{ijk,calc} = e^{\frac{\ln(y_{ijk}) - \hat{\alpha}_i}{\hat{b}_i}}$	$x_{ijk,calc} = \left(\frac{\sqrt{y_{ijk}} - \hat{\alpha}_i}{\hat{b}_i} \right)^2$

9.4 Calcul de la justesse et de la fidélité

9.4.1 Modèle

La justesse d'une méthode analytique (par opposition à celle d'un résultat) exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne (par opposition à celle d'une observation unique) des résultats d'essai avec la méthode et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie.

L'estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode s'effectue avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation (ou des standards d'étalonnage eux-mêmes en phase de pré validation).

Cette estimation est réalisée à chacun des j niveaux de concentration considérés à l'aide du modèle statistique suivant (51) :

$$X_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Avec :

X_{ijk} est la k -ième concentration calculée du niveau j de la i -ème série,

μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j ,

α_{ij} est au niveau j l'écart entre la moyenne de la i -ème série et la moyenne μ_j ;

α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma_{B,j}^2$. ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma_{w,j}^2$.

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{w,j}^2$ représentent les variances inter-série et intra-série, respectivement. La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres μ_j , $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{w,j}^2$ du modèle.

$$\hat{\mu}_j = \frac{1}{\sum_{n=1}^p nij} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{nij} xijk, calc$$

$$MSM_j = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p nij (\bar{x}_{ij}, calc - \bar{x}_{.j}, calc)^2$$

$$MSE_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p nij - P} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{nij} (xijk, calc - \bar{x}_{ij}, calc)^2$$

Avec :

MSM_j et MSE_j : Maximum de vraisemblances pour chaque niveau de concentration j ;

$\bar{x}_{ij}, calc$: Moyenne des concentrations calculées au niveau j ;

$\bar{x}_{.j}, calc$: Moyenne des concentrations calculées au niveau j ;

xijk, calc : Concentrations calculées au niveau j de la série i répétition k ;

n : Nombre de répétition ;

p : Nombre de séries.

Dans le cas d'un schéma équilibré (le nombre de répétitions est identique pour tout niveau de concentration dans chaque série), les composantes de la variance du niveau sont estimées comme suit (n étant le nombre de répétition dans chaque série) (51) :

Si MSE_j < MSM_j alors :

$$\hat{\sigma}_{w,j}^2 = MSE_j$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

Si non :

$$\hat{\sigma}_{w,j}^2 = \frac{1}{pn-1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^k (x_{ijk, calc} - \bar{x}_{j., calc})^2$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = 0$$

Avec : $\sigma_{B,j}^2$: variance inter-série $\sigma_{w,j}^2$: variance intra-série

9.4.2 La justesse

La justesse d'une procédure analytique (par opposition à l'exactitude d'un résultat) exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne (par opposition à une seule observation) des résultats des essais avec la méthode et la valeur de référence acceptée, également appelée valeur vraie conventionnelle. La justesse d'une procédure (ou biais), à chaque niveau de concentration, est obtenu en calculant la différence entre la moyenne (arithmétique) des concentrations introduites X_j et les concentrations calculées signifiant $\hat{\mu}_j$.

-Est mesurée par le biais (ou le taux de recouvrement = recovery) entre la valeur supposée vraie et la moyenne des résultats.

-La méthode est juste si la moyenne des résultats est proche de la valeur vraie.

-Représente l'erreur systématique.

-Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit (51) :

$$\text{Biais } j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_{j.}$$

$$\text{Biais } j(\%) = \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_{j.}}{\bar{x}_{j.}} \times 100$$

$$\text{Recouvrement } j(\%) = 100 \times \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_{j.}}$$

Avec :

$\hat{\mu}_j$: moyenne des concentrations calculées du niveau j.

$\bar{x}_{j.}$: moyenne des concentrations introduites du niveau j.

9.4.3 La Fidélité

La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. La mesure de fidélité est calculée à partir de l'écart type des résultats d'essais.

-Elle mesure la dispersion des résultats, les écarts des résultats par rapport à la moyenne.

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra- et inter série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire (51).

Répétabilité : $\sigma_{Re,j}^2 = \sigma_{W,j}^2$

Fidélité intermédiaire: $\sigma_{IP,j}^2 = \sigma_{W,j}^2 + \sigma_{B,j}^2$

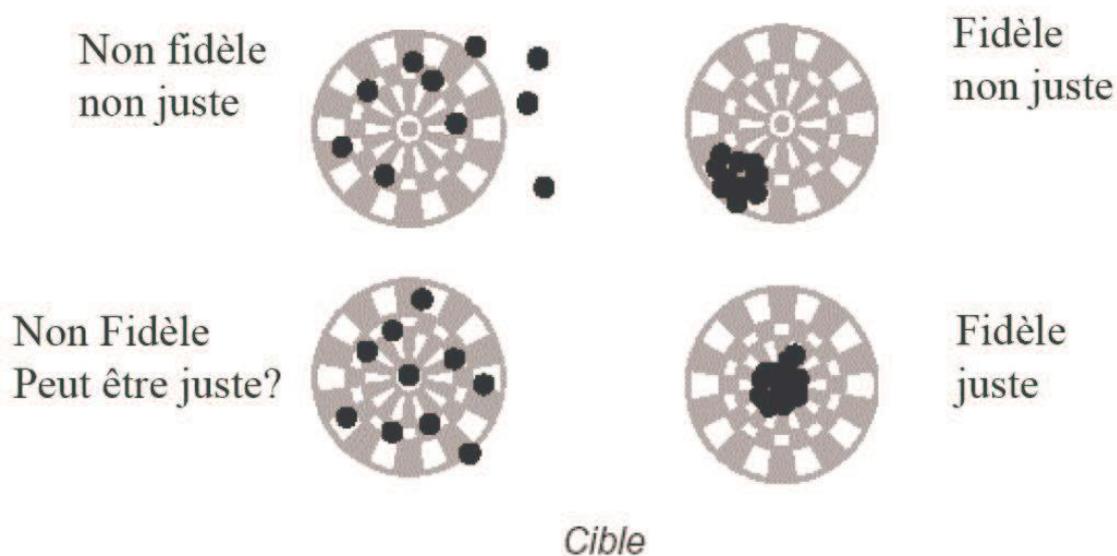


Figure 10 : Fidélité et justesse (52).

9.5 Calcul de l'exactitude

L'exactitude est une caractéristique importante de la validation d'une méthode de dosage, car elle permet d'évaluer d'une manière globale l'aptitude de cette dernière ; elle comprend à la fois la justesse et la fidélité. L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui d'une méthode analytique) exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essais et la valeur de référence

acceptée communément appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure (51):

Tableau VIII : Calcul de l'exactitude (51).

Exactitude	Formule de calcul
Exactitude	$x_i - \mu$
Exactitude (%)	$\frac{x_i - \mu}{\mu} \times 100$

μ : la valeur de référence acceptée

x_i : le résultat de l'essais

9.5.1 Erreur totale et profil de l'erreur totale

Chaque mesure obtenue est le reflet de la vraie valeur, du biais de la méthode et de sa fidélité, ce qui s'exprime comme suit :

$$x_i = \mu + |\text{biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité intermédiaire procédure}$$



$$x_i - \mu = |\text{biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité intermédiaire procédure}$$



$$x_i - \mu = \text{Erreur totale procédure}$$

L'erreur totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Donc l'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode.

Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. L'erreur totale observée avec chaque modèle et pour chaque niveau de concentration est étroitement liée aux erreurs maximales observées correspondantes.

Il est normal que l'erreur maximale observée sur un grand nombre d'observations soit notablement plus grande que l'erreur totale vu que ces erreurs maximales représentent des situations rares tandis que l'erreur totale reflète plutôt les plus grandes erreurs auxquelles on peut s'attendre dans la plupart des cas.

L'estimation de l'erreur totale justifie les plus grandes erreurs que la méthode puisse produire. L'erreur totale d'une procédure analytique est donc bien un bon indicateur de l'exactitude des résultats qu'elle produit. C'est la raison pour laquelle nous proposons ce critère pour une première évaluation simple de la procédure (51).

9.5.2 Calcul de l'intervalle de tolérance

L'importance dans une validation analytique ce n'est pas la validité des résultats obtenus avec l'Erreur Totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de tolérance et du profil d'exactitude.

Il s'agit d'un intervalle dans lequel on est capable de prédire que se trouve une proportion connue de mesures. Cet intervalle peut être calculé de plusieurs façons et la commission SFSTP a retenu une méthode de calcul présentée ci-dessous.

L'intervalle de tolérance (IT) est calculé pour chaque niveau de concentration selon la formule suivante :

$$[\text{biais } j \text{ (\%)} - Q_t(v; \frac{1+\beta}{2}) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} \text{ CVIP, } j ; \text{biais } j \text{ (\%)} + Q_t(v; \frac{1+\beta}{2}) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} \text{ CVIP, } j]$$

Les coefficients intervenants dans cette formule sont calculés comme suite :

$$\sigma^2_{FI,j} = \sigma^2_{w,j} + \sigma^2_{B,j} \qquad R_j = \frac{\hat{\sigma}^2_{B,j}}{\hat{\sigma}^2_{w,j}}$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R_j+1}{nR_j+1}} \qquad v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+1)^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{pn}}$$

n : nombre de répétition; **p** : nombre de série

$Qt(v; \frac{1+\beta}{2})$ représente le quantile de la distribution t de Student pour v degré de liberté et β la probabilité du contenu de l'intervalle de tolérance (51).

9.5.3 Etablissement du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est défini comme une combinaison sous forme graphique d'un ou plusieurs intervalles de tolérance calculés à différents niveaux et d'un intervalle d'acceptabilité. Il permet une vision globale de l'adéquation des performances de la méthode aux spécifications exigées dans le domaine d'application.

Selon l'équation ci-dessous, les bornes des intervalles sont :

$$L_j = \text{biais } j (\%) - Qt \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{IP,j}^2}$$

$$U_j = \text{biais } j (\%) + Qt \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{IP,j}^2}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes supérieures L_j entre elles ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$) et d'autre part les bornes inférieures U_j entre elles ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$) (47,51).

Avec : **L_j** : borne supérieure **U_j** : borne inférieure

9.5.4 Le choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la démarche analytique d'atteindre ses objectifs vu que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation.

Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues.

Sachant que le coefficient de détermination R^2 (toujours supérieur à 0.99) n'est pas une indication fiable de la qualité des résultats de la méthode. Le profil d'exactitude, qui est le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de juger l'adéquation de différentes pratiques et permet de prendre des décisions sur le choix de la fonction de réponse adéquate (51).

9.6 Linéarité des résultats

La linéarité d'une démarche analytique dans un intervalle définie est sa capacité à obtenir des résultats directement proportionnels aux concentrations (quantité) de l'analyte dans l'échantillon. Rappelons que l'exigence de linéarité s'applique aux résultats [concentration calculée = f (concentration introduite)], pas aux réponses [signal = f (concentration introduite)]. C'est un prérequis à l'estimation de la justesse.

Mais une relation linéaire entre les concentrations calculées et celles introduites n'implique pas que la procédure analytique soit juste (51).

9.7 Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de mesures attendues, permet donc de décider des niveaux de concentration pour lesquels une démarche analytique est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition, quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LQL) et haute (UQL) de la procédure.

Entre ces deux limites, on retrouve l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs limites qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie (51).

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériels et Méthodes

L'objectif du présent travail est la mise au point et validation d'une nouvelle méthode de dosage de la vitamine E dans le plasma humain par chromatographie liquide à haute performance couplé à un détecteur Ultraviolet.

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de Biochimie et de Chimie analytique du département de pharmacie de Tizi Ouzou, et cela conformément au protocole de validation analytique décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP), publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

1 Matériels

1.1 Appareillages

Tableau IX : Appareillages utilisés dans ce présent travail

Désignation		Spécification	Usage
HPLC SHIMADZU (LC20)	Pompe	LC-20AT	Analyse des solutions et obtention des chromatogrammes
	Injecteur Automatique	SIL-20A	
	Contrôleur	CBM-20A	
	Compartiment de la colonne	CTO-20A	
	Colonne	Teknokroma® C18 (15cm, 4.6mm, 5µm)	
	Détecteur	Détecteur par spectrométrie UV-visible SPD-20AV	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Agitateur mécanique des tubes : VORTEX		IKA (MS3 digital)	Homogénéisation des solutions
Balance de précision		KERN ALT 220-5 DAM	Pesée
Étuve		MEMMERT	Séchage
Centrifugeuse		Hettich EBA 20	Centrifugation des solutions
Évaporateur		Knf LAB	Évaporation lors de l'extraction

1.2 Verreries et autres

Tableau X : Verreries et autres matériels utilisés dans ce travail.

Verreries	Autres
<ul style="list-style-type: none">• Fioles ambrées de 50ml• Fioles jaugées 20ml, 25ml• Béchers• Pipettes jaugées : 2ml, 5ml, 10ml, 15ml• Tubes en verres : 5ml• Vials pour HPLC	<ul style="list-style-type: none">• Micropipettes 1ml, 50μl et 100μl• Micropipettes réglables• Poires• Pissettes• Comptes gouttes• Spatules• Papier aluminium

1.3 Matières premières et réactifs

Tableau XI : Matières premières et réactifs utilisés.

Matériaux premières et réactifs	Spécification	Précautions d'emploi
α-tocophérol standard SIGMA-ALDRICH	M = 430.71 g/mol, Pureté > 95.5%	Aucune
Plasma frais congelé	/	Complexe (interférences)
Eau distillée (H₂O)	M = 18 g/mol	Aucune
n-Hexane BIOCHEM Chemopharma	M = 86,18 g/mol Pureté > 95%	
Méthanol LiChrosolv grade HPLC	M = 32.04 g/mol, Pureté > 99.9%	
Acétonitrile Honeywell Riedel-de Haën grade HPLC	M = 41.05 g/mol, Pureté > 99.9%	
Ethanol Honeywell Riedel-de Haën	Mr = 46,07 g/mol, Pureté > 96%	

2 Méthode

2.1 Principe de la méthode

La méthode consiste à séparer la vitamine E par étalonnage externe, présente dans un plasma déprotéinisé par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). (Annexe I)

La technique met à profit la capacité de la vitamine E à absorber à une longueur d'onde de 220 nm (UV).

2.2 Choix des paramètres de validation

- ❖ Limites d'acceptabilité (λ) : $\lambda = \pm 15\%$
- ❖ Probabilité de confiance (β) : $\beta = 85\%$.

2.3 Choix de diluant

La vit E est facilement soluble dans les solvants non polaires. Après avoir essayé l'éthanol, l'acétone et l'acétonitrile, on a constaté que ce dernier solubilise notre standard parfaitement.

2.4 Le choix des niveaux de concentration

Le choix des niveaux de concentrations de la vitamine E est fait de sorte que la gamme des concentrations puisse couvrir les valeurs physiologiques [6,75-15,73 mg/l] et pathologiques de la vitamine E dans le plasma.

Les niveaux de concentrations choisis pour la validation sont : 3,2, 10, 20, 40, 60 mg/l dans l'échantillon (plasma). (Voir 3.1.2 dans Matériels et Méthodes)

2.5 Optimisation de la méthode

Afin d'optimiser notre méthode de dosage de la vitamine E par HPLC, nous avons fait varier plusieurs paramètres chromatographiques afin de sélectionner les meilleures conditions adaptées pour une meilleure séparation et donc une bonne résolution dans un temps d'analyse raisonnable.

Pour cela nous avons commencé par le choix du détecteur qui a été basé sur la capacité d'absorption du standard d' α -tocophérol. En premier lieu, on a utilisé le fluorimètre à des longueurs d'ondes d'excitation : 295 nm ; d'émission : 330 nm. Mais à la fin on a opté pour l'UV-Visible comme détecteur, qui a donné d'excellents résultats à 220nm.

Après avoir choisi le détecteur et fixé la longueur d'onde, on est passé vers le choix des colonnes chromatographiques (Colonnes RP 18 de 15 et 25 cm de longueur), ainsi nous avons essayé plusieurs types de phases mobiles dont un mélange Méthanol / Eau / Acétonitrile ; Méthanol / Eau ; Méthanol / Acétonitrile / Tétrahydrofurane ; Acétonitrile / Eau ; Méthanol / Acétonitrile à différentes proportions. Après plusieurs essais, nous avons enfin opté pour une

colonne RP 18 de 15 cm et puis pour améliorer l'allure du pic et diminuer le temps de rétention on a choisi le Méthanol 100% avec un mode isocratique.

Pour le choix du débit, nous avons essayé deux débits de 1 et 1.2 ml/min et on a opté pour celui de 1.2 ml/min qui a donné de meilleurs résultats avec un volume d'injection de 50µl.

Pour faciliter la séparation de la substance à doser, on a fixé la température à 35°.

Vu la disponibilité de l'évaporateur, on a effectué une micro-extraction simple par le n-hexane. Enfin on a constaté que l'action corrosive de n-hexane sur les tubes en plastique donne des résultats erronés, donc on a recours à utiliser les tubes en verre.

2.6 Choix du protocole de validation

Selon le logigramme des protocoles proposé par la SFSTP 2006 (figure n° 8 et le tableau 3) nous avons pu sélectionner le protocole de validation adéquat pour notre étude, sachant que la vitamine E est une molécule endogène et que le plasma utilisé est issu des prélèvements sur des sujets sains sous forme de PFC (contient déjà de la vitamine E), donc il est impératif de faire passer des blancs plasma afin d'évaluer les quantités physiologiques déjà présentes dans la matrice, cette quantité est ensuite soustraite des standards de validation afin d'éliminer l'effet matrice engendré par cette vitamine E physiologique, ce qui permet l'utilisation du protocole choisi qui est le **V2 avec un étalonnage sans matrice** :

- Deux séries du standard d'étalonnage (SE) sont préparées : Chaque série comporte 3 niveaux de concentration avec deux répétitions par niveau.
 $3 \text{ séries} * 2 \text{ répétitions} * 3 \text{ niveaux} = 18 \text{ essais.}$
- Trois séries du standard de validation (SV) sont préparées : Chaque série comporte 5 niveaux de concentration avec trois répétitions par niveau.
 $3 \text{ séries} * 3 \text{ répétitions} * 5 \text{ niveaux} = 45 \text{ essais.}$

2.7 Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques établies au cours de notre étude sont les suivantes :

Tableau XII : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage

Colonne	Longueur	15cm
	Diamètre	4.6 mm
	Taille des particules	5 μ m
	Phase stationnaire	Gel de silice octadécylsilylé C18
Phase mobile	Méthanol pur (100%)	
Volume d'injection	50 μ l	
Débit d'injection	1.2 ml/ min	
Temps d'analyse	10 min	
Température	35°	
Détection	Détecteur UV-visible;	$\lambda = 220$ nm
Mode de passage de la phase mobile	Isocratique	

3 Protocole expérimental

3.1 Préparations des solutions

3.1.1 Préparations des solutions stocks

On prépare des solutions mères, pour les standards d'étalonnages, et pour les standards de validations :

3.1.1.1 Solution stock pour les standard d'étalonnage et les 3 niveaux supérieurs des standards de validation



Dans une fiole ambrée de 50 ml

- Introduire 20 mg d' α -tocophérol.
- Faire dissoudre avec l'acétonitrile.
- Agiter par retournement jusqu'à la dissolution complète d' α tocophérol.
- Compléter au trait de jauge avec l'acétonitrile.

On a:

$$C_{Stock} = \frac{masse}{volume}$$

La masse d' α -tocophérol standard = 20 mg

Volume = 50 ml

Donc :

$$c_{stock1} = \frac{20}{50} = 0.4g/l = 400mg/l$$

3.1.1.2 Solution stock pour les 2 niveaux inférieurs des standards de validations

- Introduire 20 mg d' α -tocophérol dans 50 ml de diluant.
- Suivre les mêmes étapes précédentes

Donc :

$$c_{stock2} = \frac{10}{50} = 0.2g/l = 200mg/l$$

3.1.2 Préparation des standards d'étalonnages et des standards de validations

3.1.2.1 Préparation des dilutions (solutions mères) à partir des solutions stocks

La gamme d'étalonnage (avec 2 répétions) est composée de solutions préparées par 4 dilution des solutions stocks précédentes (2 x 400 mg/l), tandis que la gamme de validation (avec 3

répétions) est composée de solutions préparées par 5 dilution des solutions stocks restantes (3 x 400 mg/l pour les trois niveaux supérieurs et 3 x 200 mg/l pour les deux niveaux inférieurs).

➤ **Pour la solution stock 2 (200mg/l)**

- On prend 2 ml (niveau 3,2 mg/l) et 5 ml (niveau 10 mg/l) de la solution stock 2 (200 mg/l) à l'aide d'une pipette jaugée dans une fiole de 25ml et 20 ml respectivement.
- Compléter au trait de jauge avec l'acétonitrile.
- Agiter au vortex pendant 10 secondes.
- Couvrir la fiole avec du papier aluminium afin d'éviter la dégradation.

➤ **Pour la solution stock 1 (400mg/l)**

- On prend n ml de la solution stock 1 à l'aide d'une pipette jaugée.

Dont : n = 2 ml dans une fiole de 25ml pour le niveau 6,4 mg/l.

n = 5 ml dans une fiole de 20ml pour le niveau 20 mg/l.

n = 10 ml dans une fiole de 20ml pour le niveau 40 mg/l.

n = 15 ml dans une fiole de 20ml pour le niveau 60 mg/l.

- Compléter au trait de jauge avec l'acétonitrile.
- Agiter au vortex pendant 10 secondes.
- Couvrir la fiole avec du papier aluminium afin d'éviter la dégradation.

Une dilution de la solution stock dans le plasma pour la gamme de validation, et dans l'acétonitrile pour la gamme d'étalonnage (150ul de la solution mère dans 600ul de plasma ou acétonitrile), donc :

On a pour le niveau 1 une dilution de 2/25 de la solution stock 2

D'où :

$$c_{N3.2} = \frac{200 \times 2}{5 \times 25} = 3.2 \text{ mg/l}$$

Pour le niveau 2 une dilution de 2/25 de la solution stock 1

$$c_{N6.4} = \frac{400 \times 2}{5 \times 25} = 6.4 \text{ mg/l}$$

Pour le niveau 3 une dilution de 5/20 de la solution stock 2

D'où :

$$c_{N10} = \frac{200 \times 5}{5 \times 20} = 10 \text{mg/l}$$

Pour le niveau 3,4 et 5 une dilution de 5/20, 10/20 et 15/20 de la solution stock 1 respectivement.

D'où :

$$c_{N20} = \frac{400 \times 5}{5 \times 20} = 20 \text{mg/l}$$

$$c_{N40} = \frac{400 \times 10}{5 \times 20} = 40 \text{mg/l}$$

$$c_{N60} = \frac{400 \times 15}{5 \times 20} = 60 \text{mg/l}$$

Tableau XIII : Préparation des dilutions de la gamme d'étalonnage à partir des solutions mères.

	Solutions stock	Niveau	Concentration (mg/l)
Gamme d'étalonnage	Solution stock 1	1	6.4
		2	20
		3	40
		4	60

Tableau XIV : Préparation des dilutions de la gamme de validation à partir des solutions mères.

Gamme de validation	Solutions stocks	Niveau	Concentration (mg/l)
	Solution stock 2	1	3.2
		2	10
	Solution stock 1	3	20
		4	40
		5	60

3.1.2.2 Préparation du standard d'étalonnage

- A partir de chacune des solutions mères préparées précédemment pour les standard d'étalonnage, prélever 150 µl et le verser dans un tube en verre de 5 ml.
- Ajouter dans chaque tube 1850 µl d'acétonitrile.
- Agiter au vortex pendant 30 secondes.
- Prélever 1000 µl de chaque tube et le verser dans des vials.

3.1.2.3 Préparation du standard de validation

À partir de chacune des solutions mères préparées précédemment pour les standards de validation :

- Prélever 150 µl de chacune des solutions et le verser dans un tube à essai en verre de 5 ml.
- Ajouter 600 µl du plasma frais congelé dans chacune des solutions.
- Ajouter un volume de 400 µl d'éthanol.
- Agiter au vortex pendant 3 minutes.

- Ajouter un volume de 2 ml de n-hexane (95%) pour extraire l' α -tocophérol.
- Agiter une deuxième fois au vortex pendant 3 minutes.
- Centrifugation à 4000 tours par minute pendant 15 min.
- Séparation de 2 ml de n-hexane dans un autre tube en verre.
- Procéder à l'évaporation dans l'évaporateur pendant une heure et demie.
- Récupérer le résidu d' α -tocophérol par l'ajout de 2 ml d'acétonitrile.
- Remplir les viales et procéder au dosage par HPLC.

Remarque :

- Une fois la gamme standard préparée, on procède au dosage par HPLC.
- On injecte pour chaque solution un volume de 50 μ l, et cela en respectant l'ordre suivant :
 - ❖ Blanc (solvant de dilution ou plasma).
 - ❖ La solution la moins concentrée.
 - ❖ La solution la plus concentrée.
- Enfin, enregistrer les chromatogrammes d'analyse obtenus et rapporter l'air des pics d' α -tocophérol.

