

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE DE
TIZI OUZOU
Département de Pharmacie



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

قسم الصيدلة

ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵉⵎⵎⴰⵔⵉⵏ ⵏ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵣⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵣⴻⵔⴰⵏⵜ

N° D'ORDRE :

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Présenté et soutenu publiquement

Le 11 JUILLET 2018

Thème :

**Optimisation et validation d'une méthode
de dosage de la tyrosine dans le sérum par
HPLC**

Réalisé par :

HADJLOUM Nassima
SAHRAOUI Loubna
ZEMOURENE Meriem

Encadrées par :

Promoteur: Dr BEN SI SAID Hassan
Co- Promotrice: Dr BELKAID Nawel

Membres du jury :

Dr. DAHMANI D	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Présidente de jury
Pr. MAMOU M	MCB	Faculté de Médecine	UMMTO	Examineur
Dr. BOUREGHDA R	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examineur
Dr. BEN SI SAID H	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Promoteur
Dr. BELKAID N	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Co-promotrice

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2017/2018



DEDICACES

Dédicaces

A cœur vaillant rien d'impossible

A conscience tranquille tout est accessible

Je dédie ce mémoire de fin d'études

À ma très chère maman et au meilleur des pères

Qu'ils trouvent en moi la source de leur fierté

Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous vos innombrables sacrifices et votre confiance que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous préserver et vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mes chères et adorables sœurs

Imane, Yasmine, Samra, Faiza, Amina, Salima et ma petite princesse Douaa

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

À mon très cher fiancé

Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

À mes chers petits neveux et nièces

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.

Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

*A mes deux chères collègues **Meriem** et **Loubna** avec qui j'ai partagé ce modeste travail*

Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A tous les membres de ma famille, petits et grands et à tous ceux qui me sont chers

Nassima

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents qui m'ont guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère qui a été à mes côtés et m'a soutenue durant toute ma vie, et mon père qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis, merci infiniment mes parents.

A ma chère sœur Nafissa.

A mes chers frères Abderrazak et Younes.

A toute ma famille.

A mes deux binômes Loubna et Nassima.

A toutes mes amies.

A toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce travail.

Meriem

Dédicaces

C'est avec un grand amour et une profonde gratitude que je dédie ce modeste travail

Au couple qui m'a mis au monde « Sahraoui Lounes et Chelmoun Baya »

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout ce que je ressens pour vous.

Je vous remercie pour votre amour, votre soutien exemplaire, votre confiance sans faille et tout ce que vous avez pu m'apporter pour franchir les obstacles les plus difficiles. Que Dieu le tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie.

A mes chers frères et sœurs « Zineddine, Ahmed, Amina et Nihed »

Que Dieu puisse exaucer tous vos rêves.

A ma petite nièce Lina

Je t'aime énormément.

A mon grand-père maternel

Que Dieu le tout puissant te protège et te procure santé et longue vie.

A mon défunt grand-père paternel

J'aurai aimé que tu sois présent pour voir ce que je suis devenue aujourd'hui, tu me manques énormément.

Que dieu t'accueille dans son vaste paradis.

A tous mes amis

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous souhaite une vie pleine de santé, de bonheur et de réussite.

A mes deux chères binômes « Meriem et Nassima »

C'était un plaisir de travailler avec vous, Merci pour tout ce qu'on a partagé ensemble. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et un avenir plein de succès.

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

Loubna



REMERCIEMENT

Remerciements

Nous tenant tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant et le miséricordieux qui nous a donné la force et la patience d'aboutir à ce travail fructueux.

La concrétisation de ce travail n'est rendu possible que grâce au soutien et la bonne volonté de certaines personnes à qui nous jugeons nécessaire de témoigner notre gratitude.

Au docteur **BEN SI SAID HASSAN**

Maitre-assistant hospitalo-universitaire en chimie analytique

Nous tenons à vous remercier d'avoir accepté de diriger ce travail, pour la qualité de l'encadrement, pour votre aide précieuse, votre accessibilité, votre disponibilité et les conseils que vous nous avez prodigués tout au long de ce travail.

Au docteur **BELKAJD NAWEL**

Maitre-assistante hospitalo-universitaire en biochimie

Nous tenons à vous remercier pour votre aide et les remarques pertinentes qui ont enrichi notre travail.

Au docteur **DAHMANI DALILA**

Maitre-assistante hospitalo-universitaire en biochimie

Nous vous remercions Madame pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider la soutenance de ce mémoire de fin d'étude.

Au professeur **MAMOU MARZOUK**

Maitre de conférences B hospitalo-universitaire en chimie analytique

Nous vous témoignent notre gratitude pour votre large contribution à la réussite de ce modeste travail en assurant la disponibilité et l'accès à l'ensemble du matériel utilisé au cours de cette étude.