3.2 Méthode d'extraction

Le mode d'extraction utilisé est une simple extraction par un solvant non miscible, très volatil qui est le n-hexane, ce dernier permet de concentrer l'extrait de la vitamine E qui est liposoluble. Lors de la centrifugation, elle passera du plasma vers le solvant, qui s'évapore sous vide, et le résidu de vitamine E sera récupéré par l'ACN.

En résumé, le mode opératoire de validation est comme suit :

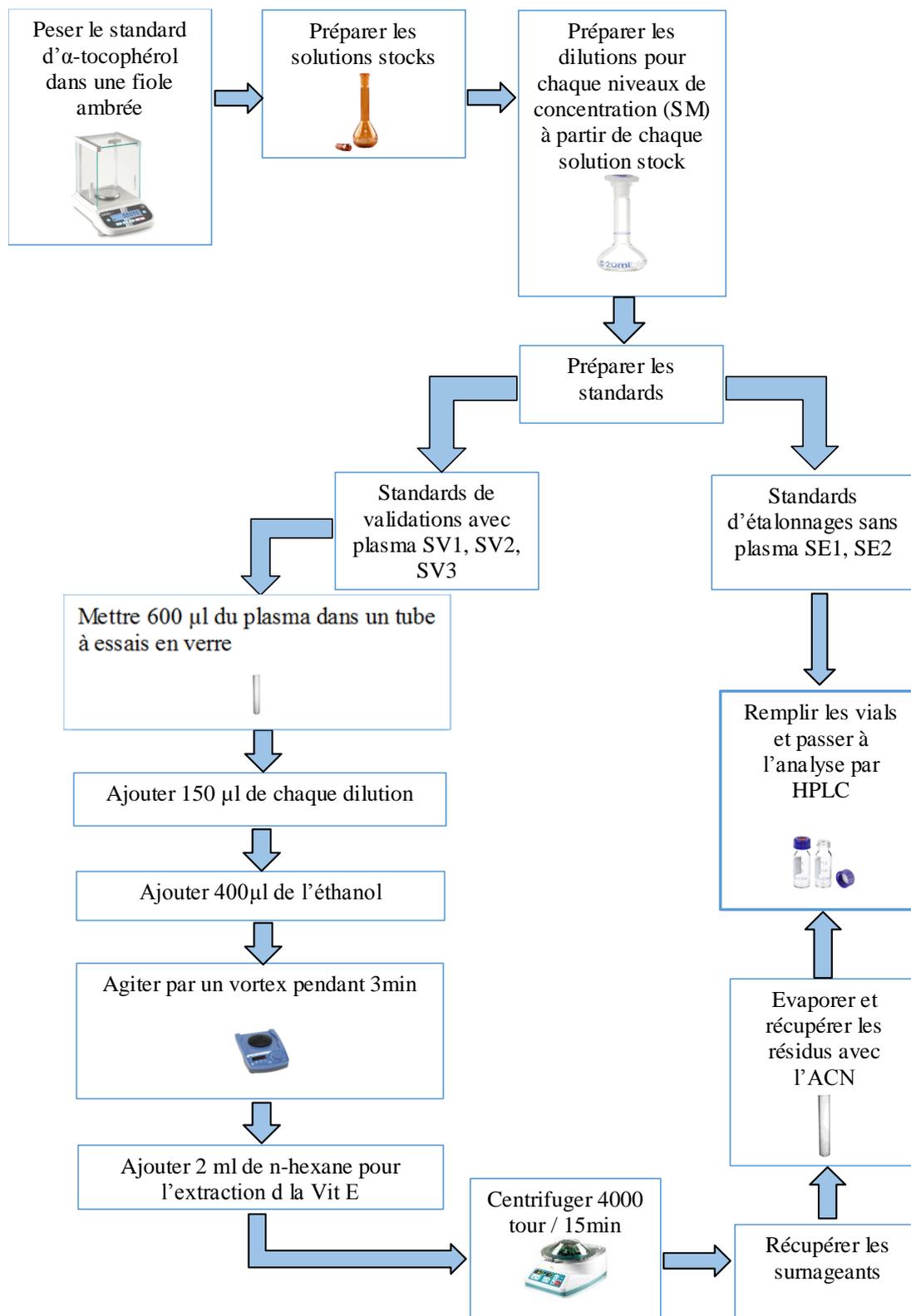


Figure 11 : Mode opératoire de validation.

RESULTATS

4 Résultats

La technique de dosage utilisée dans notre méthode est la Chromatographie Liquide à Haute Performance « HPLC » couplé à un détecteur UV, les résultats obtenus sont des chromatogrammes dont l'intégration permet de calculer leurs airs de pic (Annexe III).

4.1 Chromatogrammes obtenus du dosage de la Vitamine E

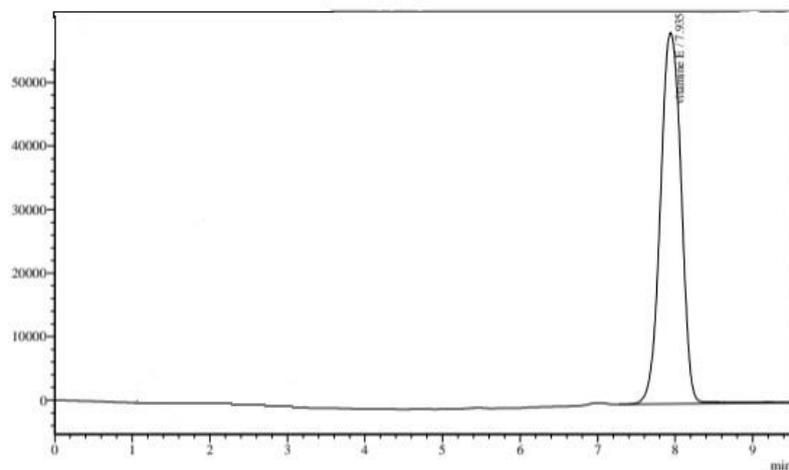


Figure 12 : Chromatogramme de la Vitamine E sans matrice.

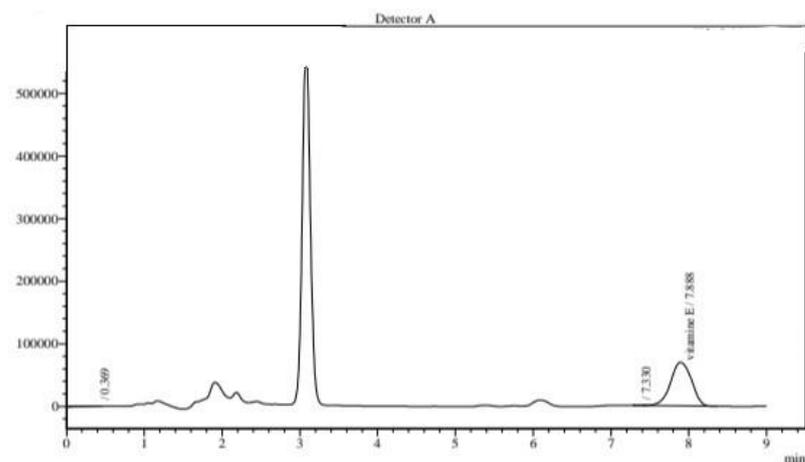


Figure 13 : Chromatogramme de la Vitamine E avec matrice.

4.2 Temps de rétention obtenus

Le temps de rétention moyen de la Vitamine E = 7,907 min.

4.3 Informations concernant les données brutes

Les concentrations présentées sont issues des concentrations finales injectées (après chargement des plasmas), leurs valeurs sont choisies de façon à couvrir les valeurs physiologiques et pathologiques de la vitamine E dans le plasma.

Les réponses instrumentales sont représentées par les aires de pics des chromatogrammes.

4.4 Spécificité

4.4.1 Comparaison des chromatogrammes

L'évaluation de la spécificité est faite par la comparaison du chromatogramme d'un SE (sans matrice) et du diluant non chargés.

Elle est illustrée dans les figures suivantes :

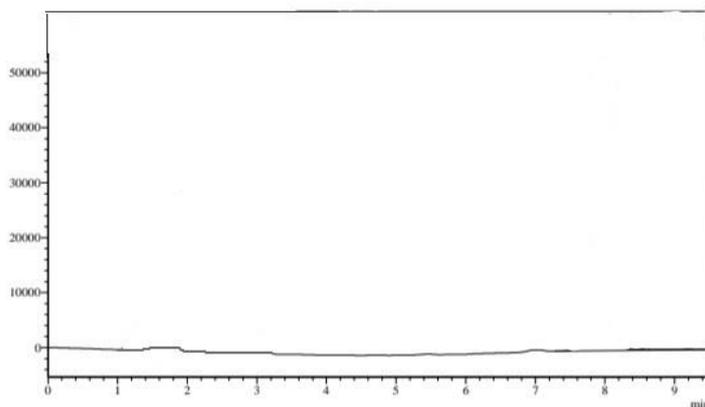


Figure 14 : Chromatogramme du diluant non chargé.

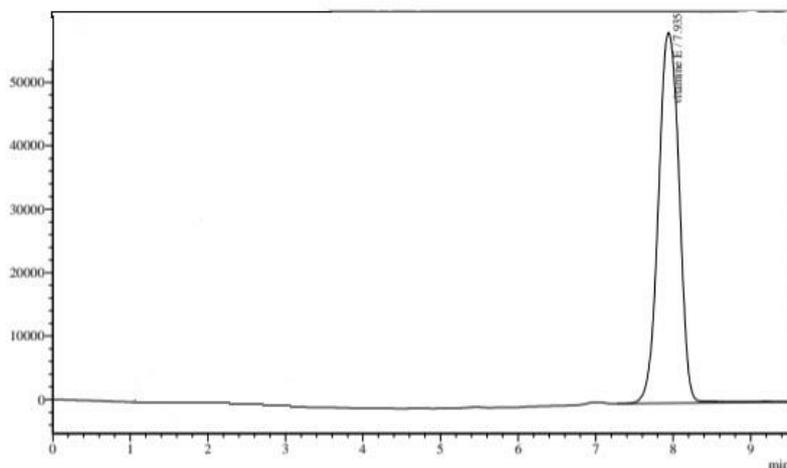


Figure 15 : Chromatogramme de la Vitamine E dans le diluant (sans matrice).

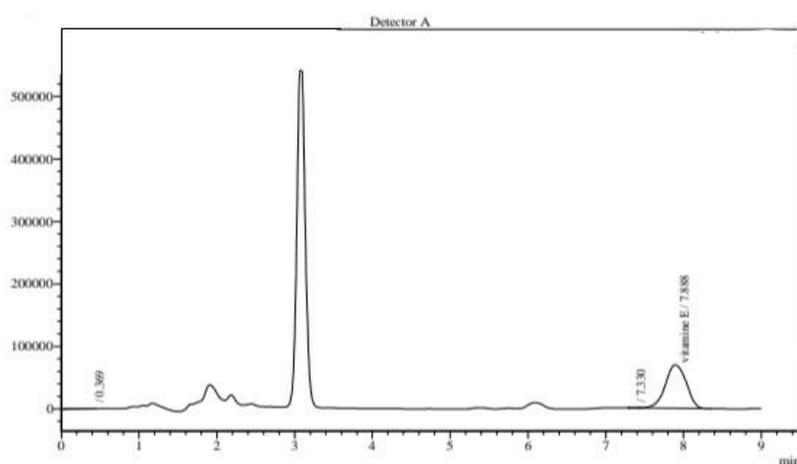


Figure 16 : Chromatogramme de la Vitamine E dans le Plasma (avec matrice).

Le tableau suivant représente les résultats de la superposition des chromatogrammes obtenus :

Tableau XV : Résultats de la superposition des chromatogrammes.

Solutions	Temps de rétention	Superposition
Diluant non chargé	Absence de pics	Concluante
Vitamine E dans le diluant	7.935 min	
Vitamine E dans le Plasma	7.888 min	

4.5 Evaluation du rendement et du facteur d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé à partir des concentrations introduites et celles prédites après traitement d'échantillons avec matrice sur les cinq niveaux de concentration.

La courbe de régression linéaire obtenue permet de calculer le facteur d'extraction qui correspond à l'inverse de la pente.

Tableau XVI : Résultats obtenus lors de l'évaluation du rendement.

Niveau	Répétition	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Rendement (%)
3,4 mg/L	1	3,21	2,37	73,76
	2	3,19	2,41	75,42
	3	3,19	2,37	74,30
10 mg/L	1	10,02	7,80	77,79
	2	9,98	7,65	76,66
	3	9,95	7,60	76,32
20 mg/L	1	20,04	16,73	83,46
	2	19,96	16,03	80,34
	3	19,91	16,09	80,83
40 mg/L	1	40,09	28,84	71,94
	2	39,91	28,20	70,66
	3	39,81	28,40	71,34
60 mg/L	1	60,13	43,61	72,52
	2	59,87	42,45	70,90
	3	59,72	42,99	71,99
Moyenne Rendement		75,21 %		
Pente		0,706		
Or. orig		0,789		

$$\text{Facteur d'extraction} = \frac{1}{\text{pente}} = \frac{1}{0,706} = 1,4$$

4.6 Fonction de réponse

En vue de choisir le modèle d'étalonnage le plus adéquat qui est capable de produire une proportion suffisante des futures mesures qui se situeront à l'intérieur des limites d'acceptabilité, nous avons étudié quatre modèles reliant les aires des pics aux concentrations introduites.

Les tableaux suivants regroupent les résultats des calculs statistiques pour toutes les fonctions suivies par leurs courbes d'étalonnage correspondantes à chaque série :

- 1^{ère} fonction : Droite : $Y = aX + b$

Tableau XVII : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Vitamine E avec la fonction : $y = ax + b$ (sans matrice).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		X(mg/L)	(Y _x)	X(mg/L)	(Y _x)	X(mg/L)	(Y _x)
6,4mg/L	1	6,53	83650	6,44	71076	6,40	72361
	2	6,45	70489	6,43	70765	6,39	70957
20mg/L	1	20,40	487768	20,11	500140	20,01	492717
	2	20,15	489266	20,10	499379	19,98	495314
40mg/L	1	40,80	917186	40,22	886919	40,02	880218
	2	40,30	913702	40,20	892287	39,96	894880
60mg/L	1	61,20	1337952	60,33	1294835	60,03	1287299
	2	60,45	1359035	60,30	1304428	59,94	1284585
Pente		22779,93		21983,03		21863,40	
Ordonnée à l'origine		-25309,10		-11920,78		-9842,40	

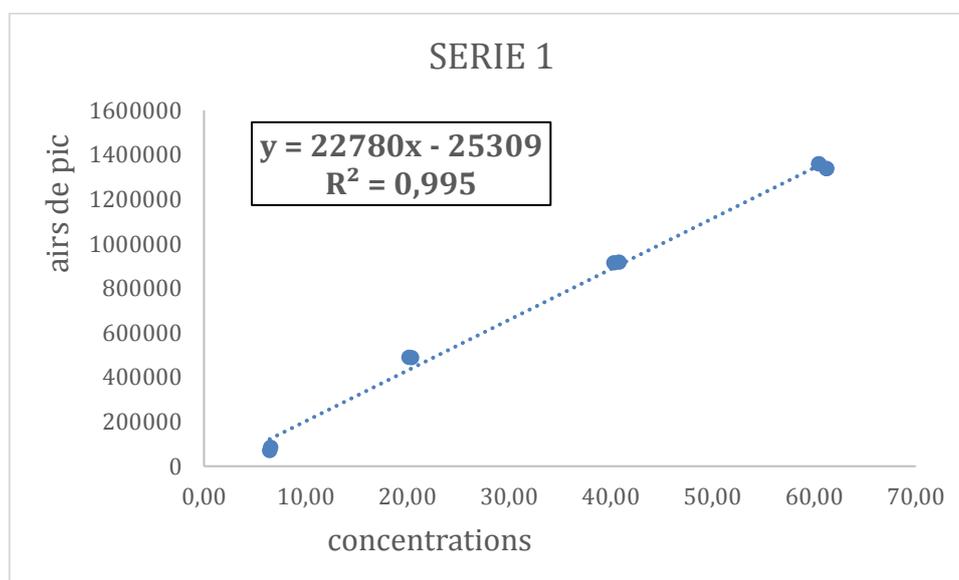


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax + b$ (série 1).

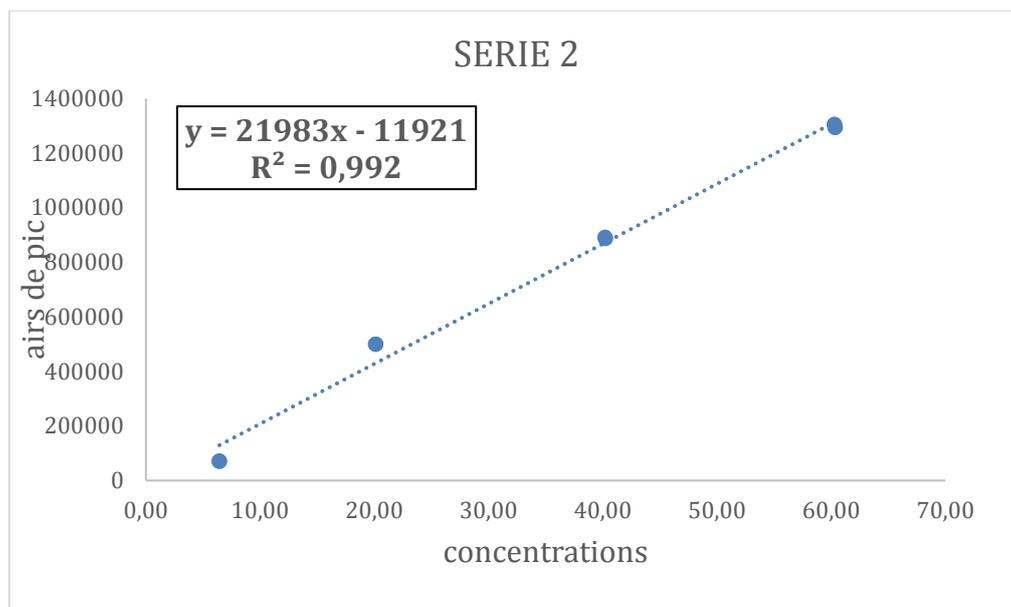


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax + b$ (série 2).

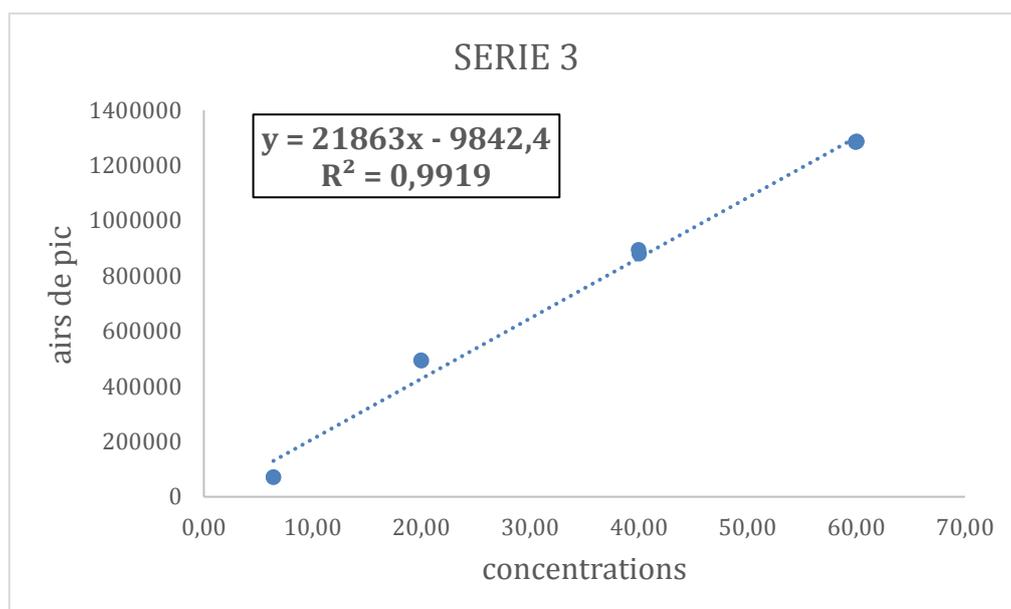


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax + b$ (série 2).

- 2^{ème} fonction : Droite passant par 0 : $y = ax$

Tableau XVIII : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Vitamine E avec la fonction : $y = ax$ (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		X(mg/L)	(Y _x)	X(mg/L)	(Y _x)	X(mg/L)	(Y _x)
6,4mg/L	1	6,53	70489	6,44	70765	6,40	70957
	2	6,45	83650	6,43	71076	6,39	72361
20mg/L	1	20,40	487768	20,11	500140	20,01	492717
	2	20,15	489266	20,10	499379	19,98	495314
40mg/L	1	40,80	917186	40,22	886919	40,02	880218
	2	40,30	913702	40,20	892287	39,96	894880
60mg/L	1	61,20	1337952	60,33	1294835	60,03	1287299
	2	60,45	1359035	60,30	1304428	59,94	1284585
Pente		22276,00		21744,00		21665,00	
Ordonnée à l'origine		0,00		0,00		0,00	

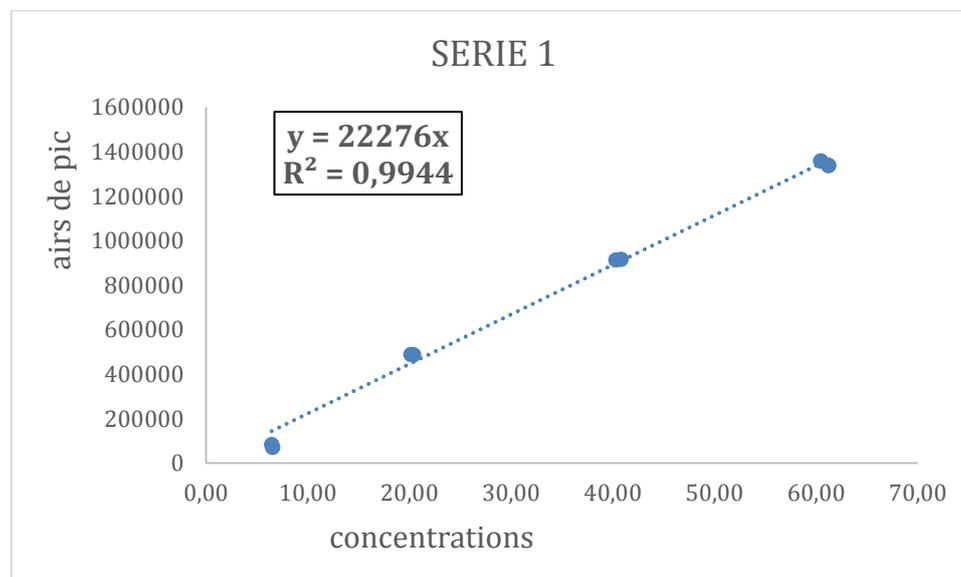


Figure 20 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax$ (Série 1).

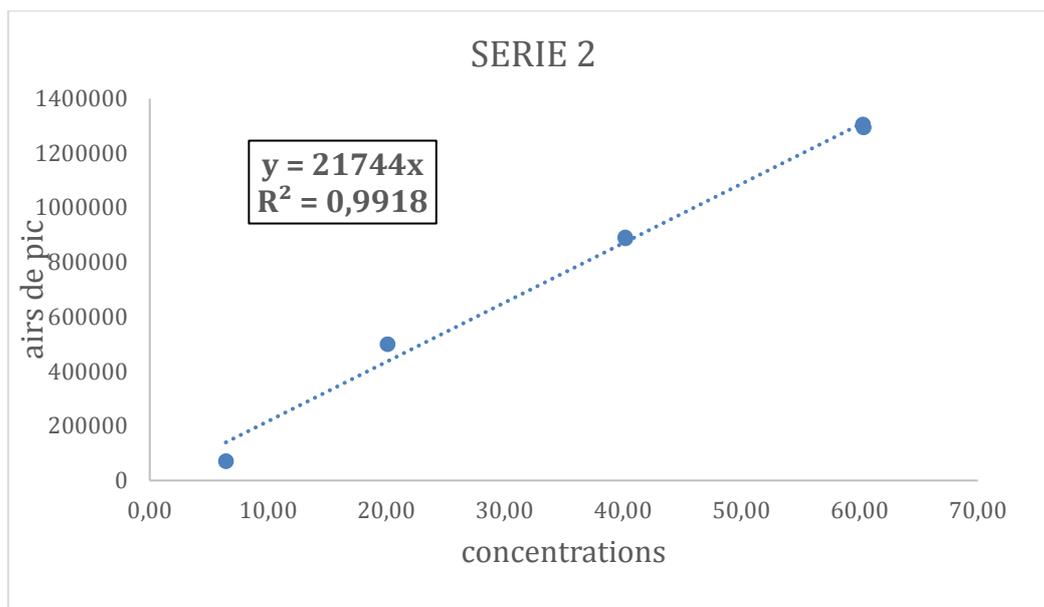


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax$ (Série 2).

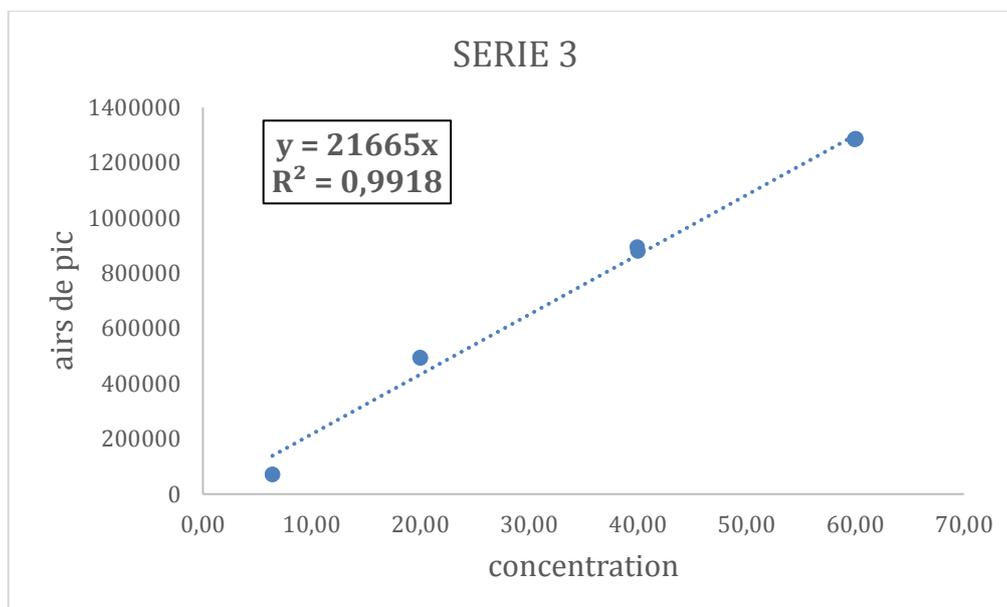


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $y = ax$ (Série 3)

- 3^{ème} fonction : Changement de variables par la fonction Logarithmique :
 $\ln y = f(\ln x)$

Tableau XIX : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Vitamine E avec la fonction : $\ln y = f(\ln x)$ (sans matrice).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		$\ln(X_x)$	$\ln(Y_x)$	$\ln(X_x)$	$\ln(Y_x)$	$\ln(X_x)$	$\ln(Y_x)$
6,4mg/L	1	1,88	11,16	1,86	11,17	1,86	11,17
	2	1,86	11,33	1,86	11,17	1,86	11,19
20mg/L	1	3,02	13,10	3,00	13,12	3,00	13,11
	2	3,00	13,10	3,00	13,12	2,99	13,11
40mg/L	1	3,71	13,73	3,69	13,70	3,69	13,69
	2	3,70	13,73	3,69	13,70	3,69	13,70
60mg/L	1	4,11	14,11	4,10	14,07	4,09	14,07
	2	4,10	14,12	4,10	14,08	4,09	14,07
<i>Pente</i>		1,2545		1,2675		1,2596	
<i>Ordonnée à l'origine</i>		9,0461		8,9815		9,0097	

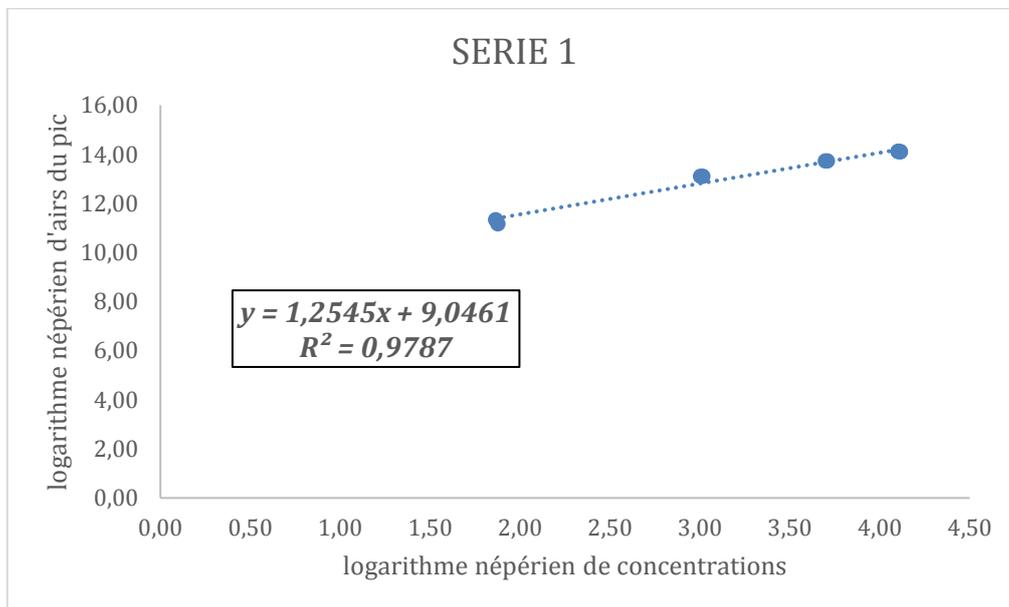


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 1).

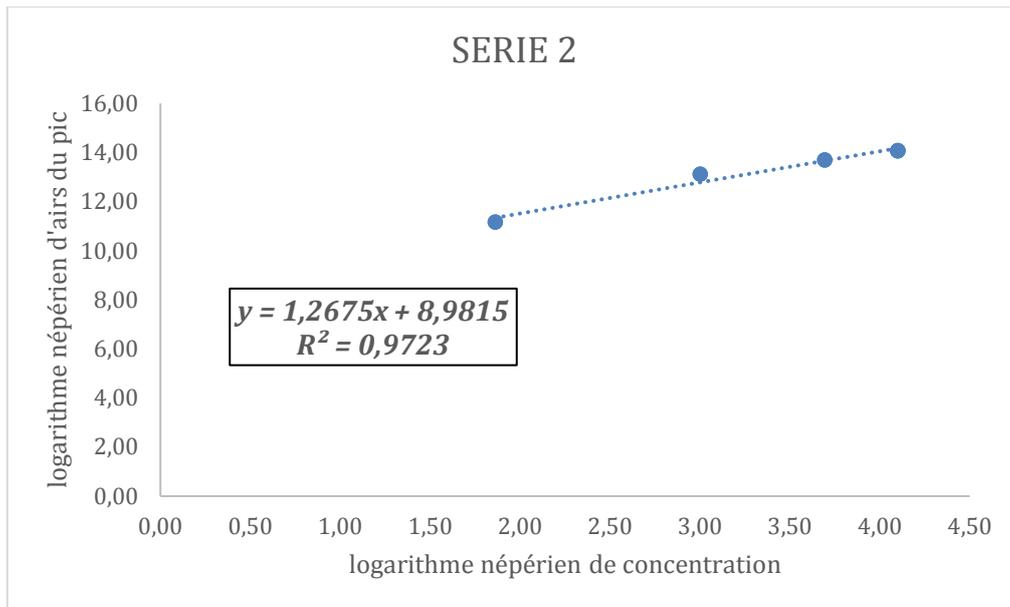


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 2).

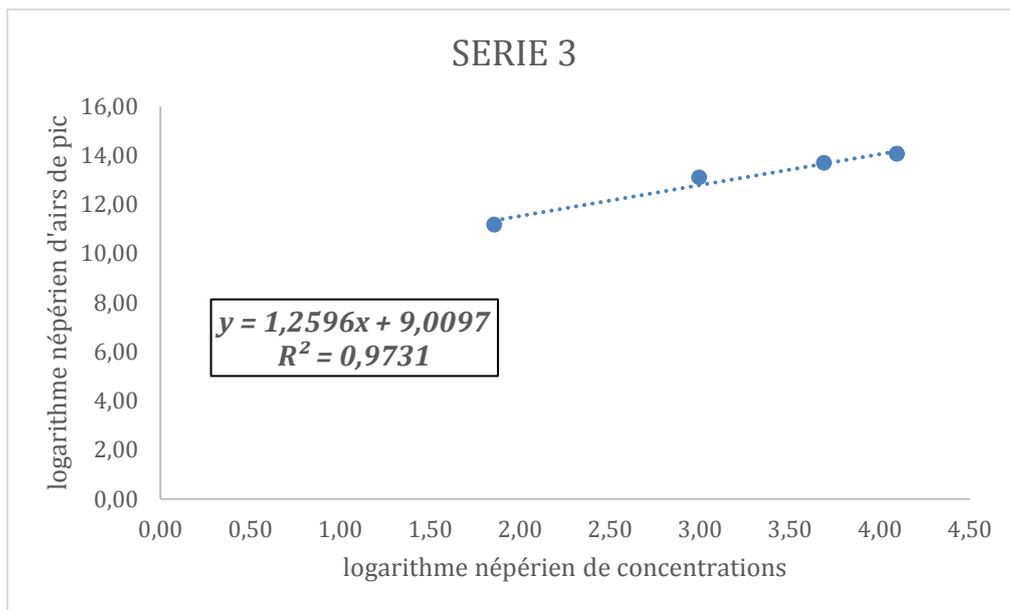


Figure 25 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 3).

- 4^{ème} fonction : Changement de variables par la racine carrée : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Tableau XX : Résultats de la Vitamine E obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (sans matrice).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		$\sqrt{(X_x)}$	$\sqrt{(Y)}$	$\sqrt{(X_x)}$	$\sqrt{(Y_x)}$	$\sqrt{(X_x)}$	$\sqrt{(Y_x)}$
6,4mg/L	1	2,55	265,50	2,54	266,02	2,53	266,38
	2	2,54	289,22	2,54	266,60	2,53	269,00
20mg/L	1	4,52	698,40	4,48	707,21	4,47	701,94
	2	4,49	699,48	4,48	706,67	4,47	703,79
40mg/L	1	6,39	957,70	6,34	941,76	6,33	938,20
	2	6,35	955,88	6,34	944,61	6,32	945,98
60mg/L	1	7,82	1156,70	7,77	1137,91	7,75	1134,59
	2	7,77	1165,78	7,77	1142,12	7,74	1133,40
<i>Pente</i>		163,4259		160,8824		160,1576	
<i>Ordonnée à l'origine</i>		-97,2725		-90,4157		-86,8574	

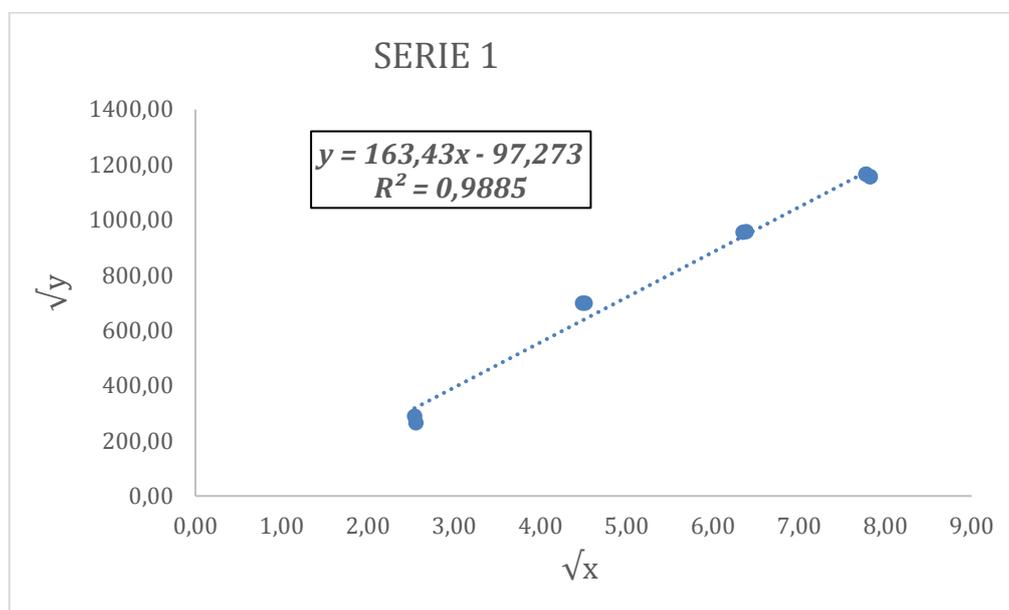


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 1).

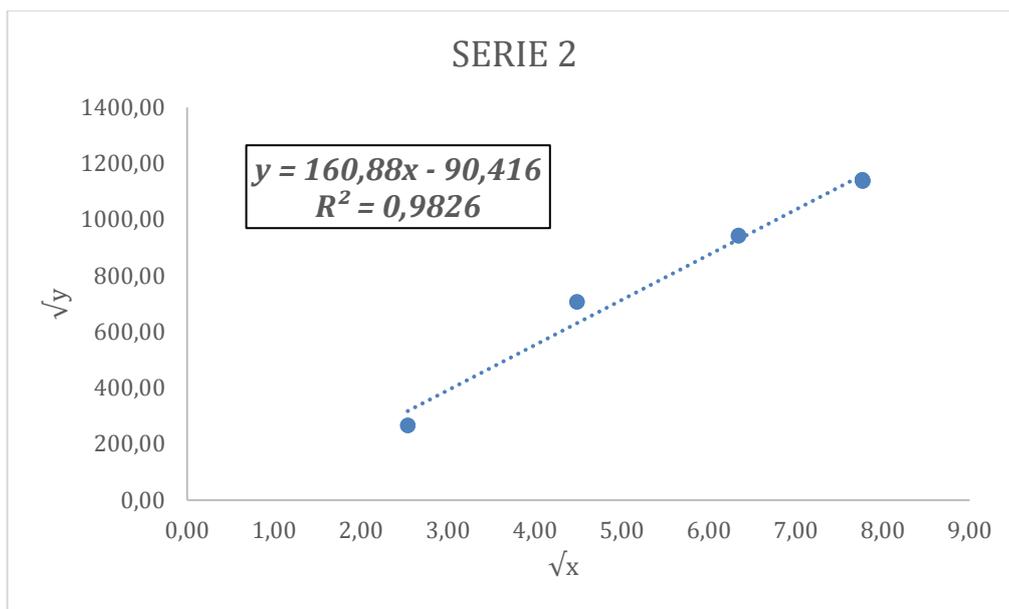


Figure 27 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 2).

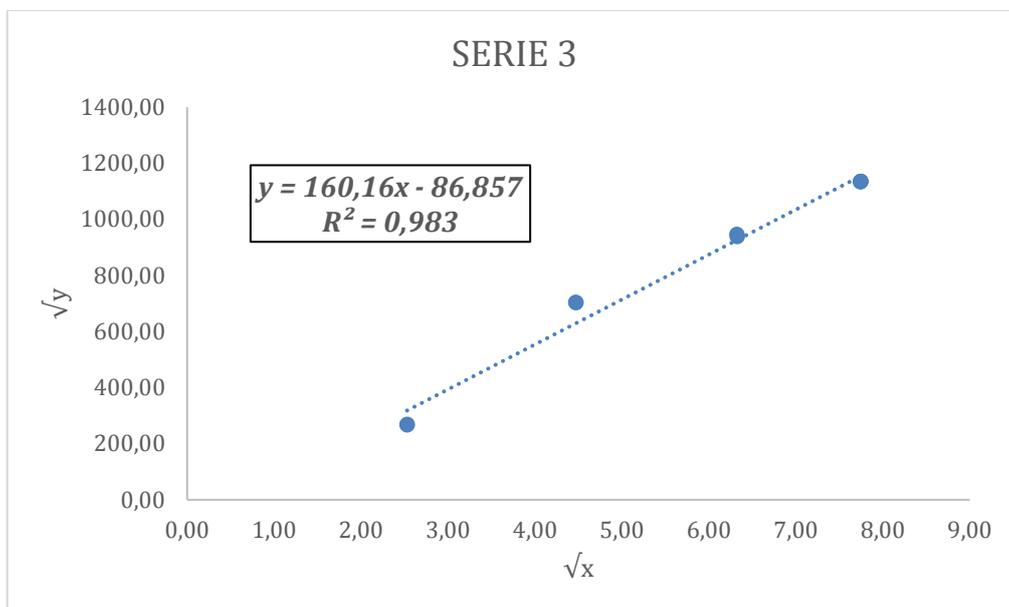


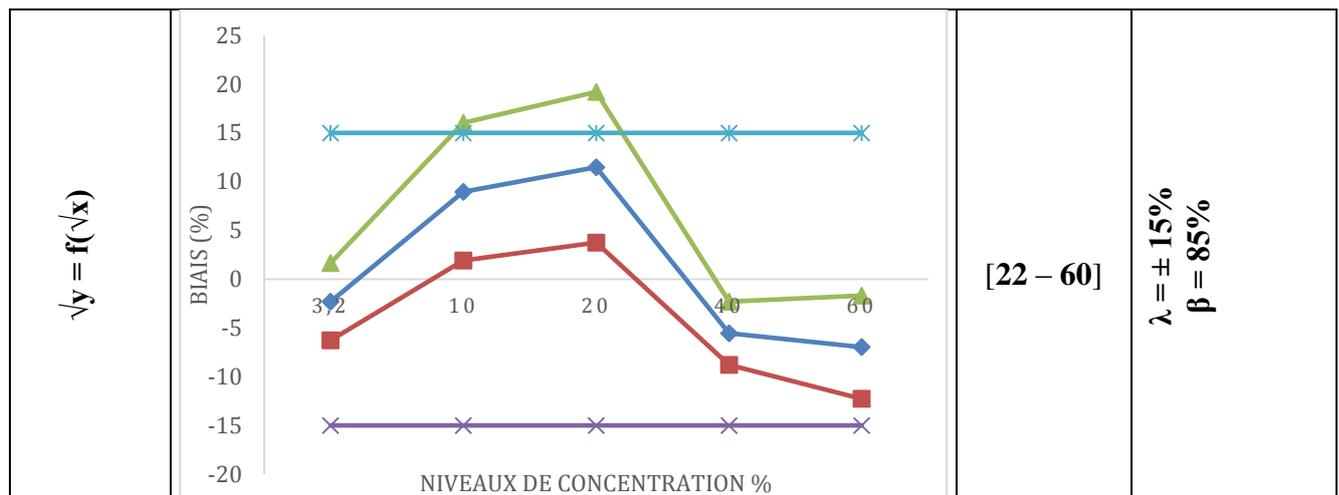
Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la Vitamine E obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 3).

4.7 Profils d'exactitude obtenus

Nous avons cité dans le tableau ci-dessous les différents profils d'exactitude à titre indicatif pour justifier notre choix de la fonction de réponse.

Tableau XXI : Profils d'exactitude obtenus pour la Vitamine E.

Fonction de réponse	Profils d'exactitude	Intervalle de dosage (mg/L)	Paramètres de validation
$y = ax + b$	<p>Legend: ◆ Biais (%) ■ Limite intervalle tolérance basse ▲ Limite intervalle tolérance haute × Limite d'acceptation basse * Limite d'acceptation haute</p>	<p>[7 – 60]</p>	<p>$\lambda = \pm 15\%$ $\beta = 85\%$</p>
$y = ax$		<p>[11 – 60]</p>	<p>$\lambda = \pm 15\%$ $\beta = 85\%$</p>
$\ln y = f(\ln x)$		<p>[22 – 60]</p>	<p>$\lambda = \pm 15\%$ $\beta = 85\%$</p>



4.8 Choix de la fonction de réponse

Notre objectif est de choisir un modèle d'étalonnage qui donne les meilleurs résultats de validation à savoir :

- ✓ Un intervalle de dosage le plus étendue ;
- ✓ Un intervalle de tolérance le plus étroit ;
- ✓ Une simplicité d'utilisation et de transformation lors du calcul des concentrations.

La fonction de réponse qui répond le mieux à ses critères est : $y = \mathbf{ax} + \mathbf{b}$ et elle sera choisie comme modèle d'étalonnage pour notre méthode.

- ✓ Le calcul des différents critères de validation est détaillé pour les fonctions choisies, sachant que ce sont les mêmes étapes aussi suivies avec les autres modèles.
- ✓ Les réponses (Y) obtenues sont corrigées par le facteur d'extraction après avoir soustraire la réponse de la vitamine E physiologique qui est calculée par la moyenne de ses airs de pic dans le blanc plasma (six répétitions).

4.9 Alignement des observations

Pour avoir des réponses corrigées pour chaque niveau de concentration qui prennent en considération les variations des masses introduites lors des pesées, on applique un alignement des réponses obtenues à partir des standards de validation sur la moyenne des concentrations introduites.

Les résultats sont résumés dans les tableaux suivant :

Tableau XXII : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour la Vitamine E.

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (mg/L)	Réponses instrumentales (Air)	Réponses alignées (Air)	Concentration introduite (mg/L)	Réponses instrumentales (Air)	Réponses alignées (Air)	Concentration introduite (mg/L)	Réponses instrumentales (Air)	Réponses alignées (Air)
3,2mg/L	1	3,21	38456	38286	3,19	35314	35337	3,19	37661	37615
	2	3,21	40933	40945	3,20	38196	38149	3,18	36104	36302
	3	3,20	39452	39610	3,19	36332	36355	3,19	35759	35607
10mg/L	1	10,05	191871	191339	9,98	197581	197654	9,96	204415	204270
	2	10,02	183493	183531	9,99	203016	202870	9,93	194406	195026
	3	10,00	172020	172514	9,98	189820	189893	9,98	214309	213835
20mg/L	1	20,09	427378	426315	19,95	466359	466505	19,92	493638	493346
	2	20,04	445780	445856	19,97	424035	423741	19,85	455822	457061
	3	20,00	436741	437728	19,95	447415	447562	19,95	446639	445692
40mg/L	1	40,18	829895	827769	39,90	819895	820188	39,84	813596	813013
	2	40,08	792121	792273	39,94	812822	812236	39,70	801955	804433
	3	40,00	837864	839838	39,90	793310	793603	39,90	793557	791662
60mg/L	1	60,27	1270128	1266939	59,85	1268056	1268495	59,76	1237372	1236497
	2	60,12	1221342	1221569	59,91	1170677	1169797	59,55	1280308	1284025
	3	60,00	1254137	1257098	59,85	1264174	1264614	59,85	1202676	1199834

4.10 Justesse

La justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif et de taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau XXIII : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour la Vitamine E.

Niveau de concentration	3,2mg/L	10mg/L	20mg/L	40mg/L	60mg/L
<i>Moyenne des Concentrations introduites (mg/L)</i>	3,195	9,984	19,969	39,938	59,907
<i>Moyenne des Concentrations calculées (mg/L)</i>	2,393	9,471	20,947	37,205	56,594
<i>Biais absolu</i>	-0,802	-0,513	0,978	-2,733	-3,313
<i>Biais relatif (%)</i>	-25,11	-5,14	4,90	-6,84	-5,53
<i>Taux de recouvrement (%)</i>	74,89	94,86	104,90	93,16	94,47

4.11 Fidélité

La fidélité est évaluée pour chaque niveau de concentration, elle est calculée par les écarts types et les coefficients de variation qui estiment la répétabilité et la fidélité intermédiaire, les résultats sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XXIV : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour la Vitamine E.

Niveaux de Concentrations (mg/L)	3,2mg/L	10mg/L	20mg/L	40mg/L	60mg/L
Moyenne des concentrations théoriques (mg/L)	3,195	9,984	19,969	39,938	59,907
Concentration moyenne retrouvé (mg/L)	2,393	9,471	20,947	37,205	56,594
SCE résiduelle	0,020	0,891	4,864	3,610	22,581
SCE totale	0,973	1,582	8,112	3,687	24,974
SCE inter séries	0,953	0,691	3,248	0,077	2,392
Ecart type de répétabilité	0,057	0,385	0,900	0,776	1,940
Ecart type inter séries	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,057	0,385	0,900	0,776	1,940
CV de répétabilité	2,386	4,070	4,298	2,085	3,428
CV de fidélité intermédiaire	2,386	4,070	4,298	2,085	3,428

4.12 Exactitude

A partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport à la concentration introduite. Les tableaux ci-dessous résument les résultats obtenus :

Tableau XXV : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour la Vitamine E..