Nous vous remercions Monsieur pour l'honneur que vous nous faites en acceptant d'être membre de jury et d'examiner ce travail.

Au docteur **BOUREGHDA RAFIK**

Nous vous remercions Monsieur d'avoir eu la gentillesse d'accepter d'être membre de jury et d'examiner ce travail.

Enfin, nous tenons aussi à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration et à la réalisation de ce modeste travail.

TABLES DES MATIERES

Tables des matières

Introduction générale.....	1
Objectifs.....	2

Partie théorique

Chapitre I :Tyrosine

1. Acides aminés: généralités	3
1.1. Rappel physiopathologique	3
1.1.1. Définition	3
1.1.2. Classification.....	3
1.1.3. Importance des acides aminés.....	4
1.2. Aminoacidopathies	4
1.2.1. Définition	4
2. Tyrosine.....	5
2.1. Définition.....	5
2.2. Propriétés physico-chimique	5
2.3. Origine	5
2.4. Métabolisme	6
2.5. Rôle physiologique de la tyrosine	7
3. Tyrosinémie.....	8
3.1. Tyrosinémie héréditaire de type I (Tyrosinémie hépato-rénale)	8
3.1.1. Définition	8
3.1.2. Génétiques et incidence de la TH1	9
3.1.3. Clinique.....	9
3.1.4. Caractéristiques pathologiques	10
3.1.5. Conséquences métaboliques	10
3.1.6. Diagnostic	11
3.1.7. Prise en charge	13
3.2. Tyrosinémie Hériditaire de type II (Tyrosinémie oculo-cutanée).....	15
3.3. Tyrosénimie de type III (tyrosinémie néonatale)	16
3.4. Alcaptonurie.....	16

Chapitre II : Validation analytique

1. Définition et objectif de la validation.....	17
---	----

TABLES DES MATIERES

1.1. Définition de la validation d'une méthode d'analyse	17
1.2. Objectif de la validation analytique	17
2. contexte réglementaire	17
3. Objectif d'une méthode analytique	18
4. Cycle de vie d'une méthode analytique	18
5. Critères de validation	20
6. choix des critères de validation	21
7. Choix du protocole de validation	22
8. Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude	23
9. Démarches statistiques de la validation	24
9.1. Spécificité	24
9.2 Fonction de réponse	24
9.3 Alignements des observations	25
9.4 Prédiction inverse	26
9.5 Calcul de la justesse et de la fidélité	27
9.5.2 Justesse	29
9.5.3 Fidélité	29
9.6 Calcul de l'exactitude	29
9.7. Erreur totale et profil d'erreur totale	29
9.8. Calcul de l'intervalle de tolérance	30
9.9. Profil d'exactitude et décision	31
9.9.1. Calcul	31
9.9.2. Choix de la fonction de réponse	32
9.10. Linéarité	32
9.11. Limites de quantification	32

Partie pratique

Matériels et méthodes

1. Matériels	33
1.1. Verreries, consommables et autres	33
1.2. Matières premières	34
1.3. Réactifs	34

TABLES DES MATIERES

1.4. Appareillage.....	35
2. Méthodes	36
2.1. Optimisation de la méthode	36
2.2. Le principe de la méthode	37
2.3. Choix des paramètres de validation.....	37
2.3.1. Le choix du plan d'expérience	37
2.3.2. Le choix des niveaux de concentration	38
2.3.3. Le choix des limites d'acceptabilité.....	38
2.4. Préparation des solutions	38
2.4.1. Préparation de la phase mobile (solution de KH_2PO_4 0.015M).....	38
2.4.2. Préparation de la solution de HCl 0.1M.....	38
2.4.3. Préparation de TCA (Acide trichloracétique) 0.33M	39
2.4.4. Préparation de l'étalon interne 6000 μM	39
2.4.5. Préparation de la matrice	39
2.5. Mode opératoire.....	39
2.5.1. Première étape : préparation de la solution mère Tyr à 1mmol/l.....	40
2.5.2. Deuxième étape : dilution des solutions mères	40
2.5.3. Troisième étape : Charger la matrice avec la tyrosine et l'étalon interne.....	41
2.5.4. Quatrième étape : Déprotéinisation	41
2.5.5. Cinquième étape : Centrifugation	41
2.5.6. Sixième étape : dilution dans du KH_2PO_4	41
2.5.7. Septième étape : analyse des échantillons	41
2.6. Conditions chromatographiques	42
Résultats	
1. Chromatogrammes obtenus.....	43
2. Informations concernant les données brutes	43
3. Spécificité et effet matrice	44
4. Fonction de réponse	46
4.1. Droite : $y = bx + a$	46
4.2. Droite passante par 0 : $y = bx$	48
4.3. Logarithme népérien : $\ln y = f(\ln x)$	50
4.4. Racine carrée : $y = f(x)$	52
4.5. Fonction polynomiale : $y = cx^2 + bx + a$	54