Niveaux %	Répétitions	Séries (Jour)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)
3,2mg/L	1	3,214	2,792	15,14	3,19	2,150	48,48	3,19	2,171	46,83
	2	3,206	2,908	10,24	3,20	2,278	40,29	3,18	2,111	50,48
	3	3,200	2,850	12,29	3,19	2,196	45,35	3,19	2,079	53,55
10mg/L	1	10,045	9,510	5,62	9,98	9,533	4,63	9,96	9,793	1,70
	2	10,020	9,168	9,30	9,99	9,771	2,19	9,93	9,370	5,92
	3	10,000	8,684	15,15	9,98	9,180	8,66	9,98	10,231	-2,50
20mg/L	1	20,090	19,826	1,33	19,95	21,763	-8,33	19,92	23,015	-13,45
	2	20,040	20,683	-3,11	19,97	19,818	0,77	19,85	21,355	-7,05
	3	20,000	20,327	-1,61	19,95	20,902	-4,55	19,95	20,835	-4,25
40mg/L	1	40,180	37,449	7,29	39,90	37,852	5,41	39,84	37,636	5,86
	2	40,080	35,890	11,67	39,94	37,491	6,53	39,70	37,244	6,60
	3	40,000	37,978	5,32	39,90	36,643	8,89	39,90	36,660	8,84
60mg/L	1	60,270	56,727	6,24	59,85	58,246	2,75	59,76	57,006	4,83
	2	60,120	54,736	9,84	59,91	53,756	11,45	59,55	59,180	0,63
	3	60,000	56,295	6,58	59,85	58,069	3,07	59,85	55,329	8,17

4.13 Erreur totale et profil d'erreur totale

On a calculé l'erreur totale absolue et relative pour chaque niveau de concentration et les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XXVI : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration de la Vitamine E.

Niveau (mg/L)	3,2mg/L	10mg/L	20mg/L	40mg/L	60mg/L
Moyenne des concentrations théoriques (mg/L)	3,195	9,984	19,969	39,938	59,907
Concentration moyenne retrouvée (mg/L)	2,393	9,471	20,947	37,205	56,594
Biais relatif (%)	-25,115	-5,140	4,899	-6,843	-5,530
Biais relatif en valeur absolue	25,115	5,140	4,899	6,843	5,530
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)	2,386	4,070	4,298	2,085	3,428
Erreur totale (%)	27,500	9,210	9,197	8,928	8,958

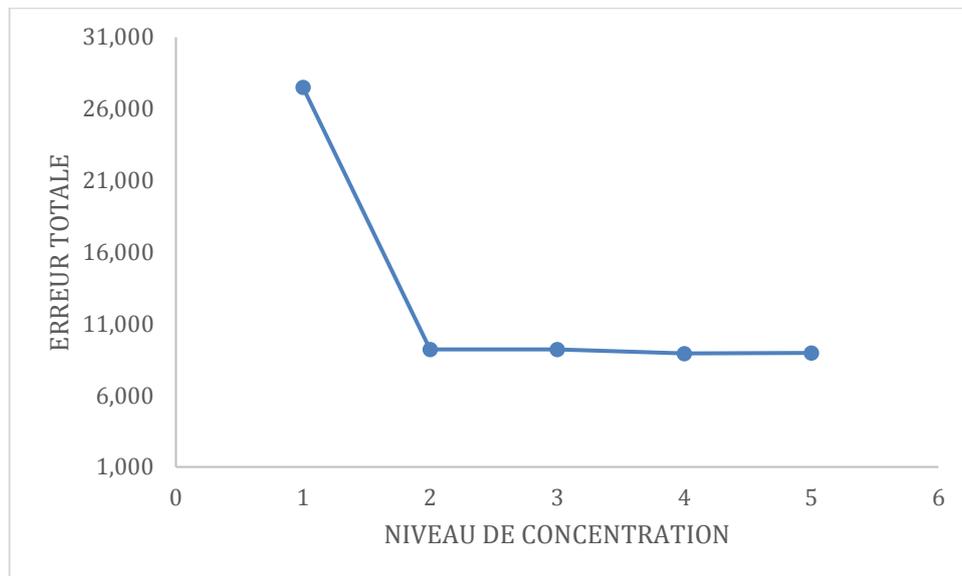


Figure 29 : Profil d'erreur totale de la Vitamine E.

4.14 Intervalle de tolérance

Les limites de l'intervalle de tolérance sont calculées et résumées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XXVII : Limites de tolérance de la Vitamine E.

Niveau de concentration	3,2mg/L	10mg/L	20mg/L	40mg/L	60mg/L
Limite intervalle tolérance basse (%)	-27,80	-10,95	-1,89	-9,77	-10,41
Limite intervalle tolérance haute (%)	-22,42	0,67	11,69	-3,92	-0,65

4.15 Profil d'exactitude

Après le calcul des critères de validation on collecte toutes les données obtenues pour tracer le profil d'exactitude qui réunit le biais relatif, les deux bornes de l'intervalle de tolérance et celles de l'intervalle d'acceptabilité, dans une courbe qui donne l'exactitude (%) en fonction des niveaux de concentrations introduites.

Les profils d'exactitude obtenus en utilisant la fonction choisie sont représentés ci-dessous :

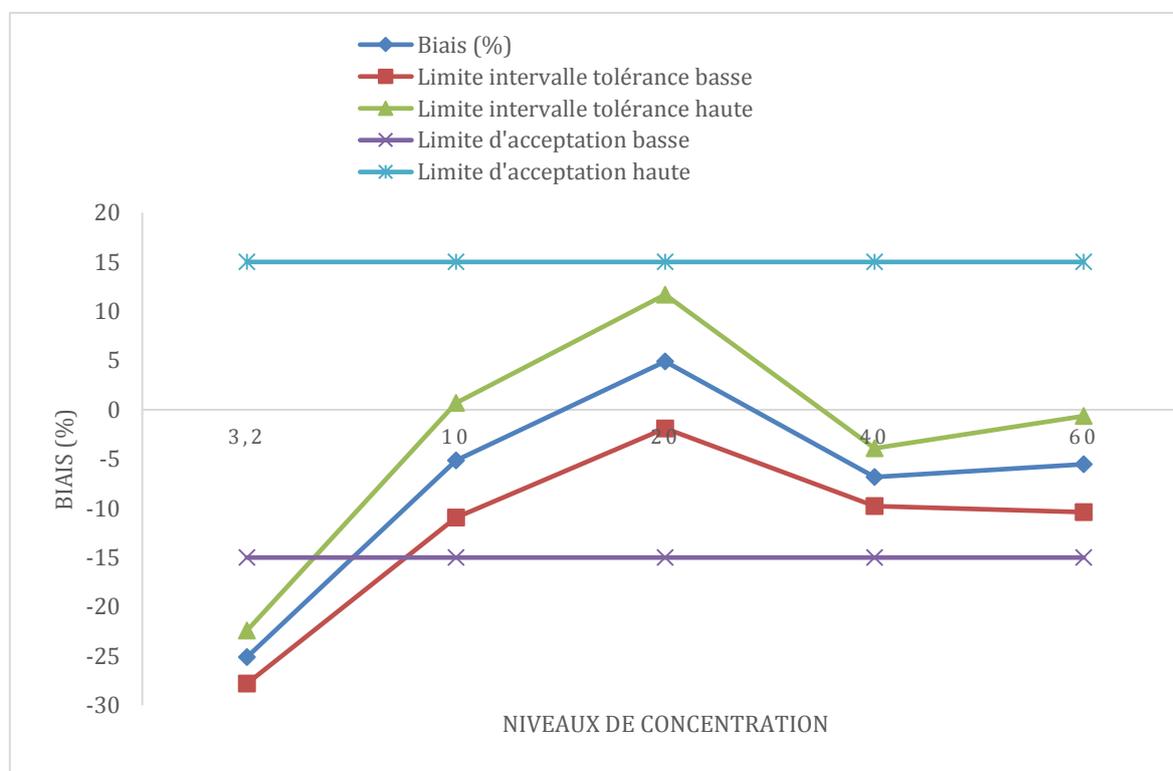


Figure 30 : Profil d'exactitude de la Vitamine E ($\beta = 85\%$ et $\lambda = 15\%$).

4.16 Linéarité

Le calcul de la linéarité nécessite différents paramètres qui nous permettent de tracer des droites de régression linéaire de la concentration prédite en fonction de la concentration introduite.

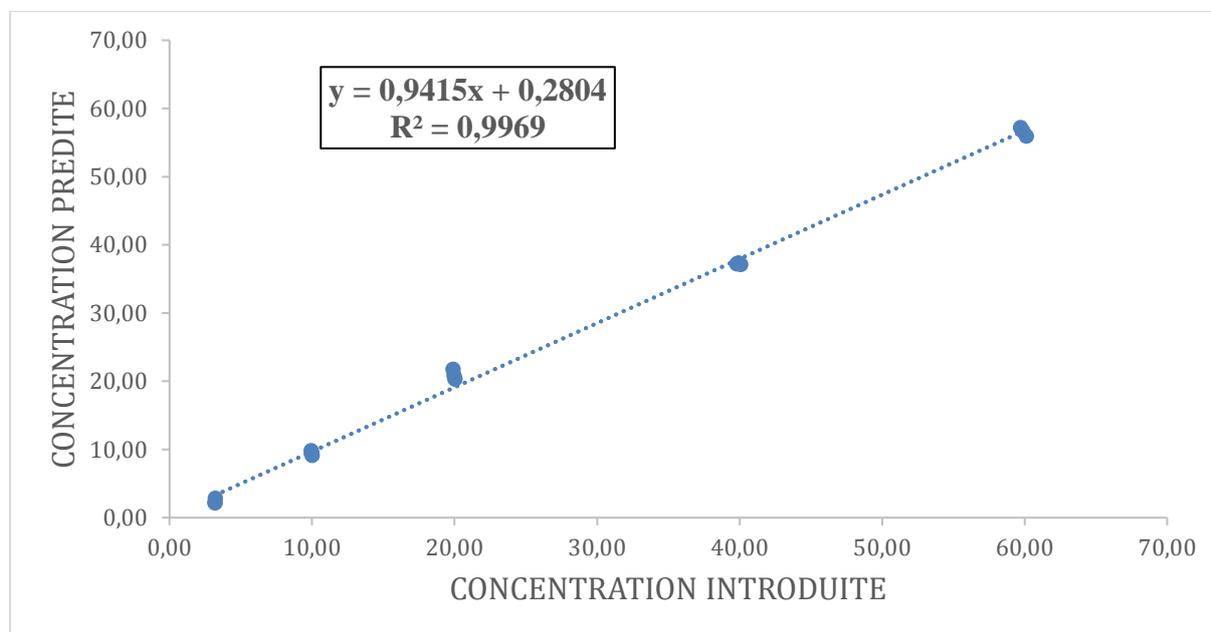


Figure 31 : Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Vitamine E.

La linéarité de la concentration prédite est évaluée statistiquement en comparant la pente avec 1 et l'ordonnée à l'origine avec 0 au risque $\alpha = 5\%$.

Tableau XXVIII : Évaluation statistique de la linéarité de la Vitamine E.

Pente	0,9415
Ordonnée à l'origine	0,2804
Erreur pente	0,0280
Erreur ordonnée à l'origine	0,4895

Comparaison de la pente avec 1	<i>t calculé</i>	2,09	Différence non significative
	<i>t°(α ; 13)</i>	2,16	
	<i>Condition</i>	t calculé < t°(α ; 13)	
Comparaison de l'ordonnées à l'origine avec 0	<i>t calculé</i>	0,57	Différence non significative
	<i>t°(α ; 13)</i>	2,16	
	<i>Condition</i>	t calculé < t°(α ; 13)	

4.17 Limites de quantification

Les limites de quantification sont obtenues à partir du profil d'exactitude en calculant les concentrations (hautes et basses) à partir desquelles les limites supérieures ou inférieures de l'intervalle de tolérance sortent des limites d'acceptabilité ($\pm\lambda$) au niveau de la probabilité choisi (β).

A partir du profil d'exactitude de la Vitamine E on constate que le premier point d'intersection est entre la limite basse de tolérance et la limite basse d'acceptabilité, et ceci, entre le niveau de plus basse concentration (3,2 mg/L) et le niveau supérieur (10 mg/L). Cette limite de quantification inférieure est calculée comme suit :

Tableau XXIX : calcul de la limite de quantification basse de la Vitamine E

	Niveau A (3,2 mg/L)	Niveau B (10 mg/L)
<i>Concentration moyenne théorique</i>	3,20	9,98
<i>Limite intervalle tolérance critique</i>	2,31	8,89
<i>Limite d'acceptabilité critique</i>	2,72	8,49
<hr/>		
<i>Droite</i>	Pente	Origine
<i>Intervalle tolérance (U)</i>	0,97	-0,79
<i>Limite d'acceptabilité CRITIQUE</i>	0,85	0,00
<hr/>		
<i>Limite de quantification BASSE (mg/l)</i>	6,61	

Vu qu'il n'y a aucune intersection du côté des concentrations supérieures à 10 mg/L, la limite de quantification haute correspondra à la limite supérieure de l'intervalle de dosage étudié à savoir 60 mg/L.

- ✓ Pour la Vitamine E, les limites de quantification sont : **[6,61 ; 60] mg/L**.

DISCUSSION

5 Discussion

Le dosage de la vitamine E est habituellement dosé par des méthodes HPLC qui utilisent des dérivatisations.

Dans notre projet on a développé et validé une méthode sans dérivatisation adaptée au moyens disponibles ; il s'agit d'une méthode de dosage de la vitamine E par HPLC-UV, et cela dans le cadre d'optimiser et de standardiser cette méthode pour des dosages en routine, dans le but de diagnostiquer des éventuels perturbations du taux de la vitamine E.

Après de longues étapes d'optimisation du protocole, on a pu valider le dosage de la Vitamine E dans le plasma humain selon les recommandations de SFSTP 2006.

Et on a abouti à des résultats comme ils sont déterminés précédemment, qu'on interprètera dans une discussion qui sera détaillée comme suit :

5.1 Spécificité

Elle est obtenue en comparant les chromatogrammes sans et avec la Vitamine E.

La spécificité est évaluée par comparaison des chromatogrammes

Selon les résultats obtenus, la spécificité de la méthode est confirmée par :

- L'absence de pic au temps de rétention théorique dans le chromatogramme obtenu avec le non chargé avec la Vitamine E ;
- Les temps de rétention du pic de la vitamine E dans le standard d'étalonnage et le standard de validation d'un même niveau de concentration sont comparables.

5.2 Prédiction inverses

Les concentrations prédites à partir des réponses alignées sont représentées pour chaque prise d'essai dans les tableaux suivants :

Tableau XXX : Concentrations calculées par prédiction inverse pour la Vitamine E.

Niveaux	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 2	
		Réponses alignées (Air)	Prédictions inverses (mg/L)	Réponses alignées (Air)	Prédictions inverses (mg/L)	Réponses alignées (Air)	Prédictions inverses (mg/L)
3,2mg/L	1	38286	2,79	35337	2,15	37615	2,17
	2	40945	2,91	38149	2,28	36302	2,11
	3	39610	2,85	36355	2,20	35607	2,08
10mg/L	1	191339	9,51	197654	9,53	204270	9,79
	2	183531	9,17	202870	9,77	195026	9,37
	3	172514	8,68	189893	9,18	213835	10,23
20mg/L	1	426315	19,83	466505	21,76	493346	23,02
	2	445856	20,68	423741	19,82	457061	21,36
	3	437728	20,33	447562	20,90	445692	20,84
40mg/L	1	827769	37,45	820188	37,85	813013	37,64
	2	792273	35,89	812236	37,49	804433	37,24
	3	839838	37,98	793603	36,64	791662	36,66
60mg/L	1	1266939	56,73	1268495	58,25	1236497	57,01
	2	1221569	54,74	1169797	53,76	1284025	59,18
	3	1257098	56,30	1264614	58,07	1199834	55,33

5.3 Le choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude élucidés dans les figures précédentes, les fonctions de réponses qu'on a utilisées sont :

- Régression linéaire avec une équation : $y = ax + b$
- Droite passant par 0 : $y = ax$
- Fonction logarithme népérien : $\ln y = f(\ln x)$
- Fonction racine carrée : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Vu la simplicité du modèle $y = ax + b$ et un intervalle d'étalonnage le plus large trouvé de [6,61 ; 60] mg/L, notre choix s'est porté sur ce dernier.

5.4 Critères de performance de la fonction de réponse choisie

5.4.1 Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérées comme

étant la valeur de référence est assez étroit pour 4 niveaux (2 ;3 ;4 et 5ème) en tenant compte que les biais relatifs de ces derniers sont inférieurs à 15 %, donc la méthode est juste.

Exception faite pour le premier et le dernier niveau qui a un biais relatif important.

5.4.2 Fidélité

La dispersion des prédictions inverses des concentrations des trois séries de validation est assez étroite pour l'ensemble des niveaux de concentration, du fait que les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire de ces niveaux sont inférieurs à 5 %.

Compte tenu de ses valeurs, la fidélité intra-série de la méthode est jugée satisfaisante, la méthode est donc fidèle.

5.5 Critères de décision sur la validation de la méthode

5.5.1 Erreur total

Selon le profil de l'erreur totale élucidé dans la figure (29) on constate que :

Les niveaux deux ; trois ; quatre et cinq présentent une erreur totale acceptable inférieur à 15% donc ils sont inclus dans l'intervalle de validité ; cependant le premier possède une erreur totale supérieur à 15% confirmant les résultats de la justesse et de la fidélité.

5.5.2 Profil d'exactitude

En se référant au profil d'exactitude dans la figure (30), on considère que la méthode est valide sur notre intervalle de dosage **[6,61 ; 60] mg/L** où le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation $\lambda = \pm 15\%$.

Cela signifie qu'on peut garantir l'acceptabilité de 85% des futures résultats par notre méthode et seulement 15% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent être en dehors de ces limites.

5.5.3 Limite de quantification et intervalle de dosage

La méthode est considérée comme valide dans l'intervalle **[6,61 ; 60] mg/L**; pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies : [-15% ; +15%] avec un risque d'avoir au maximum 15% des mesures en dehors des limites d'acceptation.

5.6 Linéarité

La linéarité a été évaluée à partir de cinq niveaux de concentration (3,2 ; 10 ; 20 ; 40 ; 60) avec la première répétition de chaque niveau des trois séries (n = 3). La droite de régression linéaire est obtenue sous la forme $y = ax + b$, où a représente la pente de la droite et b l'ordonnée à l'origine. Y représente la concentration prédite et x la concentration introduite en mg/ml.

La linéarité de la droite des concentrations prédites en fonction des concentrations introduites est confirmée par :

- Un coefficient de détermination acceptable $R^2 = 0.9969$.
- Une pente significativement différente de zéro donc il existe une relation linéaire. De plus elle est comparable à 1 au risque 5% ($a = 0.9415$).
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque 5% ($b = 0,2804$).

Les résultats obtenus dans notre démarche, dépendent aux objectifs fixés. La méthode a été évaluée avec une bonne spécificité, une bonne linéarité entre les concentrations retrouvées et les aires de pics, exacte sur l'intervalle **[6,61 ; 60] mg/L**. Par conséquent elle a été jugée valide et adaptée à l'usage auquel elle est destinée.

En conclusion l'utilisation de l'HPLC en phase inverse couplée au détecteur UV est une bonne approche pour l'obtention des résultats proche de la réalité.

6 Fiche technique de la méthode de dosage

Principe du dosage

La méthode de dosage s'agit d'une séparation chromatographique par HPLC de la vitamine E dans un plasma déprotéinisé, en utilisant un étalonnage externe, et la quantifier par un détecteur UV.

Cette technique mis à profit la capacité d'absorption de la Vit E à une longueur d'onde de 220 nm (UV).

Cette méthode de dosage est valide dans un intervalle [6,61 ; 60] mg/L, où 85% des futures résultats se situeront dans les limites d'acceptabilité : $\lambda = +/- 15\%$.

NB : Pour chaque mesure il faut multiplier les aires de pics par un facteur d'extraction de **1,4** pour éliminer les pertes liées à l'extraction.

Réactifs utilisés

- Plasma des patients.
- Méthanol.
- N-hexane.
- Ethanol.
- Acétonitrile.

Conditions chromatographiques

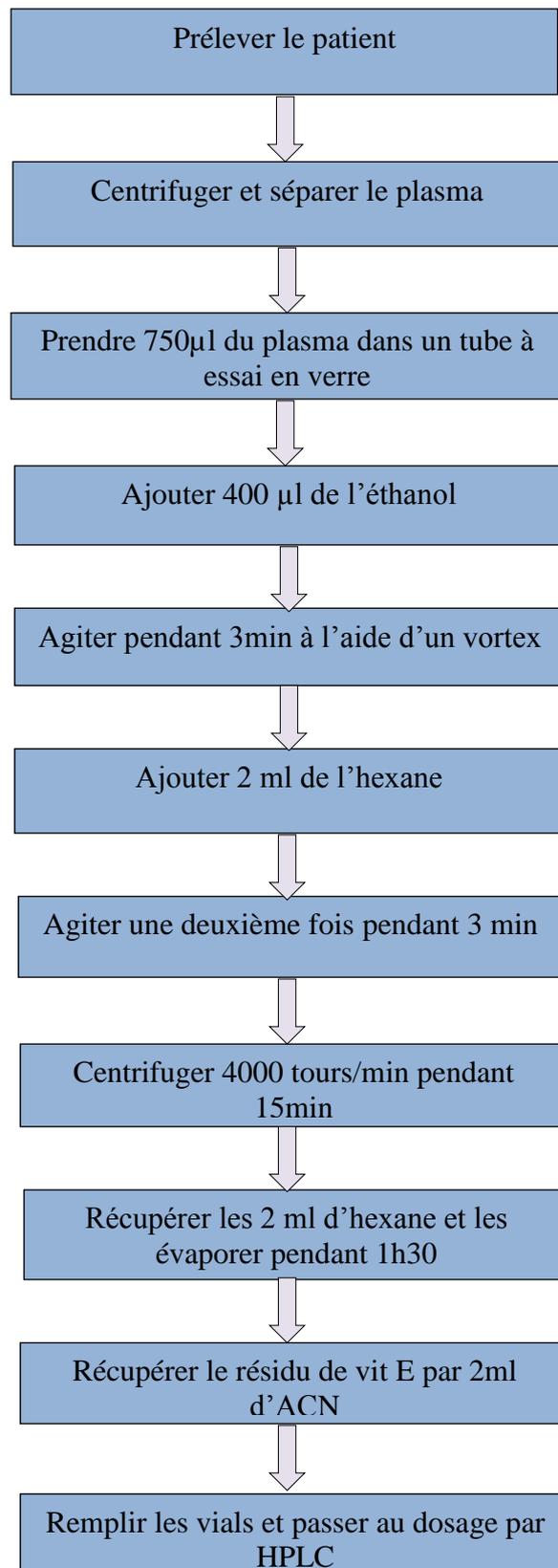
Les conditions chromatographiques respectées au cours de notre étude sont les suivantes :

Tableau XXXI : Conditions chromatographiques de la méthode.

Colonne	C18 ; longueur :15cm
Phase mobile	Méthanol pur 100%
Détection	Détecteur UV-Visible $\lambda=220$
Volume d'injection	50 μ l
Débit d'injection	1,2 ml/min
Temps d'analyse	10 min
Température	35°
Mode de passage de la phase mobile	Isocratique

Mode opératoire

Le mode opératoire utilisé est résumé comme suit :



CONCLUSION

Conclusion

Conclusion

Les déficits en vitamines E sont liés à plusieurs pathologies à savoir l'AVED qui est assez fréquente en Algérie, et qui est souvent confondue avec l'ataxie de Friedreich dont le diagnostic est génétique et onéreux.

Ce déficit expose aussi à plusieurs autres complications pathologiques provoquées par le stress oxydatif, l'exploration est basée sur l'estimation de l'équilibre de la balance pro-oxydante/anti-oxydante dont la vitamine E fait partie. Cette exploration biologique est rarement disponible dans nos laboratoires.

Le présent travail propose une nouvelle méthode de dosage fiable et réalisable, il s'agit d'une méthode R-HPLC-UV (C18, 15 cm, $\lambda=220$ nm).

La technique développée s'est avérée simple, économique, spécifique, linéaire, juste, fidèle, et exacte dans le l'intervalle de tolérance **[6,61 ; 60] mg/L** ; en vue du dosage de la vitamine E dans le plasma humain.

Conclusion

Recommandations

Bien qu'elle présente des **limites** dans les valeurs basses qui la rendent un peu moins fiable dans le diagnostic des déficits en Vit E, pour cela on **recommande** :

- L'établissement des valeurs de référence.
- Optimiser le protocole opératoire par l'amélioration de la méthode d'extraction.
- L'utilisation d'une pré-colonne qui permet d'éliminer les interférences.
- Opter pour utiliser un étalon interne.
- Utiliser des tubes ambrés lors du prélèvement vue la sensibilité de la vitamine E.
- Etablissement d'un système de contrôle qualité et l'évaluation de la stabilité des échantillons.
- Etude de la robustesse.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Références bibliographiques

- [1] Hercberg S. Vitamine E et athérosclérose : rôle potentiel de la vitamine E dans la prévention des maladies cardiovasculaires. 1996 :2.
- [2] Limbach S, Guillaud JC. Traité de nutrition artificielle de l'adulte.
- [3] Benhassine T, Ferrat F, Ali Pacha L, Chaouch M, Tazir M, Hamadouche T. L'ataxie avec déficit en vitamine E (AVED). Diagnostic moléculaire dans une vingtaine de familles algériennes. Rev Neurol (Paris). Avr 2012;168:A10-1.
- [4] Guiga MS. Vitamine E: métabolisme, rôle physiologique: intérêt et risques d'une supplémentation. 2019:93.
- [5] Christine C. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. 2003:10.
- [6] Structure-of-tocopherols-and-tocotrienolsAll-vitamin-E-homologs-tocopherols- and tocotrienols.[En ligne].[consulté le 12 mai 2022].Disponible sur:https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-tocopherols-and-tocotrienolsAll-vitamin-E-homologs-tocopherols-and_fig1_264499538/actions#reference.
- [7] Combs GF, McClung JP. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. Fifth edition. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP; 2017. 612 p.
- [8] Claude B. LES VITAMINES DANS LES INDUSTRIES AGROALIMENTAIRES. TEC&DOC. 2003. pages 11, 74, 86 à 90, 274 à 277, 636 à 656.
- [9] Schmölz L. Complexity of vitamin E metabolism. 2016 : 14.
- [10] Borel P, Josephe M. Genetic Variations Involved in Vitamin E Status. 13 Dec 2016; 7
- [11] Biologie medicale spécialisé. VITAMINE E. [En ligne].2013 [consulté le 5 mai 2022]. Disponible sur: https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/VITAMINE_E.pdf.
- [12] Cuvelier C, Dotreppe O, Diez M, Istasse L. Vitamine E: état des connaissances chez les carnivores domestiques. II Métabolisme, besoins et apports. undefined [En ligne]. 2003 [consulté le 29 mai 2022]; Disponible sur: <https://www.semanticscholar.org/paper/Vitamine-E%3A-%C3%A9tat-des-connaissances-chez-les-II-et-Cuvelier-Dotreppe>.
- [13] Landrier JF. Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. Ol Corps Gras Lipides. mars 2011;18(2):83-7.
- [14] Mohd Zaffarin AS, Ng SF, Ng MH, Hassan H, Alias E. Pharmacology and Pharmacokinetics of Vitamin E: Nanoformulations to Enhance Bioavailability. Int J Nanomedicine. déc 2020;Volume 15:9961-74.
- [15] Schematic of a-tocopherol metabolism. [En ligne]. [consulté le 13 mai 2022]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-a-tocopherol-metabolism_fig5_230804736
- [16] Embed T. Medicaments et vitamines. [En ligne]. [Consulté le 29 mai 2022]. Disponible

Références bibliographiques

sur:

<https://embed.tumblr.com/widgets/share/button?canonicalUrl=https%3A%2F%2Fwww.pharmacorama.com%2Fpharmacologie%2Fmedicaments-vitamines%2Fvitamine-e-tocopherol%2F&postcontent%5Bposttype%5D=link&postcontent%5Btitle%5D=Vitamine%20E%20ou%20tocoph%3%A9rol&postcontent%5Bcontent%5D=https%3A%2F%2Fwww.pharmacorama.com%2Fpharmacologie%2Fmedicaments-vitamines%2Fvitamine-e-tocopherol%2F>

- [17] Dominique BR, Sébastien B, Patrick B, Dominique B, Isabel C, Sophie D, et al. Cahier de formation : Les vitamines. 2007 ;362:49-60.
- [18] Brigitte S. La vitamine E : ses effets préventifs vis à vis des cancers et des maladies cardiovasculaires [En ligne]. [Consulté le 4 mai 2022]. Disponible sur: <https://docplayer.fr/188919431-La-vitamine-e-ses-effets-preventifs-vis-a-vis-des-cancers-et-des-maladies-cardiovasculaires.html>
- [19] Larry E. Excès de vitamine E - Troubles de la nutrition [En ligne]. Nov 2020 [Consulté le 8 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/troubles-de-la-nutrition/vitamines/exc%C3%A8s-de-vitamine-e>.
- [20] Larry E. Hypervitaminose E - Troubles nutritionnels [En ligne]. Édition professionnelle du Manuel MSD. Nov 2020 [Consulté le 8 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/troubles-nutritionnels/carence-d%C3%A9pendance-et-toxicit%C3%A9-des-vitamines/hypervitaminose-e>
- [21] Eric A. Klein, Ian M. Thompson Jr, Catherine M. Tangen, John J. Crowley, M. Scott Lucia, Phyllis J. Goodman et al. Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer : the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) , JAMA.12 Oct 2011 ; 306(14) :1549-7.
- [22] Kacem I, Djebara MB, Sallami L, Hizem Y, Gargouri A, Guern EL, et al. Étude clinique et génétique des ataxies autosomiques récessives avec déficit en vitamine E. R E V U E N E U R O O G Q U E . :2.
- [23] Di Donato I, Bianchi S, Federico A. Ataxia with vitamin E deficiency: update of molecular diagnosis. Neurol Sci. août 2010;31(4):511 - 5.
- [24] Gabsi S, Gouider-Khouja N, Belal S, Fki M, Kefi M, Turki I, et al. Effect of vitamin E supplementation in patients with ataxia with vitamin E deficiency. Eur J Neurol. 18 sept 2001;8(5):477- 81.
- [25] Schuelke M. Ataxia with Vitamin E Deficiency [Internet]. GeneReviews® [Internet]. University of Washington, Seattle; 2016 [cité 21 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK1241/>
- [26] Koenig M, Campuzano V, Cossee M, Koutnikova H, Ouahchi K, Cavalier L, et al. Bases moléculaires de l'ataxie de Friedreich et de l'ataxie par déficit en vitamine E. Ann Inst PASTEUR. 1996;6.
- [27] Dini N, Abilkassem R, Ourrai H, Elyajouri H, Oulhyane R, Rouibaa F, et al. Ataxie révélant un déficit constitutionnel en vitamine E. Maroc Méd. 2012.

Références bibliographiques

- [28] Courie R. La vitamine E ne prévient pas le cancer de la prostate, c'est même probablement l'inverse ! *Option/Bio.* nov 2011;22(463):7.
- [29] Masson E. L'Alpha tocophérol maintient l'état primitif des cellules CD34⁺ de sang placentaire [Internet]. *EM-Consulte*. [cité 5 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1137453/1-alpha-tocopherol-maintien-l-etat-primitif-des-ce>.
- [30] Lewis ED, Meydani SN, Wu D. Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. *IUBMB Life.* avr 2019;71(4):487- 94.
- [31] Grundman M. Vitamin E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials. *Am J Clin Nutr.* 1 févr 2000;71(2):630S-636S.
- [32] Grimm M, Mett J, Hartmann T. The Impact of Vitamin E and Other Fat-Soluble Vitamins on Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 26 oct 2016;17(11):1785.
- [33] Chung E, Mo H, Wang S, Zu Y, Elfakhani M, Rios SR, et al. Potential roles of vitamin E in age-related changes in skeletal muscle health. *Nutr Res.* janv 2018;49:23- 36.
- [34] Pons-Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnon F, Janny L, Grizard G. Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* juin 2009;37(6):529- 35.
- [35] Faure C, Dupont C, Sermondade N, Levy R. Antioxydants and male infertility. *Med Ther Med Reprod Gynecol Endocrinol.* 1 oct 2011;13:275- 83.
- [36] Marlène Frénot, Elisabeth Vierling. *Biochimie des aliments: Diététique du sujet bien portant.* 2002. 297 p.
- [37] Packer L, éditeur. *The antioxidant vitamins C and E.* Champaign, Ill: AOCS Press; 2002. 298 p.
- [38] Hubert P, Nguyenhuu J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part I. *J Pharm Biomed Anal.* 15 nov 2004;36(3):579- 86.
- [39] Faraj PA, Berbich PA, Lazrak PB, Chkili PT, Alaoui PMT, Belmahi PA, et al. UNIVERSITE MOHAMMED V FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE RABAT. :119.
- [40] Pinguet I. Validation analytique: application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. :93.
- [41] Cycle de vie d'une méthode analytique (d'après M. Feinberg 31). | Download Scientific Diagram [Internet]. [cité 1 juin 2022]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Cycle-de-vie-dune-methode-analytique-dapres-M-Feinberg-31_fig6_281600288
- [42] Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewe W, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches. 2003;13:38.

Références bibliographiques

- [43] ANSES. Guide de validation des méthodes d'analyse. 2015.pdf.
- [44] ISO 17025.
- [45] Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2006;15.
- [46] Armand S. Analyse des différentes approches de validation de méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière. :110.
- [47] Résumé de l'intervention de M. FEINBERG (INRA Paris) lors de l'assemblée générale 2006.pdf.
- [48] Mamou M, Thèse de doctorat en sciences médicales : Stratégies de validation de nettoyage en industrie pharmaceutique : nouvelles recommandations et applications aux équipements de fabrication dans un site multiproduits , Algérie, université Mouloud Mammeri. 8 juillet 2018.
- [49] Feinberg.M et Michel.L ; le cahier des techniques de l'Inra, Validation des méthodes d'analyses quantitatives par le profil d'exactitude ; 2010
- [50] MAMOUM.M. Cours Etude théorique de la chromatographie. Laboratoire de Chimie Analytique département de Pharmacie de Tizi Ouzou;
- [51] Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. J Pharm Biomed Anal. sept 2007;45(1):82- 96.
- [52] Rouessac A, Rouessac F. L'essentiel de techniques instrumentales d'analyse chimique. Malakoff: Dunod; 2021. (Tout en fiches).
- [53] Coskun O. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. North Clin Istanbul [Internet]. 2016 [cité 26 mai 2022]; Disponible sur: https://www.journalagent.com/nci/pdfs/NCI_3_2_156_160.pdf
- [54] PHARMACOPÉE EUROPÉENNE, 7e ÉDITION. 2010.
- [55] Commission SFSTP. HPLC Principe et appareillage - Les séries SMS, BSE et BGB [Internet]. [cité 15 mai 2022]. Disponible sur: <https://sms-bse-bgb.ac-normandie.fr/?article475>
- [56] Francis Rouessac, Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché. ANALYSE CHIMIQUE :Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6e édition. 2004.
- [57] ADMINISTRATEUR. Chromatographie Liquide Haute Performance HPLC [Internet]. Chimie Analytique. 2020 [cité 15 mai 2022]. Disponible sur: <https://chimieanalytique.com/chromatographie-liquide-haute-performance-hplc/>
- [58] Blum MF. High performance liquid chromatography. Br J Hosp Med. 2014;75:4.

Références bibliographiques

- [59] CHAPITRE II: CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE disponible sur https://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/ancien_site/CHIM/Jumber/pdf_chimie/HPLC.pdf
- [60] HPLC Principe et appareillage, Ressources pédagogiques - Biochimie et Bio moléculaire, [cité mercredi 20 janvier 2010]. Disponible sur : <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>.
- [61] Bayle A, Berny L, Later R. Fiche-infos-BSF-Humatem-HPLC. 2013. Pdf
- [62] Cours de professeur Jean-Louis CUQ, université de Montpellier.
- [63] Town WG, Currano JN, American Chemical Society, éditeurs. Science and the law: analytical data in support of regulation in health, food, and the environment. Washington, DC: American Chemical Society; 2014. 178 p. (ACS symposium series).
- [64] K. Robards, P.R. Haddad, P.E. Jackson, 5 - High-performance Liquid Chromatography—Instrumentation and Techniques, Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, Academic Press, 2004, Pages 227-303, ISBN 9780080571782,



ANNEXES



**CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE À HAUTE
PERFORMANCE**

La chromatographie est une technique biophysique importante qui permet la séparation, l'identification et la purification des composants d'un mélange pour une analyse qualitative et quantitative. Quatre techniques de séparation basées sur les caractéristiques moléculaires et le type d'interaction utilisent les mécanismes d'échange d'ions, d'adsorption de surface, de partition et d'exclusion de taille (53).

1 Définition

La chromatographie liquide à haute performance est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire (54).

2 Principe

L'introduction dans la phase mobile liquide (éluant) la solution contenant les composés à séparer (solutés) et le solvant. En fonction de la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire emprisonnée dans une colonne chromatographique, ou fixée sur un support.

Sous haute pression la phase mobile est poussée par une pompe, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme (55).

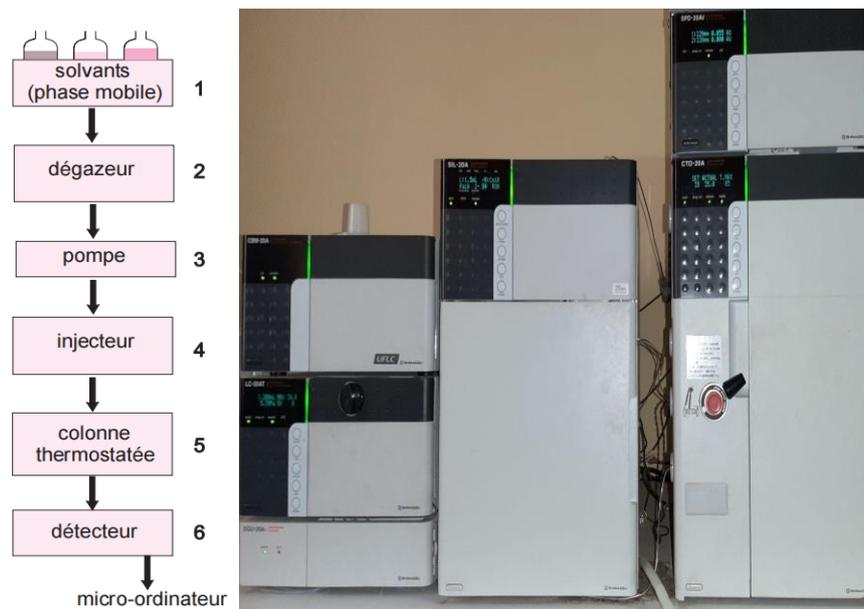


Figure : Schéma d'une installation de HPLC (56).

3 Conception générales d'un appareil HPLC

La phase mobile est pompée à partir d'une bouteille et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante.

Le signal du détecteur est amplifié et enregistré (55).

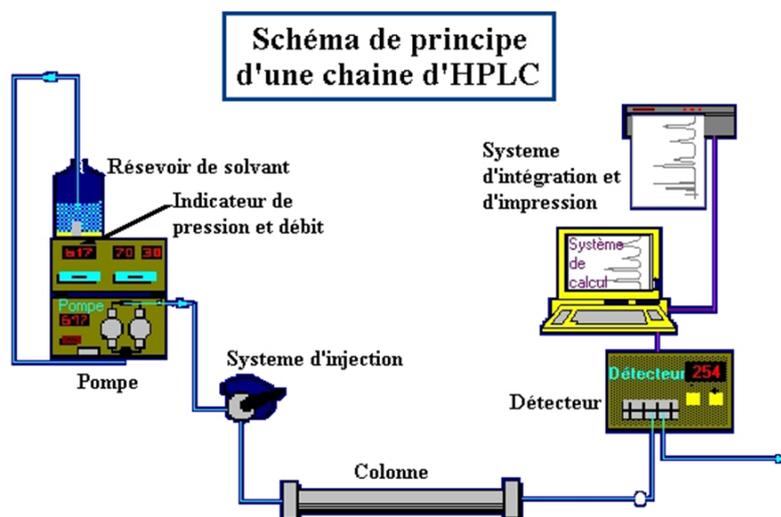


Figure : Schéma des principaux modules d'une chaîne HPLC (57).

3.1 Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium (55).

3.2 Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Actuellement les paramètres d'une pompe sont:

* débit : 0,01 à 10 ml/min

* stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)

* pression maximale > 350 bars

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution) (55).

Deux modes sont utilisés pour l'analyse chromatographique :

- ❖ **Mode isocratique** : la pompe délivre à la colonne une phase mobile (solvant pur ou mélange de solvant) de composition fixe au cours de toute la durée de séparation.
- ❖ **Mode gradient** : la pompe délivre à la colonne une phase mobile (mélange de solvant) de composition variable au cours de toute la durée de séparation. Le but étant d'améliorer la résolution des solutés mal retenus au début de la séparation, tandis que les solutés plus fortement retenus sont élues dans un temps plus court.

Deux systèmes pour générer le gradient d'élution :

- Système basse pression : se fait avec des pompes quaternaires, mélange en amont de la pompe.
- Système haute pression : se fait avec des pompes binaires, mélange en aval de la pompe (64).

3.3 Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne (55).

- **Vanne à boucle d'échantillonnage**

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue (55).

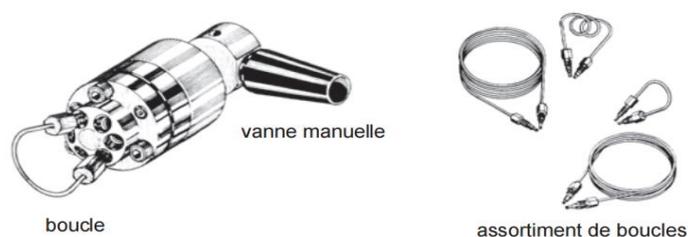


Figure : Vanne d'injection pour HPLC et boucles assorties (56).

3.4 Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25 cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μm . Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme, des colonnes de gros diamètre seront nécessaires (55).

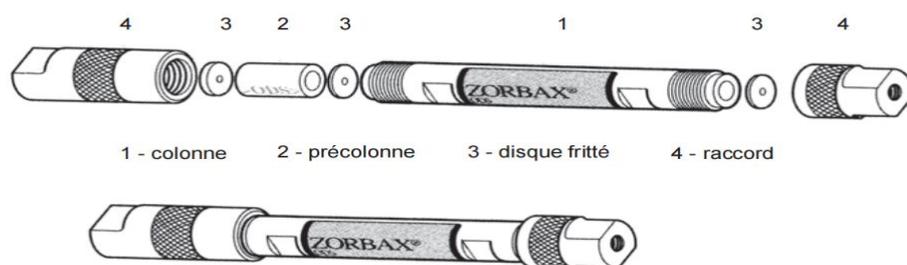


Figure : Colonne standard et pré-colonne d'HPLC (56).

3.5 Phase stationnaire

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées. Pour raccourcir les temps d'analyse, il faut tenter d'accélérer dans la colonne les transferts entre les phases mobiles et fixes.

3.5.1 La chromatographie en phase normale

La silice non modifiée est utilisée avec un gradient allant des solvants non polaires aux solvants polaires. Les composants les plus polaires de l'analyte s'adsorbent plus fortement à la phase stationnaire et nécessitent donc une phase mobile plus polaire pour les déplacer et les éluer de la colonne. A l'inverse, les composants non polaires ont une faible affinité pour la phase stationnaire et éluent donc avec un temps de rétention plus court(56,58).

3.5.2 La chromatographie en phase inverse

Utilise des chaînes à 8 ou 18 carbones liées à la silice et un gradient passant du solvant polaire au solvant non polaire. Les composants les plus lipophiles de l'analyte s'adsorbent plus facilement et sont élues de la colonne lorsque la polarité du solvant est diminuée (56,58).

3.6 La phase mobile

L'interaction est plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée, se base sur la rétention des solutés. En fonction de la polarité de la phase stationnaire on distingue deux situations de principe :

- Si la phase stationnaire est polaire on utilisera une phase mobile peu polaire, la chromatographie est dite en phase normale.
- Si la phase stationnaire est très peu polaire on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol et d'acétonitrile avec l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse.

En modifiant la polarité de la phase mobile on agit sur les facteurs de rétention K des composées (59).

3.7 Détecteurs

L'analyse par chromatographie a rarement pour but de déterminer la composition totale de l'échantillon, mais plutôt de repérer la présence ou doser un composé présent, pour lequel on a choisi un détecteur bien adapté.

Pour détecter on utilise différents phénomènes physico-chimiques, le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption dans l'UV-Visible (60).

Il existe différents types de détecteurs :

- **Détecteurs UV-visible :** Ce sont les plus utilisés. On distingue les appareils
 - À longueur d'onde fixe $\lambda = 254$ nm par exemple
 - À longueurs d'ondes variable de 200 à 700 nm
 - À barrette de diodes: analyse simultanée sur tout le spectre (57).
- **Réfractomètre différentiel :** Il mesure en continu la différence de l'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne. Il est peu sensible et nécessite une température parfaitement réglée à 0,01 °C près, et de travailler à débit constant (57).
- **Détecteur à fluorescence :** Détecteurs très sensibles et très sélectifs, mais ils sont destinés uniquement aux solutés fluorescents ou après formation post colonne de composés fluorescents (dérivatisation) (57).
- **Détection électrochimique :** Ils sont réservés aux solutés dits électroactifs (ampérométrie, coulométrie, conductimétrie...) électrode indicatrice : platine, carbone vitreux. La phase mobile contient des électrolytes pour assurer le passage du courant (57).

3.8 Enregistrement des chromatogrammes

- Enregistreur simple : Impose la mesure manuelle des pics pour l'analyse quantitative.
- Enregistreur – intégrateur: Obtention du chromatogramme suivi de l'inscription des aires des pics, automatiquement mesurées (57).

4 Domaines d'application de la HPLC

La chromatographie liquide haute performance est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques séparatives. Elle permet l'identification et la quantification des composés présents dans des mélanges variés;

Son champs d'application recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse :

- ❖ Des composés thermosensibles
- ❖ Des composés très polaires
- ❖ Des composés de masses molaires élevées.

C'est un appareil de base indispensable dans tous les laboratoires de recherches (56,61).

5 Notions fondamentales

5.1 Temps de rétention

Le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. Il correspond au temps écoulé entre l'injection et le sommet du pic. Ce temps est exprimé en minute (60).

$$t_R = \frac{d_R}{\mu_\xi} = \frac{V_R}{D} \quad \text{avec} \quad d_R : \text{distance de rétention}$$

μ_ξ : vitesse d'écoulement du papier

V_R : volume de rétention

5.2 Temps mort

Le temps mis par un soluté non retenu par la phase stationnaire (passé dans la phase mobile) (60).

$$t_m = \frac{L}{V} \quad \text{avec} \quad L : \text{longueur de la colonne}$$

V : vitesse de la phase mobile

5.3 Temps de rétention corrigé ou réduit

La différence entre le temps de rétention et le temps mort (60).

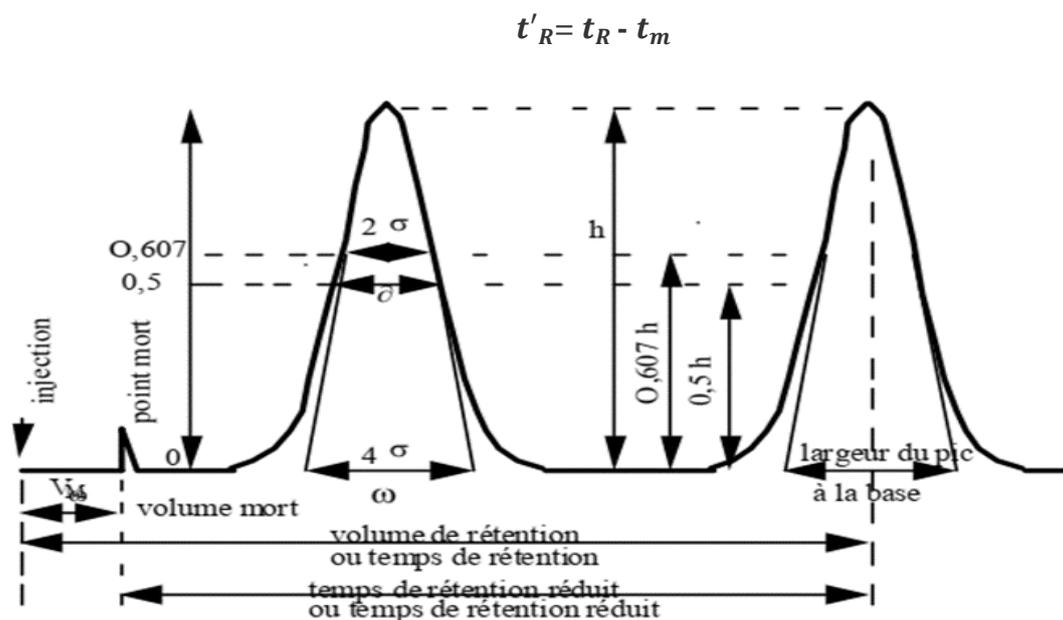


Figure : Principaux éléments d'un chromatogramme (62).

5.4 Volume de rétention ou volume d'élution

Volume de la phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Sur le chromatogramme, il correspond au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui du sommet du pic (56).

$$V_R = t_R \times D$$

6 Analyse qualitative

6.1 Notion de concentration

6.1.1 Le coefficient de partage K

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K.

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Ce coefficient est en fonction de 3 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile.
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire.
- Celle entre les phases mobiles et stationnaire (60).

6.1.2 Facteur de rétention (ou de capacité) K'

Est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile. Ce paramètre rend compte de la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir un soluté (60).

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile (60).

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

6.2 Notions d'efficacité ou performance d'une colonne

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin, plus la chromatographie est efficace.