TABLES DES MATIERES

5. Profils d'exactitude obtenus	56
6. Choix de la fonction de réponse	59
7. Alignement des observations	59
8. Prédications inverses.....	61
9. Justesse.....	61
10. Fidélité.....	62
11. Exactitude.....	62
12. Erreur totale et profil d'erreur totale	64
13. Intervalle de tolérance	64
14. Profil d'exactitude	65
15. Linéarité	66
16. Limites de quantification.....	67
Discussions	
1. Spécificité et effet matrice	69
1.1. Comparaison des chromatogrammes.....	69
1.2. Etude statistique de l'effet matrice	70
2. Le choix de la fonction de réponse	70
3. Justesse.....	70
4. Fidélité.....	71
5. Erreur totale.....	71
6. Profil d'exactitude	71
7. Linéarité	72
Conclusion.....	76
Fiche technique.....	74
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

LISTE DES ABREVIATIONS

aa : Acide aminé

AAH : Aminoacidopathies héréditaires

Ac : Acide

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALA : Aminolévulinate

ALAD : Delta-aminolévulinate-hydratase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide ribonucléique

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DIT : Diiodotyrosine

DOPA : Dihydroxyphénylalanine

EI : Etalon interne

FAH : Fumarylacétoacétate hydrolase

g : gramme

HGO : Homogentisate 1,2- dioxygénase

HPD : Hydroxyphenylpyruvate dioxygénase

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

HPPD : Hydroxy phényl pyruvate dioxygénase

IC : Intervalle de confiance

ICH : International Conference of Harmonisation

ISO : Organisation Internationale de normalisation

L : litre

LQ : Limite de quantification

LQ : Limite de quantification

MAA : Maléylacétoacétate

mg : milligramme

MHM : Maladies héréditaires du métabolisme

Min : minute

ml : millilitre

nm : nanomètre

NTBC : (2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione

LISTE DES ABREVIATIONS

PAH : Phénylalanine hydroxylase

PCU : Phénylcétonurie

Phe : Phénylalanine

SA : Succinylacétone

SAA : Succinylacétoacétate

SE : Standards d'étalonnage

SFSTP : Société française des sciences technologiques et pharmaceutiques

SM : spectrométrie de masse

SM : Solution mère

SV : Standards de validation

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

TAT : Tyrosine aminotransférase

TCA : Acide trichloracétique

TH1 : Tyrosinémie type 1

TH2 : Tyrosinémie type 2

TH3 : Tyrosinémie type 3

Tyr : Tyrosine

µl : microlitre

µmol : micromole

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : propriétés physico-chimique de la tyrosine.....	5
Tableau II: Les différentes perturbations métaboliques et les variations plasmatiques et urinaires au cours d'une TH I.....	13
Tableau III : Les principaux critères de validation.....	20
Tableau IV : Critères de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives.....	21
Tableau V : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.....	23
Tableau VI: Exemples de fonction de réponses.....	25
Tableau VII : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses.....	26
Tableau VIII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses.....	27
Tableau IX : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée.....	27
Tableau X : Matériels utilisés dans notre travail.....	33
Tableau XI : Matières premières utilisées dans notre travail.....	34
Tableau XII : Réactifs utilisés dans notre travail.....	34
Tableau XIII : Appareillages utilisés dans notre travail.....	35
Tableau XIV : Moyenne des temps de rétention obtenus.....	43
Tableau XV : résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage sans matrice de la Tyrosine.....	44
Tableau XVI : résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (avec matrice) de la Tyrosine.....	45
Tableau XVII : comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine pour la Tyrosine.....	45
Tableau XVIII: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $y = bx + a$ (sans matrice)..	46
Tableau XIX : Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $y = bx$ (sans matrice).....	48
Tableau XX : Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (sans matrice)..	50
Tableau XXI : Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (sans matrice)..	52
Tableau XXII: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (sans matrice).....	54
Tableau XXIII : profils d'exactitude obtenus pour la Tyrosine.....	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau XXIV : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour la Tyrosine.....	60
Tableau XXV: concentrations calculées par prédiction inverse pour la Tyrosine.....	61
Tableau XXVI: Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour la Tyrosine.....	62
Tableau XXVII: fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour Tyrosine.....	62
Tableau XXVIII: Résultats du calcul de l'exactitude relative de la Tyrosine.....	63
Tableau XXIX : calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation de la tyrosine.....	64
Tableau XXX : Intervalle de tolérance pour chaque niveau de concentration.....	65
Tableau XXXI : résultats des comparaisons statistiques de la linéarité.....	67
Tableau XXXII : calcul des limites de quantification de la Tyrosine.....	68
Tableau XXXIII : Interprétation des résultats de l'étude statistique de l'effet matrice.....	69