L'efficacité s'exprime par deux grandeurs N et H

- Nombre de plateaux théoriques N : il correspond au nombre d'équilibres successifs qu'a subi un composant du mélange.

$$N = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2} = 5.54 \frac{t_r^2}{\delta^2}$$

t_r : temps de rétention

δ : Largeur du pic à mi-hauteur

ω : Largeur des pics à la base

Plus grand est le nombre de plateaux, meilleure sera la séparation, plus fins seront les pics donc la colonne est efficace.

N est caractéristique d'un système chromatographique (colonne + solvants + composés à séparer).

Remarque :

Si l'on tient compte des temps morts, on définit le nombre de plateaux efficaces (= nombre de plateaux théoriques effectifs Neff) : puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N' = 16 \left[\frac{t_r - t_m}{\omega} \right]^2 = 5.54 \left[\frac{t_r - t_m}{\delta} \right]^2$$

Expérimentalement t_r est difficile à déterminer d'où l'utilisation de N (60).

- La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT ou H qui est :

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

L : longueur de la colonne

N : Nombre de plateaux théoriques (60).

6.3 Qualité de la séparation

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits. Plusieurs critères en chromatographie permettent d'évaluer la qualité d'une séparation (55) :

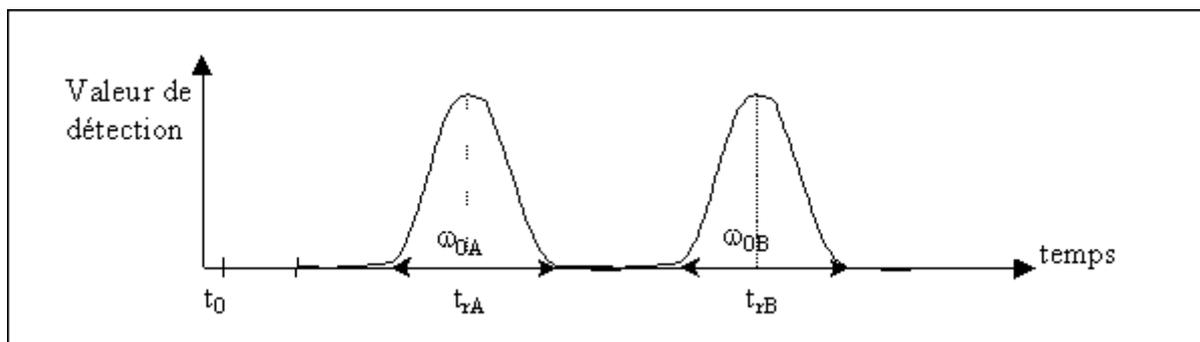


Figure : Chromatogramme montrant la qualité de la séparation chromatographique (55).

6.3.1 Sélectivité α

Est défini comme le rapport des temps de rétention réduits.

Pour préciser la position relative de 2 pics adjacents A et B sur un chromatogramme on exprime le facteur de séparation (ou de sélectivité) α selon :

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

Il ne permet pas de savoir à lui seul si la séparation est réellement possible, mais plus α est élevé plus la séparation est facile.

En pratique α toujours ≥ 1 car on choisit $t'_{rB} > t'_{rA}$

$\alpha = 1$ pas de séparation.

$\alpha > 1$ séparation plus facile que α augmente (60).

6.3.2 Facteur de résolution R_s

La résolution correspond à une grandeur numérique caractérisant l'aptitude du système chromatographique à séparer 2 composés d'un mélange. On peut y accéder à partir du chromatogramme.

Le facteur de résolution est calculé selon la formule suivante :

$$R_S = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

t_r : temps de rétention de chaque pic.

ω : Largeur des pics à la base.

La séparation entre 2 pics est d'autant meilleure que R_S est plus grand.

$R_S \leq 0.8$: séparation insuffisante

$R_S \leq 1$: chevauchement des pics

$R_S = 1$: 2 pour cent de chevauchement des pics.

$R_S \geq 1.5$: bonne séparation.

On peut améliorer la résolution en jouant soit sur la sélectivité α , soit sur le facteur de capacité K' , soit sur le nombre de plateaux théoriques N (50,60).

7 Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnel à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

Dans la pratique on injecte les composés en solution et on préfère utiliser les concentrations plutôt que les masses. Il y a proportionnalité entre la masse injectée et la concentration du soluté, à condition de toujours injecter le même volume de solution.

On écrira donc : $A = K_c \times C$

A = aire du pic.

K_c = coefficient de réponse du détecteur.

C = concentration du composé injecté (63).

On distingue deux méthodes de quantification de concentration :

- **Étalonnage externe** : cette méthode consiste sur la comparaison de deux chromatogrammes (étalonnage et analyse) effectués successivement dans des conditions chromatographiques identiques pour maintenir le coefficient de réponse constant.

Elle permet de calculer la teneur d'un ou plusieurs constituants apparaissant séparés sur le chromatogramme.

- **Étalonnage interne** : elle consiste sur la comparaison des aires de pics des produits à analyser avec l'aire de pic de l'étalon interne introduit à une concentration connue dans l'échantillon à doser et dans la solution de référence. Elle repose sur l'utilisation du coefficient de réponse relatif de chaque composé à doser vis-à-vis d'un marqueur introduit comme référence.

Elle permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés (56).

TABLE DE STUDENT

Test t de student

Si les pentes sur standard et sur la forme reconstituée sont comparables, leur différence ne doit pas être différente de zéro.

Ceci revient donc à comparer une valeur observée ($\alpha_1 - \alpha_2$) à une valeur théorique (zéro) connaissant l'erreur totale (l'écart type) faite sur a_1 et a_2 .

$$t_{calculé} = \frac{a_1 - a_2}{\sqrt{\sigma_{a_1}^2 + \sigma_{a_2}^2}}$$

Le $t_{calculé}$ est comparé à la valeur $t^\circ (\alpha ; n_1 + n_2 - 4)$ lue sur la table de Student.

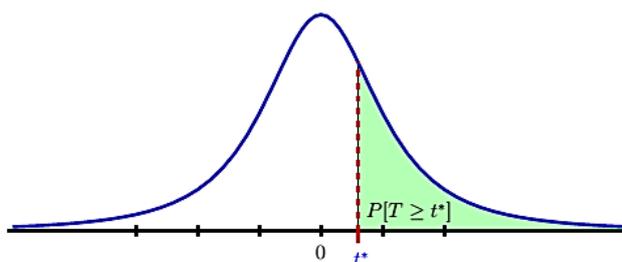
Si $t_{calculé} < t^\circ$: les pentes sont comparables donc absence d'effet matrice, la méthode est spécifique.

Avec:

- $a_1 - a_2$: Pentes respectives des droites de régression D1 (obtenue à partir de la gamme standard) et D2 (obtenue à partir de la gamme placebo chargé).
- $\sigma_{a_1}^2 + \sigma_{a_2}^2$: Variances respectives des pentes α_1 et α_2 .
- α : risque d'erreur accepté (5%).
- n_1 et n_2 : Nombre d'échantillon réalisé pour la forme standard et la forme placebo chargé.
- $n_1 + n_2 - 4$: Degré de liberté (ddl).

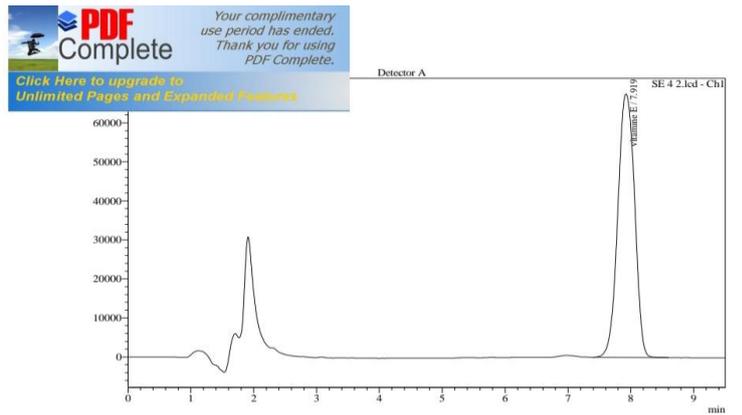
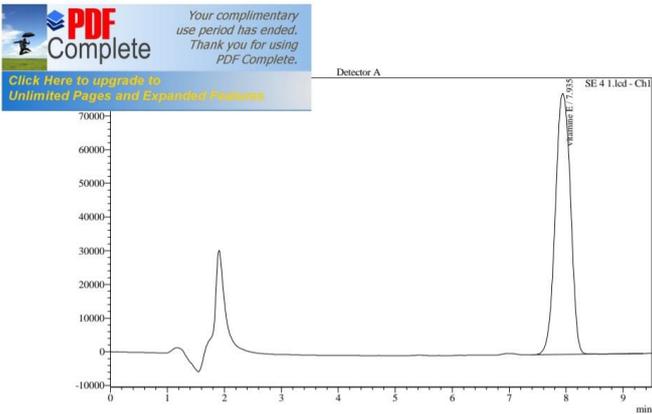
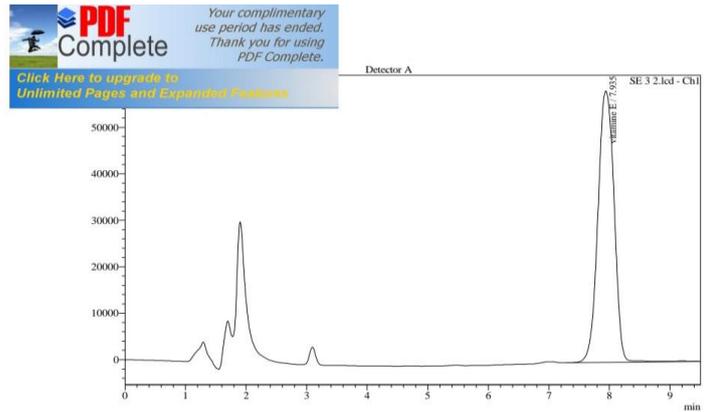
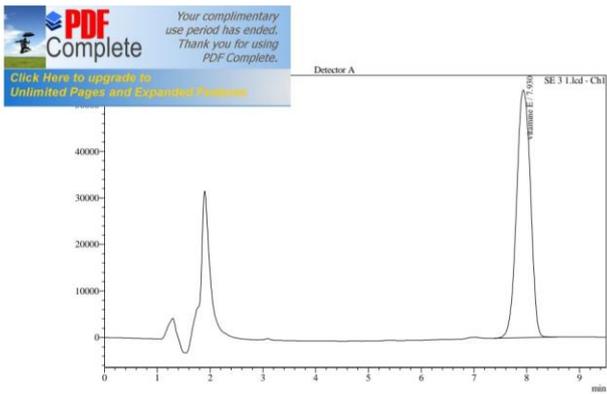
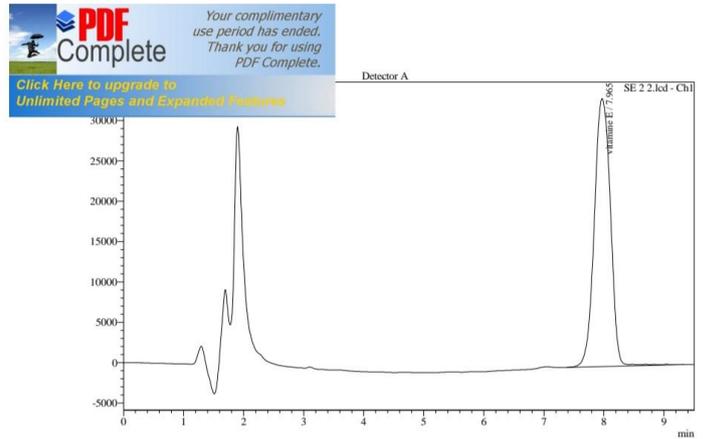
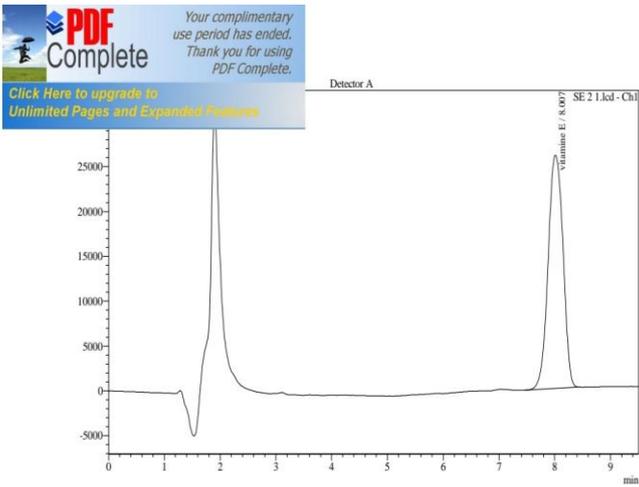
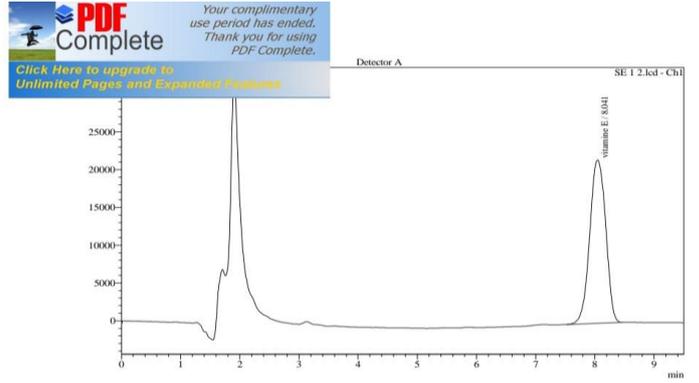
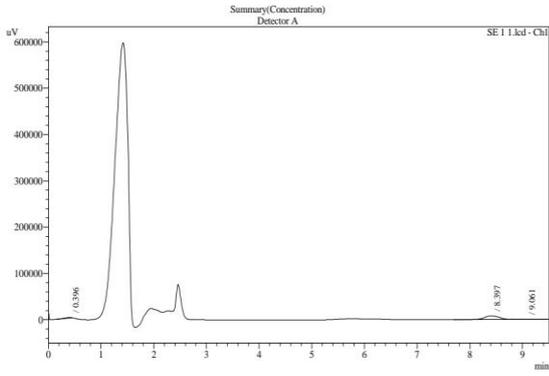
Tableau T

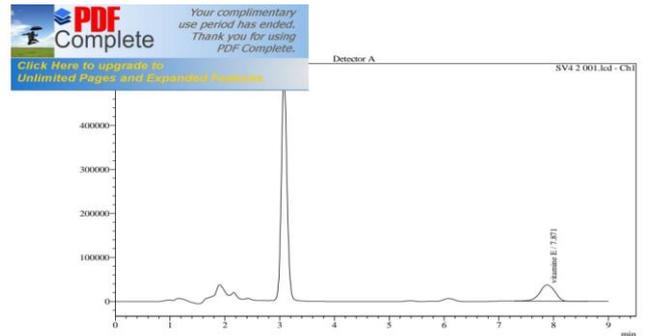
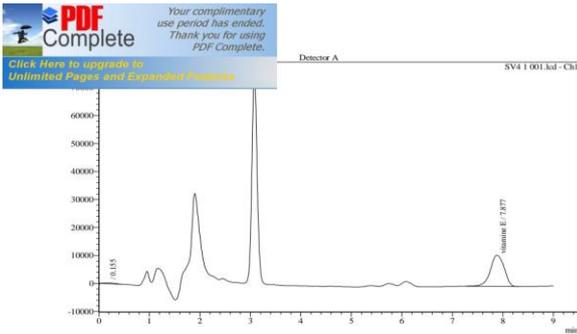
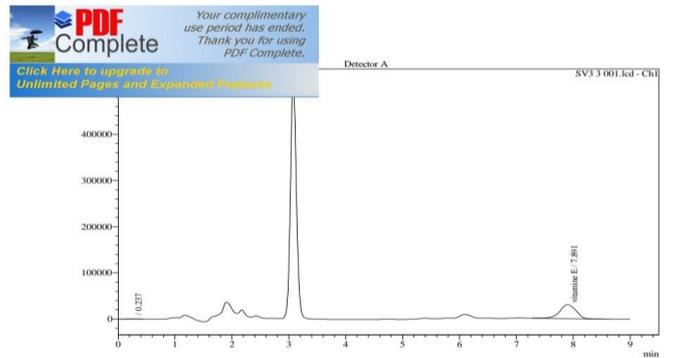
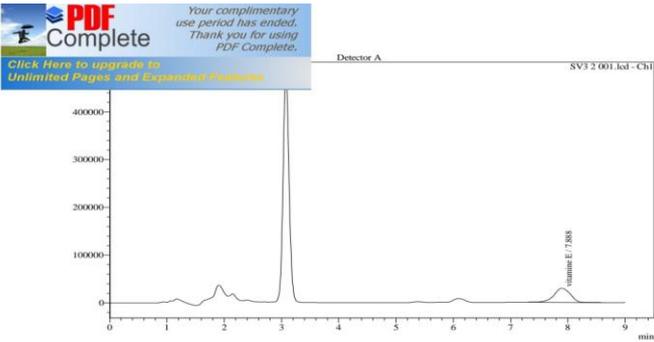
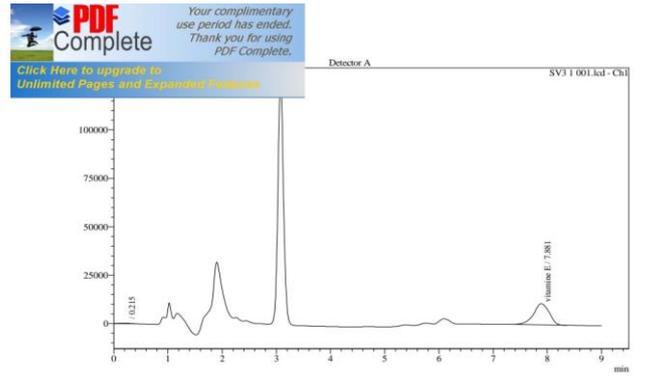
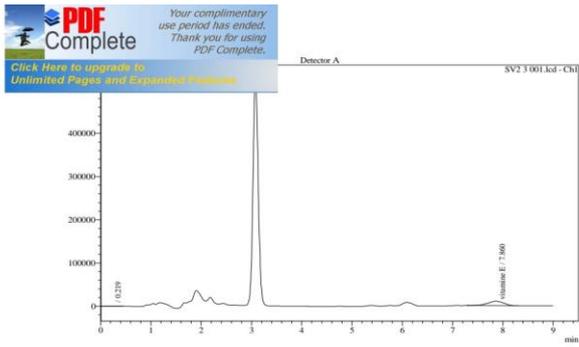
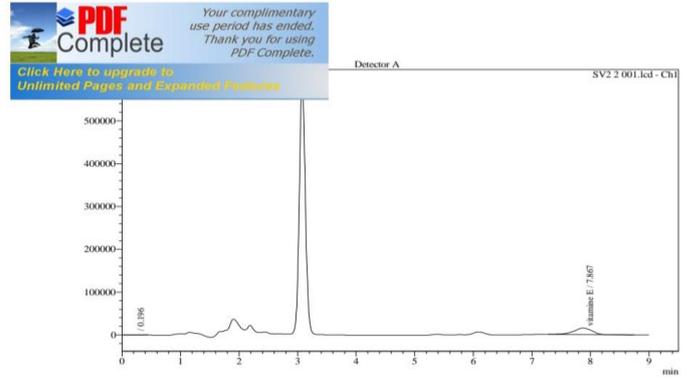
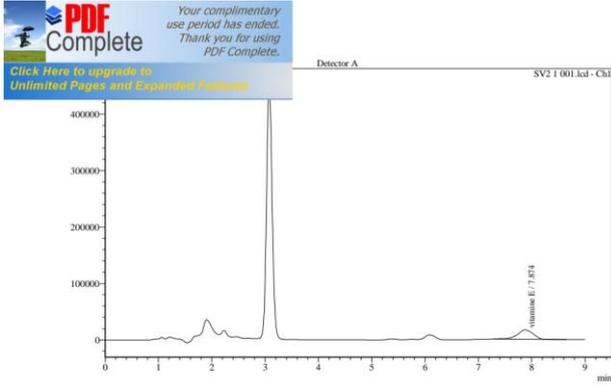
Tableau de t^* tel qu'une variable de Student à dl degrés de liberté ait probabilité p d'être supérieure à t^*



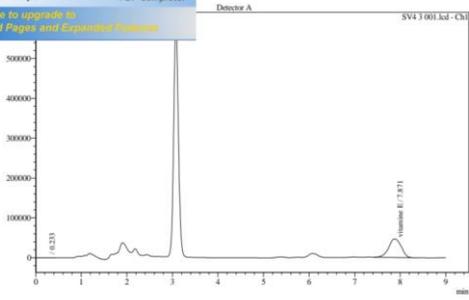
dl	$P[T \geq t^*] = p$											
	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	15.89	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	.8165	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	4.849	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	.7649	.9785	1.250	1.638	2.353	3.182	3.482	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	.7407	.9410	1.190	1.533	2.132	2.776	2.999	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	.7267	.9195	1.156	1.476	2.015	2.571	2.757	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	.7176	.9057	1.134	1.440	1.943	2.447	2.612	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	.7111	.8960	1.119	1.415	1.895	2.365	2.517	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	.7064	.8889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.449	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	.7027	.8834	1.100	1.383	1.833	2.262	2.398	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	.6998	.8791	1.093	1.372	1.812	2.228	2.359	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	.6974	.8755	1.088	1.363	1.796	2.201	2.328	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	.6955	.8726	1.083	1.356	1.782	2.179	2.303	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	.6938	.8702	1.079	1.350	1.771	2.160	2.282	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	.6924	.8681	1.076	1.345	1.761	2.145	2.264	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	.6912	.8662	1.074	1.341	1.753	2.131	2.249	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	.6901	.8647	1.071	1.337	1.746	2.120	2.235	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	.6892	.8633	1.069	1.333	1.740	2.110	2.224	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	.6884	.8620	1.067	1.330	1.734	2.101	2.214	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	.6876	.8610	1.066	1.328	1.729	2.093	2.205	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	.6870	.8600	1.064	1.325	1.725	2.086	2.197	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	.6864	.8591	1.063	1.323	1.721	2.080	2.189	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	.6858	.8583	1.061	1.321	1.717	2.074	2.183	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	.6853	.8575	1.060	1.319	1.714	2.069	2.177	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	.6848	.8569	1.059	1.318	1.711	2.064	2.172	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	.6844	.8562	1.058	1.316	1.708	2.060	2.167	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	.6840	.8557	1.058	1.315	1.706	2.056	2.162	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	.6837	.8551	1.057	1.314	1.703	2.052	2.158	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	.6834	.8546	1.056	1.313	1.701	2.048	2.154	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	.6830	.8542	1.055	1.311	1.699	2.045	2.150	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	.6828	.8538	1.055	1.310	1.697	2.042	2.147	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	.6807	.8507	1.050	1.303	1.684	2.021	2.123	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
50	.6794	.8489	1.047	1.299	1.676	2.009	2.109	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
60	.6786	.8477	1.045	1.296	1.671	2.000	2.099	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	.6776	.8461	1.043	1.292	1.664	1.990	2.088	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	.6770	.8452	1.042	1.290	1.660	1.984	2.081	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
1000	.6747	.8420	1.037	1.282	1.646	1.962	2.056	2.330	2.581	2.813	3.098	3.300
z^*	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.054	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291
	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005

CHROMATOGRAMMES

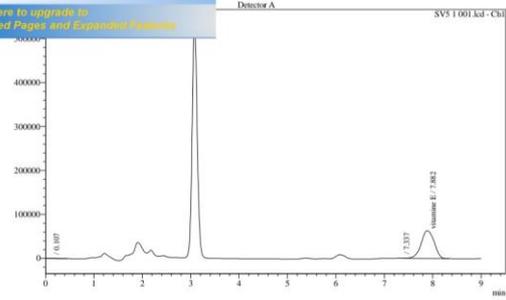




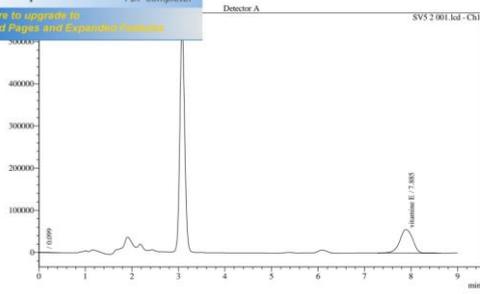
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



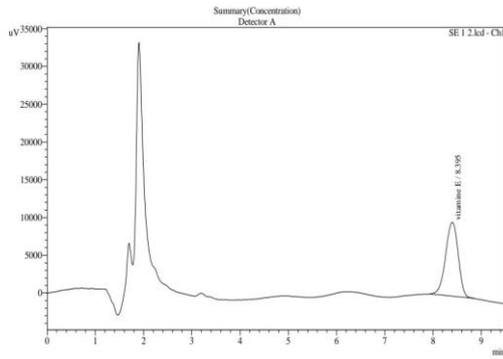
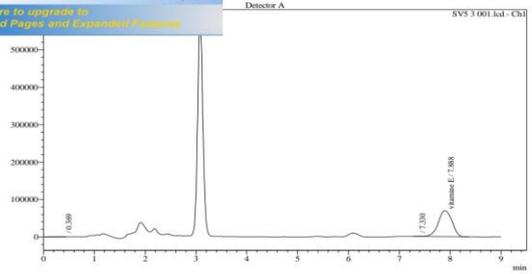
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



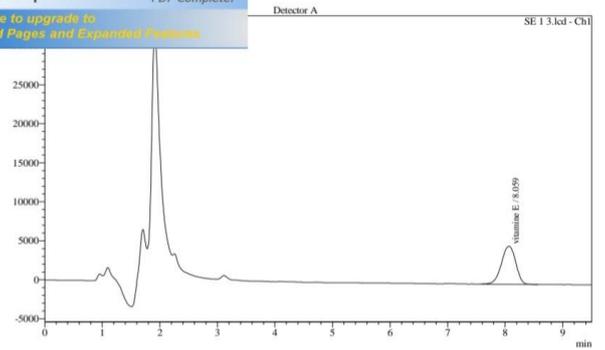
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



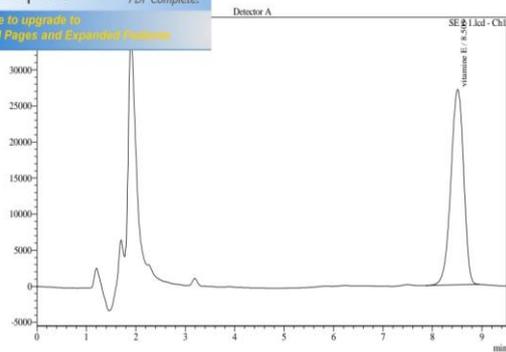
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



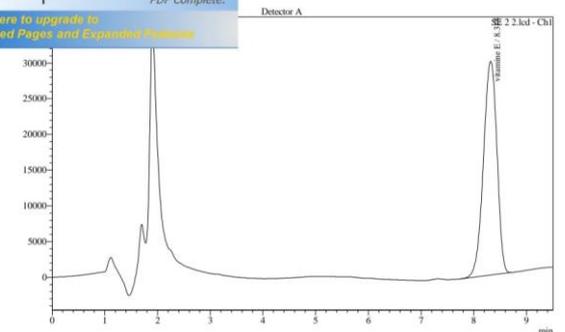
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



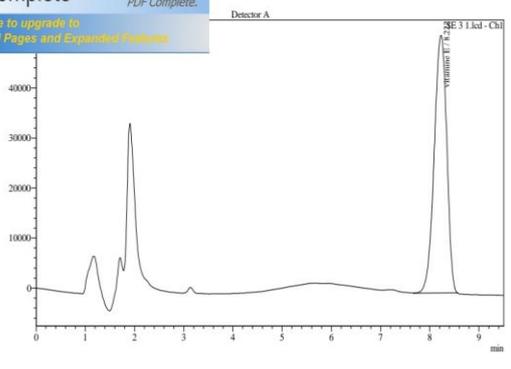
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



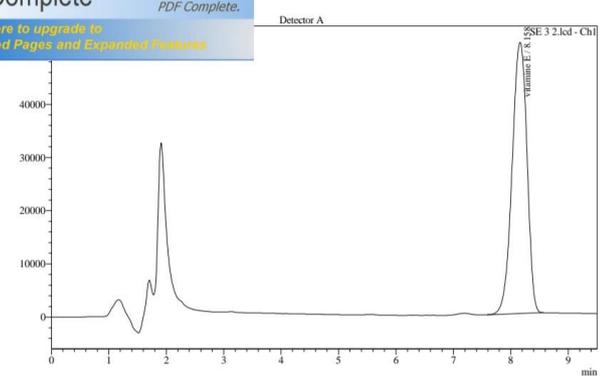
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



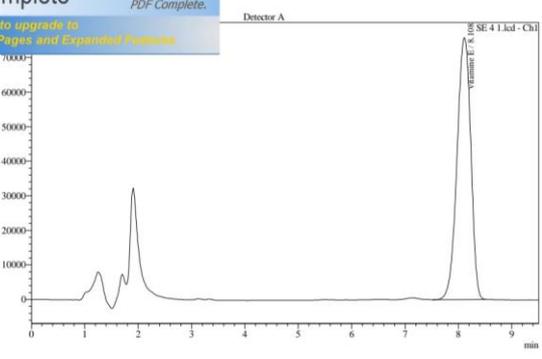
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



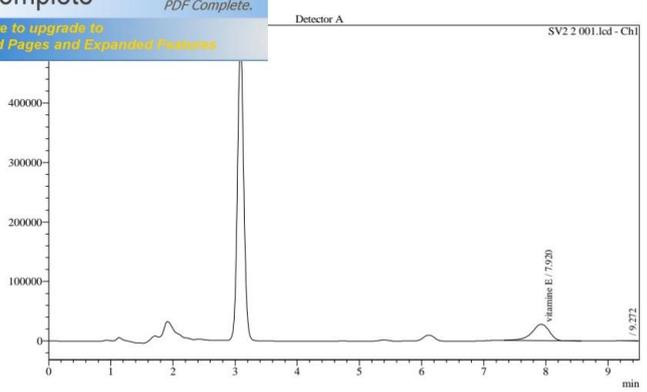
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



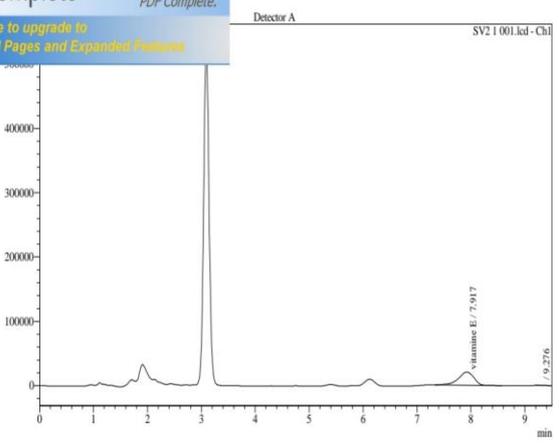
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



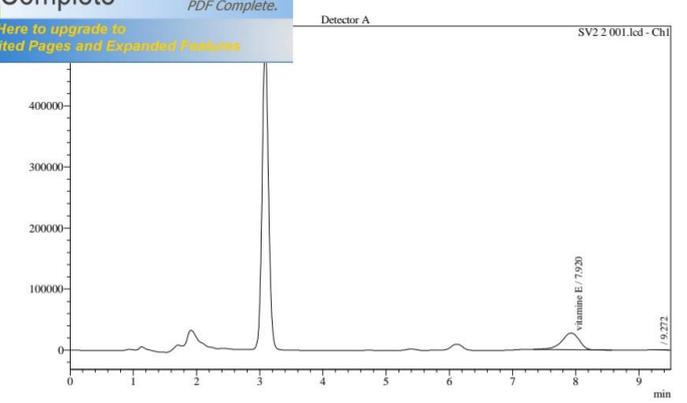
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



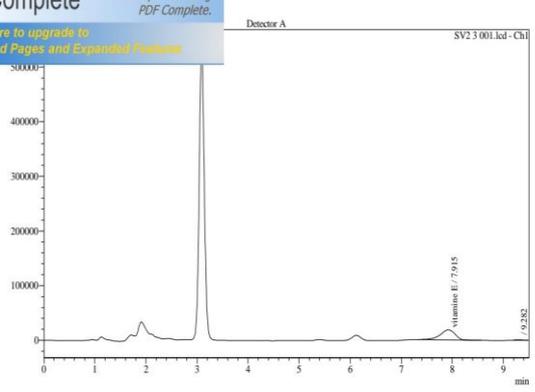
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



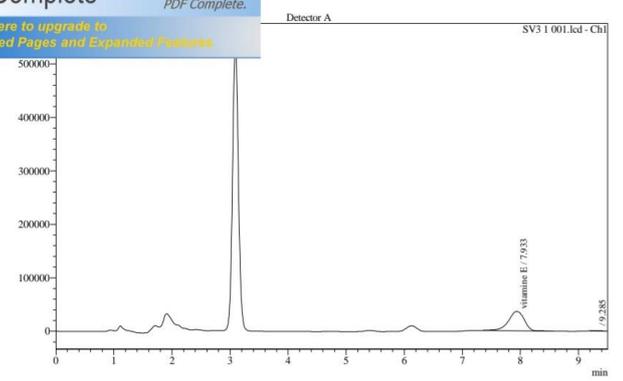
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



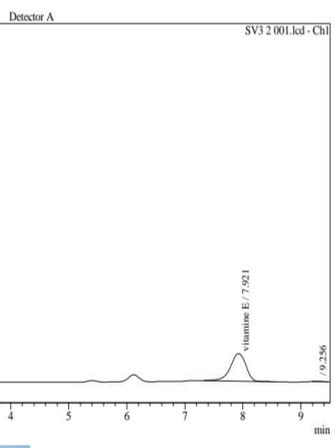
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



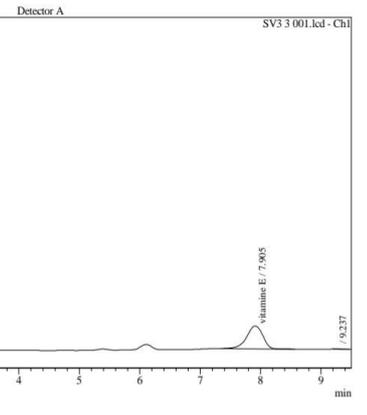
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



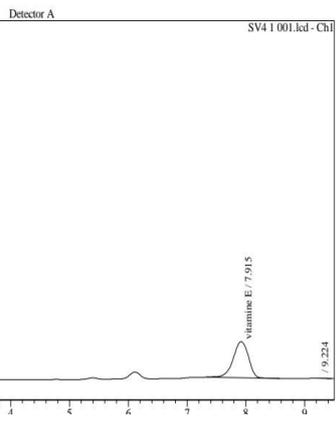
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



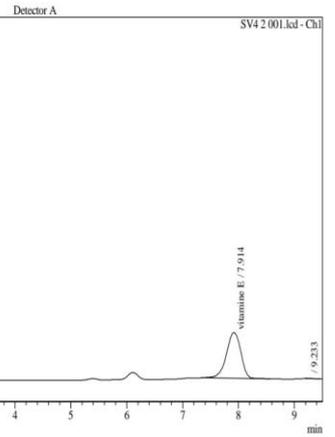
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



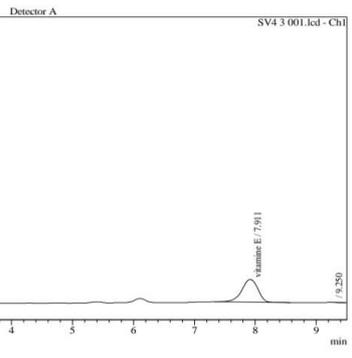
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



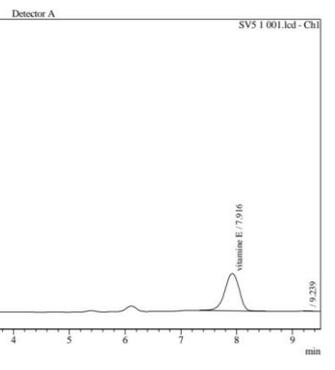
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



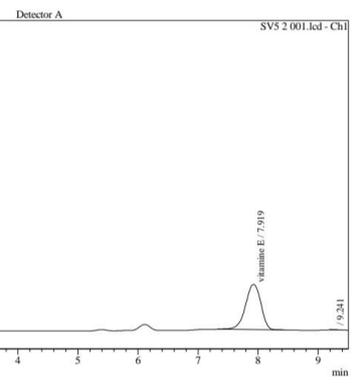
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



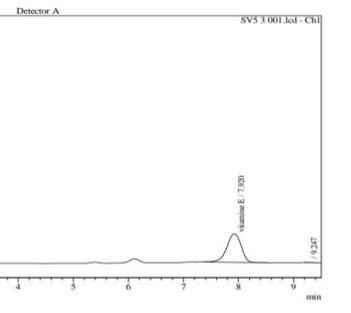
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

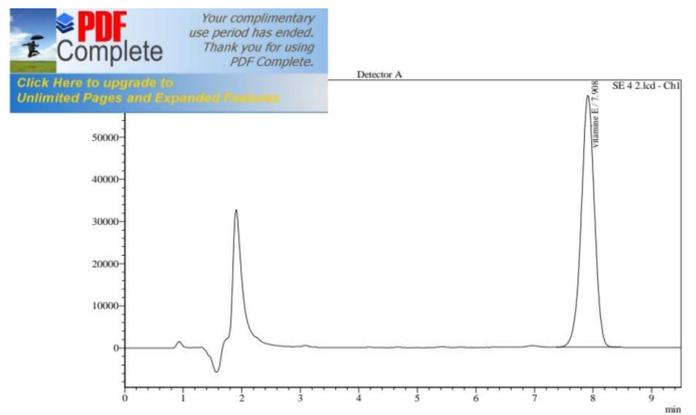
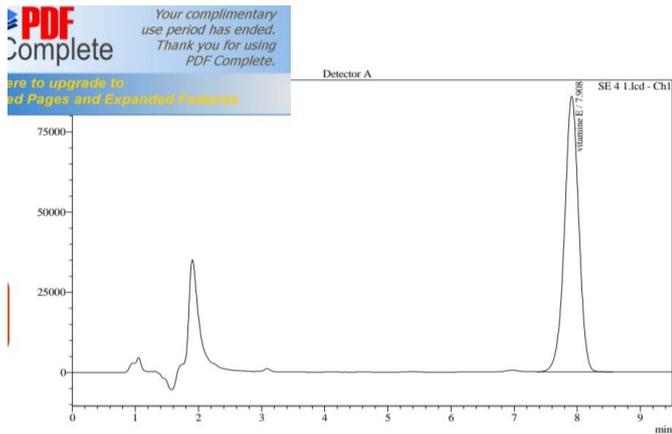
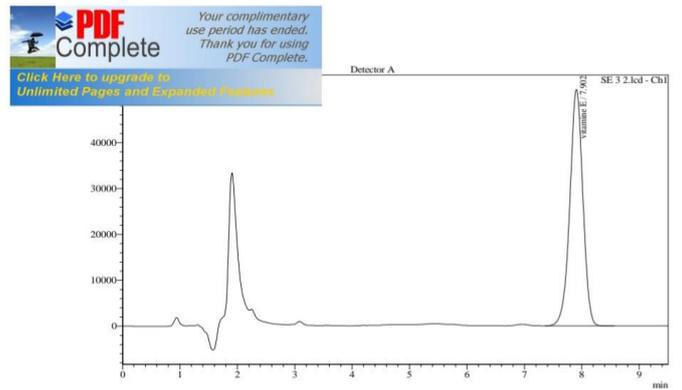
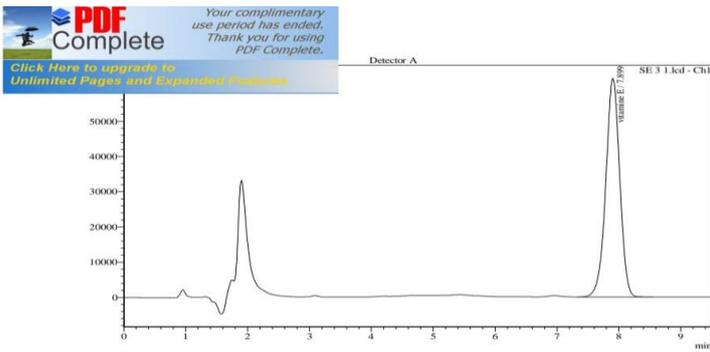
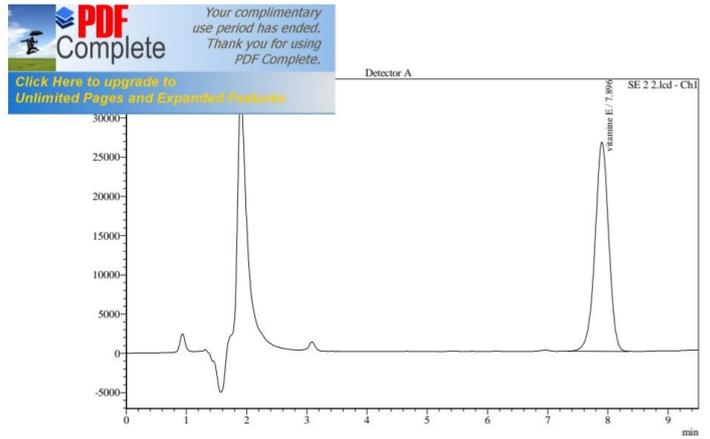
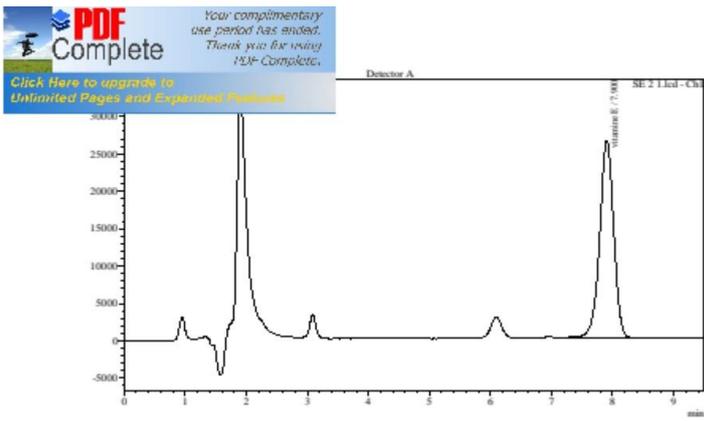
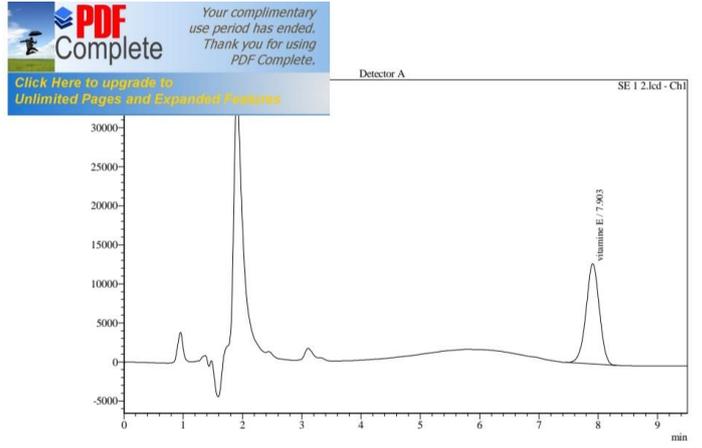
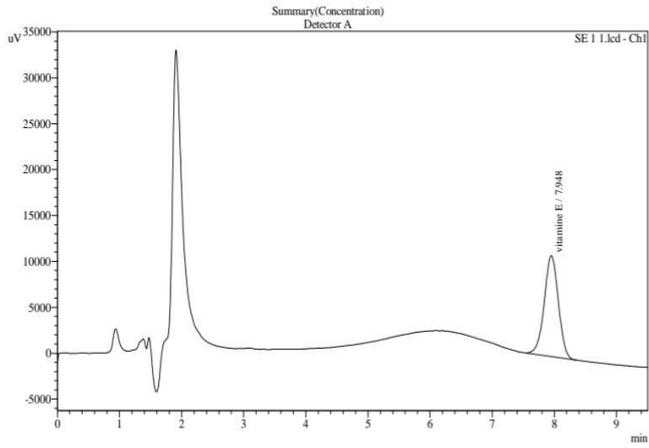


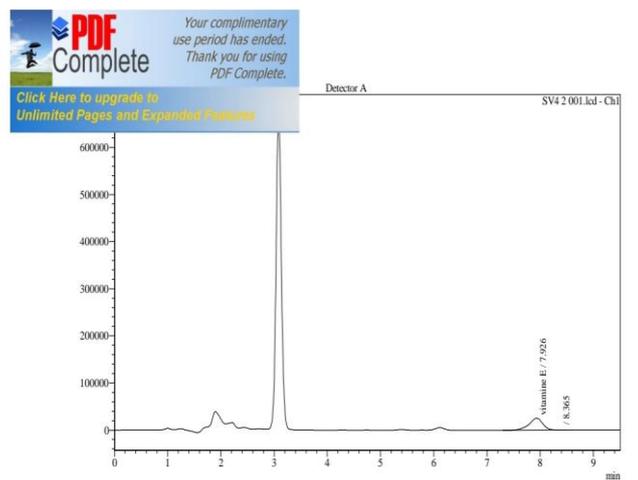
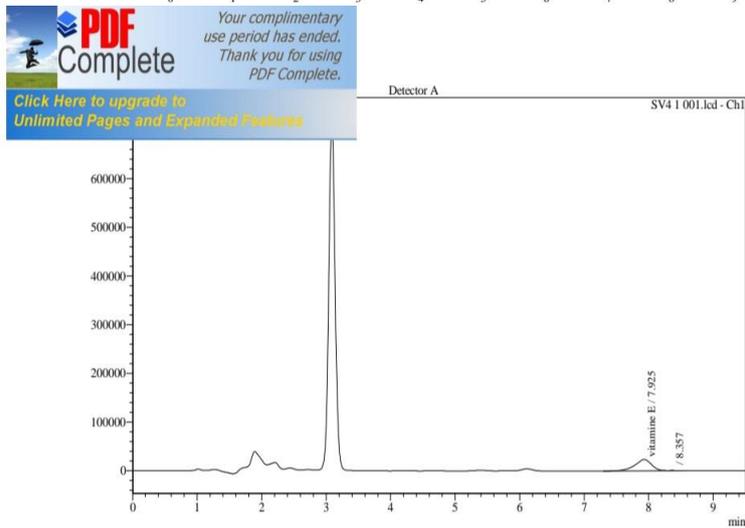
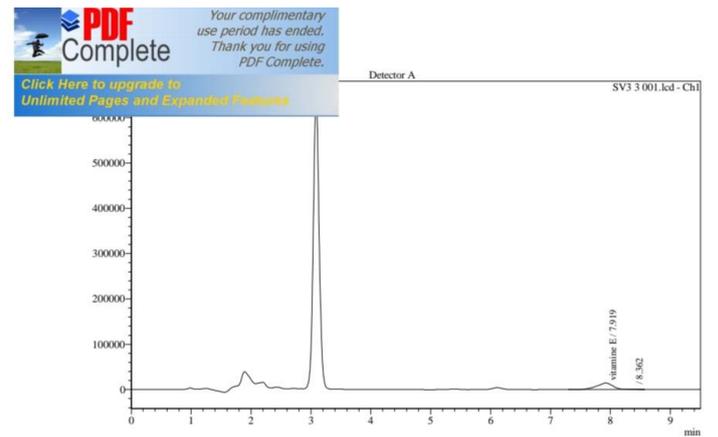
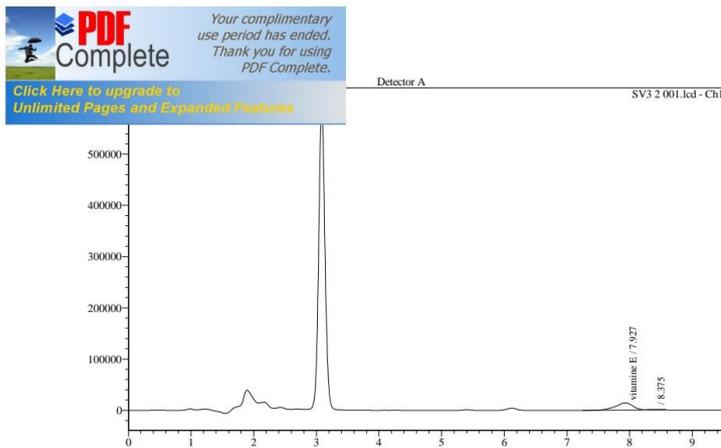
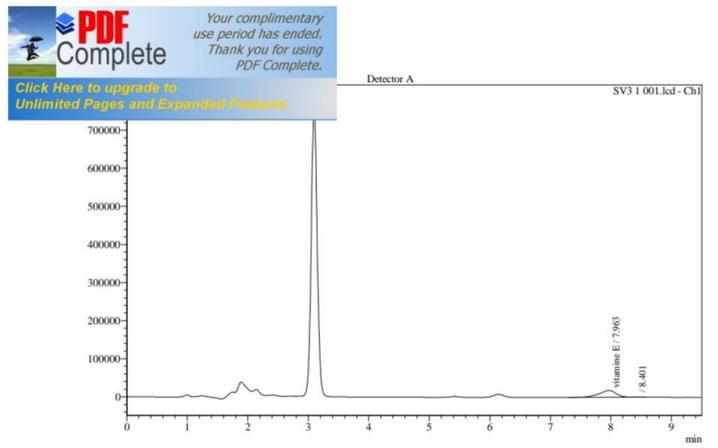
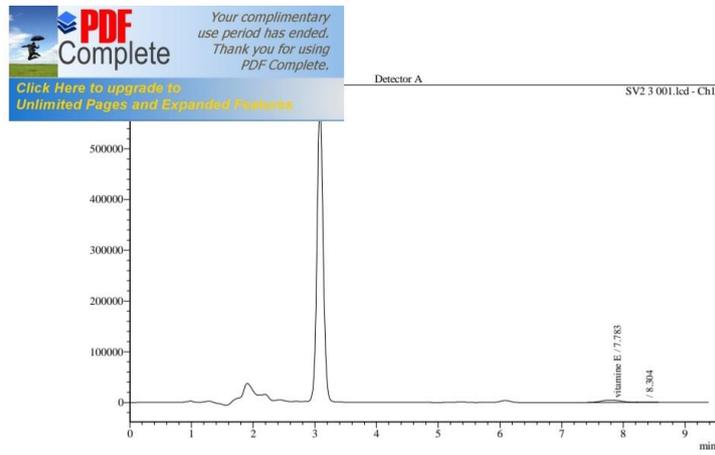
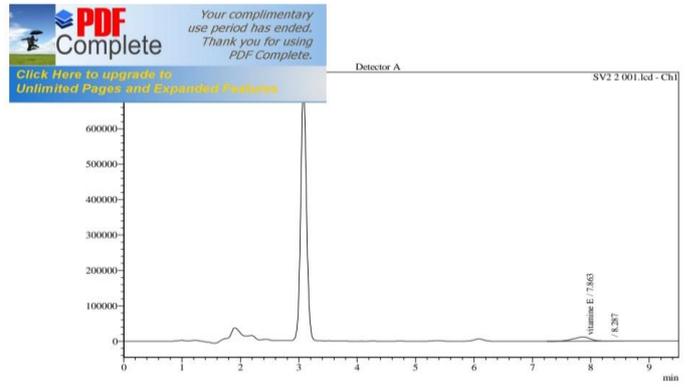
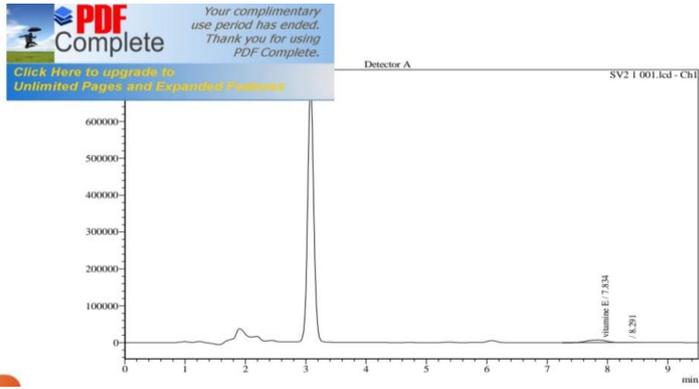
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



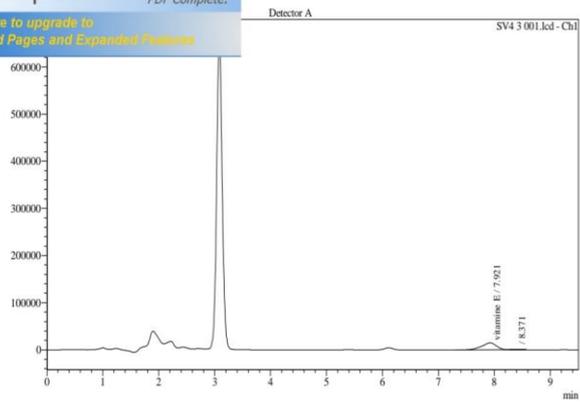
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



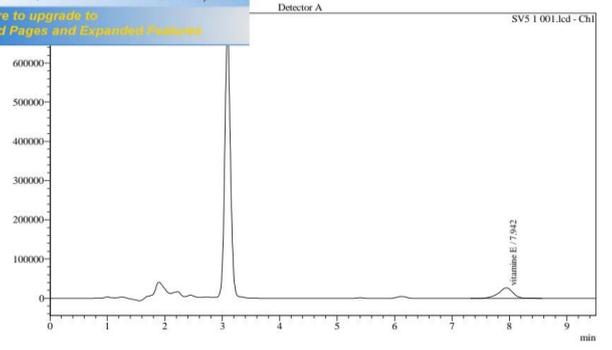




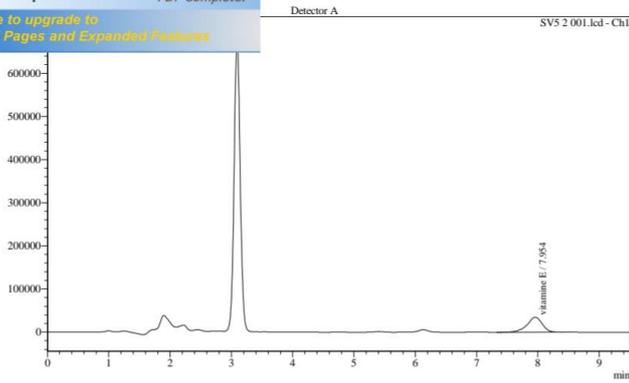
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



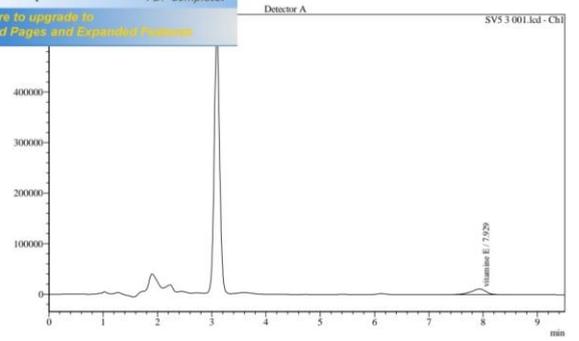
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



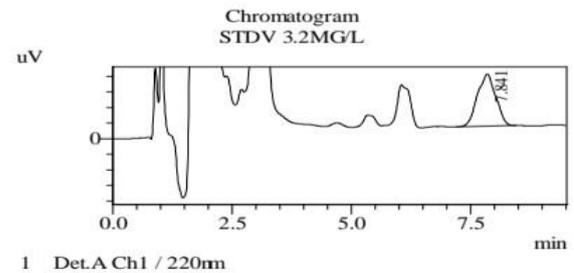
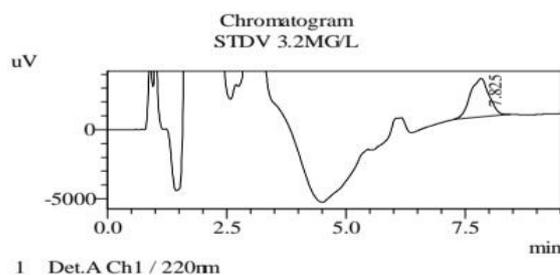
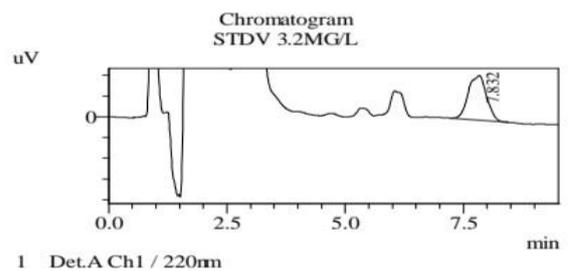
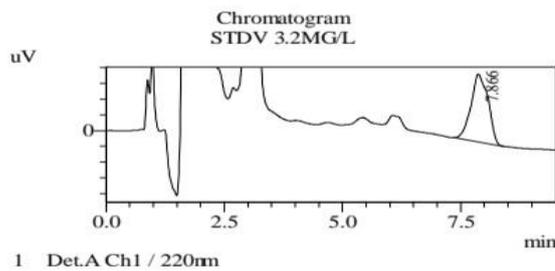
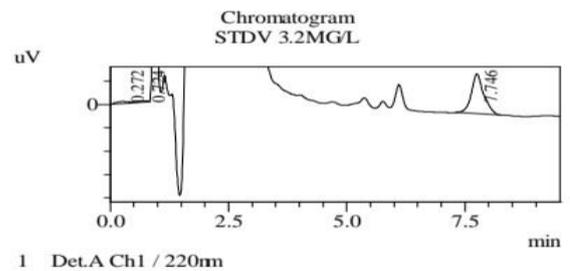
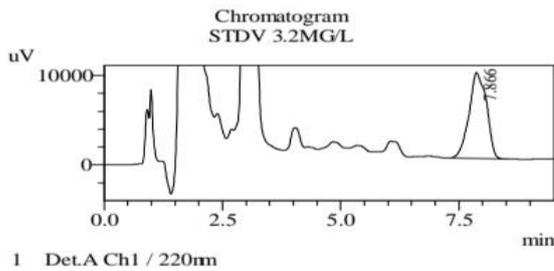
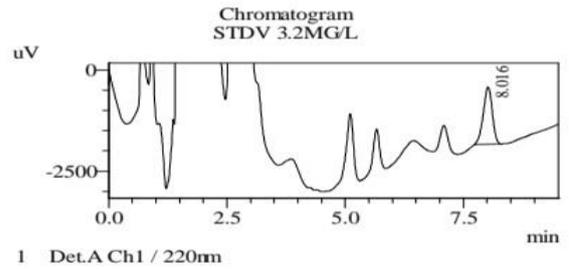
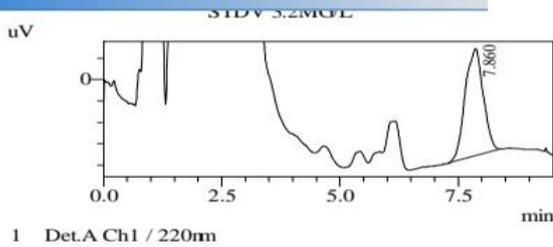
PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

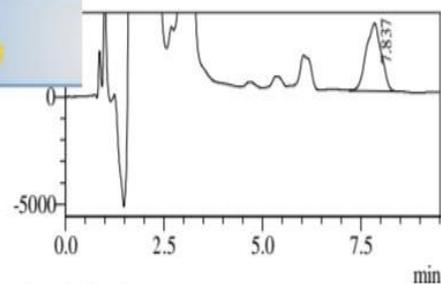


 **PDF Complete**
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Chromatogram
STDV 3.2MG/L

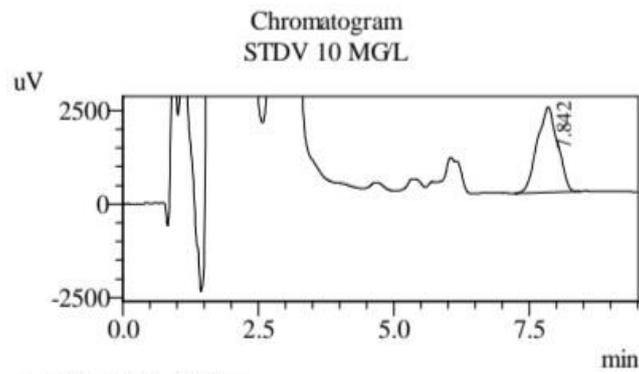
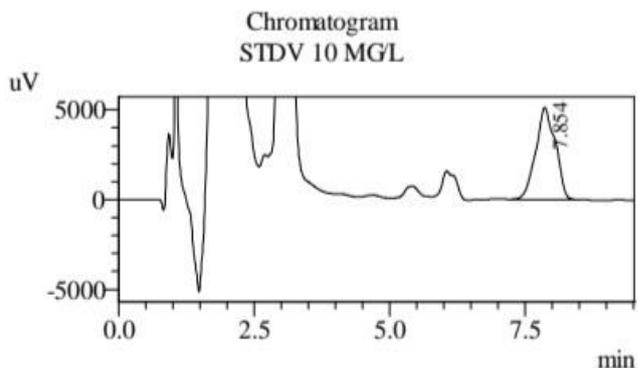
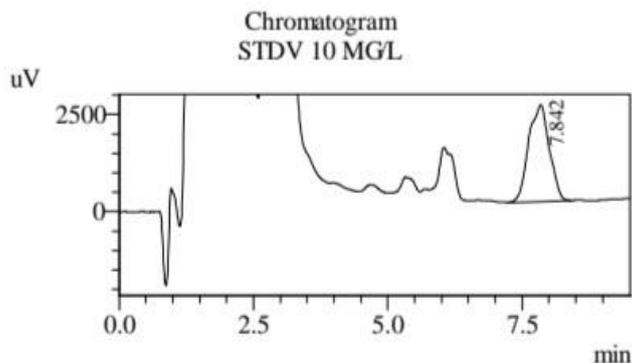
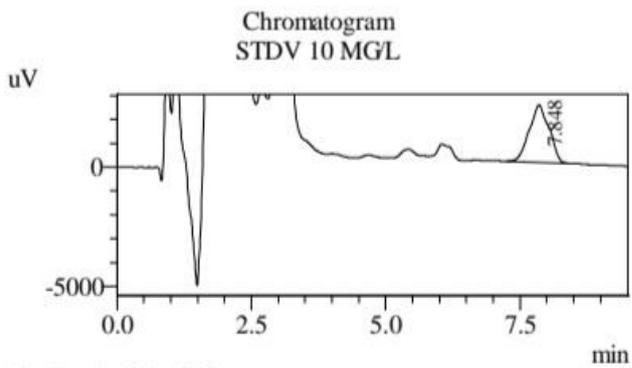
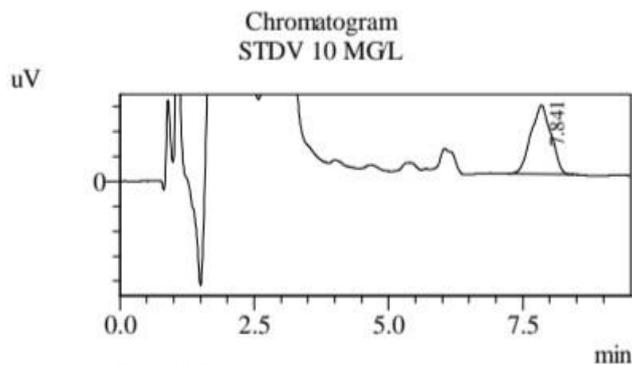
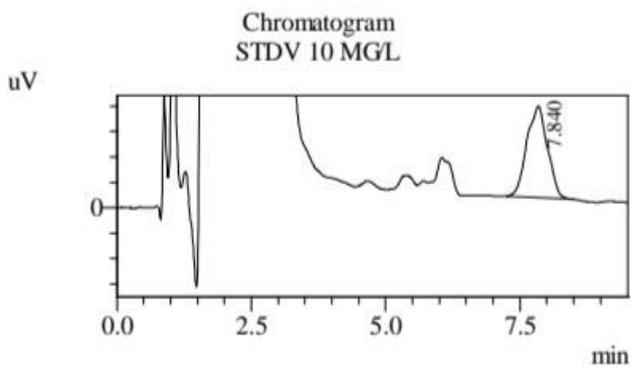
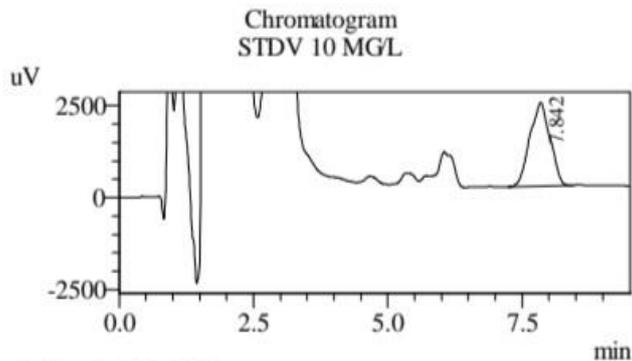
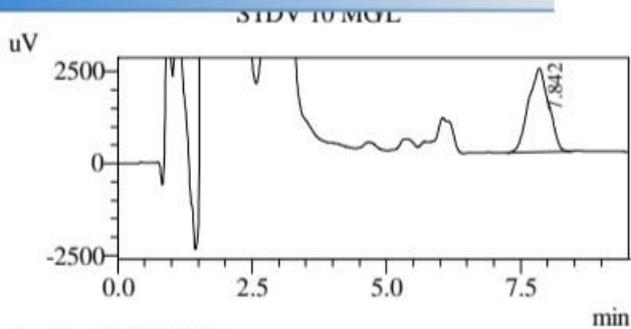
 **PDF Complete**
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



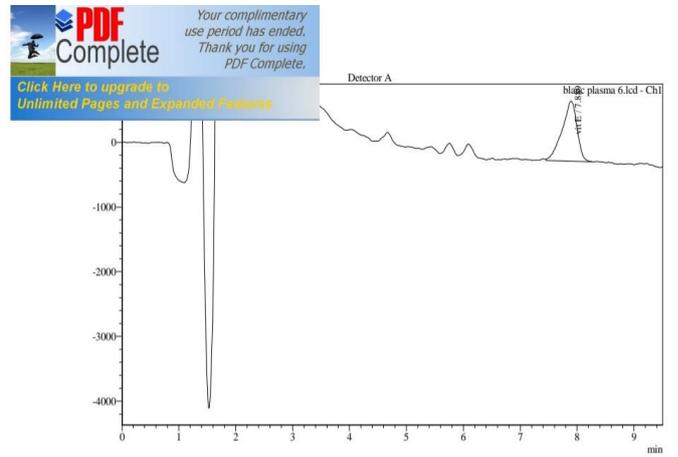
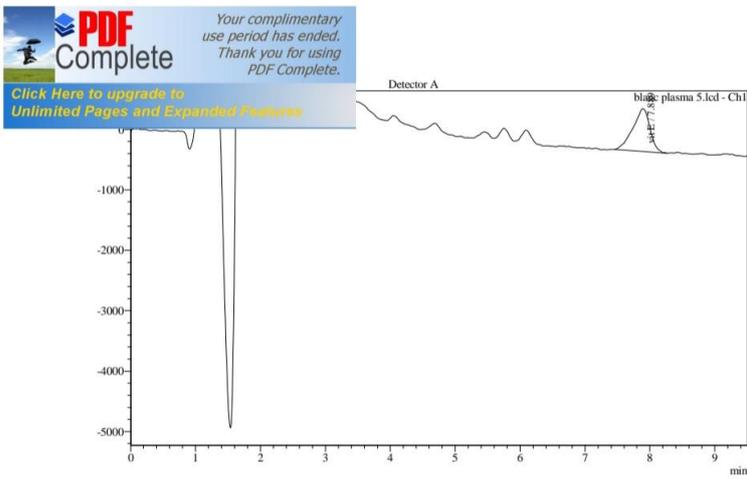
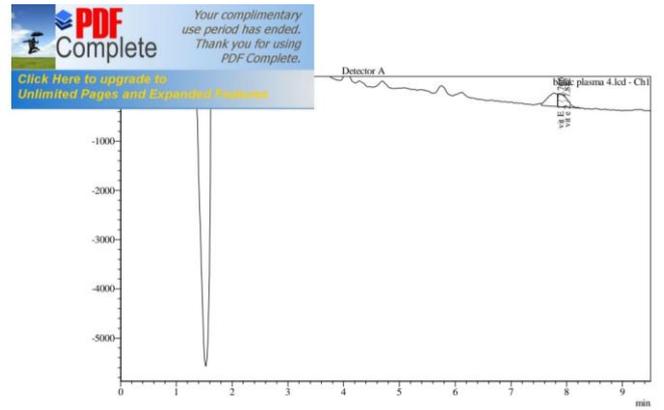
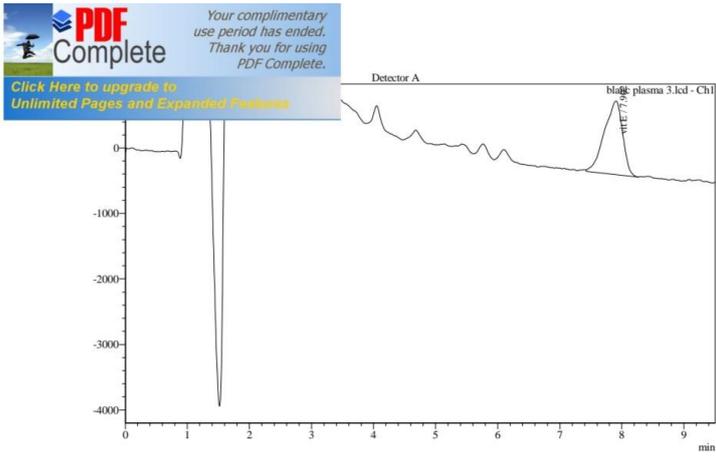
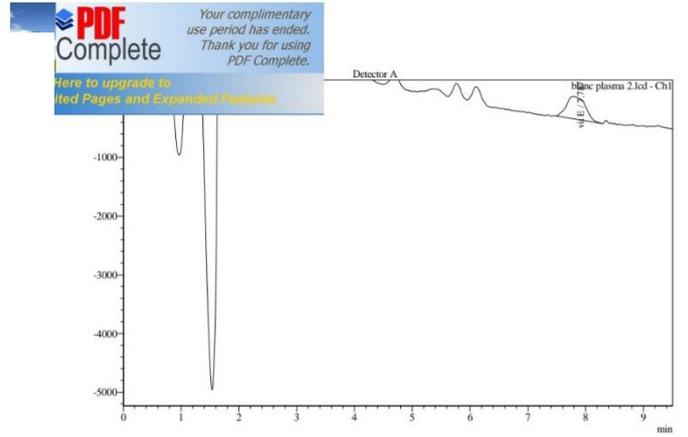
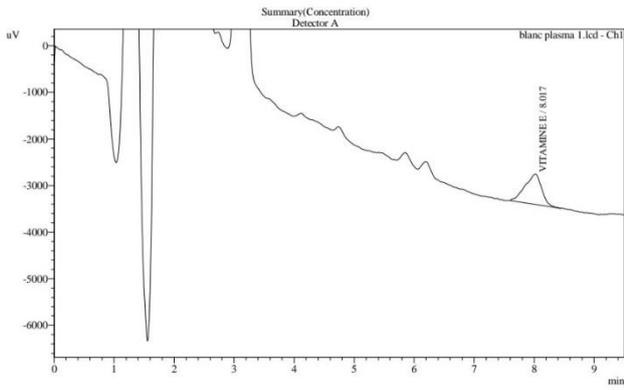


Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Chromatogram
STDV 10 MGL



Résumé

Ce travail expérimental a été concrétisé au sein du Laboratoire de biochimie et de Chimie Analytique de l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Il s'agit d'une mise au point et la validation d'une nouvelle méthode de dosage de la vitamine E dans le plasma humain, par chromatographie liquide à haute performance, couplée à un détecteur UV, en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision de validation avec cinq niveau de concentrations (3.2 ; 10 ; 20 ; 40 et 60 mg/l), en se référant au guide élaboré par la commission SFSTP publié en 2006.

La technique du dosage, s'est reposée sur une simple extraction de la vitamine E dans le n-hexane, suivie d'une évaporation sous vide, ensuite analysée par R-HPLC-UV (C18, 15 cm, longueur d'onde $\lambda=220$ nm, débit 1,2ml/min).

La méthode a été jugée spécifique, juste avec un biais relatif $< 15\%$, et fidèle avec un CV de répétabilité $< 5\%$ donc valide sur l'intervalle de dosage **[6,61 ; 60] mg/L** ; sur la base de la vraie semblance et la cohérence de l'ensemble des résultats conquis tout au long de la démarche. Cela affirme que cette méthode pourrait être standardisée et devenir un moyen de dosage en routine ; dans l'intérêt de diagnostiquer des éventuelles perturbations dans les taux plasmatiques de la vitamine E.

Mots clés : validation, vitamine E, R -HPLC, SFSTP, intervalle de dosage, CV, biais relatif, profil d'exactitude, extraction.

Abstract

This experimental work was carried out in the Laboratory of Biochemistry and Analytical Chemistry of the University of Mouloud Mammeri of Tizi Ouzou. It is a question of the development and validation of a new method of determination of vitamin E in human plasma, by liquid high performance chromatography, coupled to a UV detector, using the accuracy profile with five concentration levels (3.2 ; 10 ; 20 ; 40 and 60 mg/l), as a tool for validation decision, by referring to the guide elaborated by the SFSTP commission published in 2006.

The assay technique, relied on a simple extraction of vitamin E in n-hexane, followed by vacuum evaporation, then analysed by R-HPLC-UV (C18, 15 cm, wavelength $\lambda=220$ nm, flow rate 1.2ml/min).

The method was judged to be specific, fair with a relative bias of $< 15\%$, and accurate with a repeatability CV of $< 5\%$ and therefore valid over the assay range **[6,61 ; 60] mg/L**; based on the consistency and coherence of the results obtained throughout the process. This asserts that this method could be standardised and become a routine means of determination; in the interest of diagnosing possible disturbances in plasma vitamin E levels.

Key words: validation, vitamin E, R-HPLC, SFSTP, CV, relative biais, dosing range, accuracy profil, extraction.