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Structure générale des acides aminés.....	3
Figure 02: Métabolisme de la tyrosine.....	6
Figure 03 : Synthèse des hormones thyroïdiennes à partir de la tyrosine.....	7
Figure 04: Conversion de la L-tyrosine à adrénaline et noradrénaline.....	7
Figure 05 : Le sentier catabolique de la tyrosine et les maladies associées.....	8
Figure 06 : Localisation des mutations dans le gène de la FAH au cours de la THI.....	9
Figure 07 : Organisation du diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme dans un laboratoire de biochimie spécialisée.....	11
Figure 08 : Formation des dérivés de 4-hydroxyphényl.....	12
Figure 09 : Principe de l'action métabolique de NTBC.....	14
Figure 10 : Cycle de vie d'une méthode analytique.....	19
Figure 11 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	22
Figure 12 : Schéma explicatif de la spécificité.....	24
Figure 13 : Représentation schématique des notions de la justesse et de la fidélité.....	27
Figure 14 : Représentation schématique des composantes de l'erreur.....	30
Figure 15 : Plan d'expérience de la validation.....	37
Figure 16 : Mode opératoire de la validation.....	39
Figure 17 : Dilution de la solution mère de tyrosine.....	40
Figure 18 : Exemple d'un pic chromatographique.....	43
Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 1).....	47
Figure 20 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 2).....	47
Figure 21: Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 3).....	48
Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 1)....	49
Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 2)....	49
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 3)....	50
Figure 25: Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 1).....	51
Figure 26: Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 2).....	51
Figure 27: Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 3).....	52

LISTE DES FIGURES

Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 1).....	53
Figure 29 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 2).....	53
Figure 30 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 3).....	54
Figure 31 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (Série1).....	55
Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (Série2).....	55
Figure 33 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (Série3).....	56
Figure 34 : profil d'erreur total pour la Tyrosine.....	64
Figure 35 : profil d'exactitude de la Tyrosine avec ($\beta = 85\%$ et $\lambda = 15\%$).....	65
Figure 36 : Droite de linéarité de la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Tyrosine.....	66
Figure 37 : chromatogramme obtenu avec un standard de validation(avec matrice).....	69
Figure 38 : chromatogramme obtenu avec un standard d'étalonnage(sans matrice).....	69
Figure 39 : chromatogramme obtenu avec un blanc non chargé par la tyrosine.....	69

Introduction

Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM) représentent un groupe d'affections génétiques ayant en commun la dysfonction d'enzymes ou d'autres protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire. Ces maladies sont rares mais elles représentent une part considérable de la pathologie néonatale et pédiatrique. Le nombre de ces maladies pouvant être traitées était faible, mais il s'accroît régulièrement, la qualité du traitement dépend étroitement de la rapidité du diagnostic [1].

Le diagnostic de ces maladies repose sur des méthodes biochimiques complexes ou des études moléculaires non disponibles en Algérie d'où l'intérêt de développer une méthode de diagnostic simple, économique et applicable en routine. C'est dans ce cadre que s'inscrit le travail réalisé au cours de ce projet de fin d'étude ; en vue d'optimiser et valider une méthode analytique permettant le dosage par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) de la tyrosine (Tyr), acide aminé impliqué dans la survenue de la tyrosinémie qui est une aminoacidopathie caractérisée par des élévations des taux sanguins de la tyrosine ou de ces métabolites engendrant des troubles hépatiques, rénaux et des retards mentaux, dont le dépistage à bas âge permet de réduire les séquelles et d'offrir une meilleure qualité de vie. Non traitée, la tyrosinémie peut être fatale

La validation de cette méthode repose sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à une méthode analytique permettant de donner des résultats fiables et de montrer qu'elle correspond à l'utilisation pour laquelle elle est proposée.

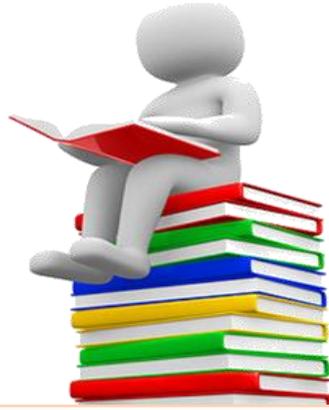
Aujourd'hui, la qualité métrologique des mesures se traduit par des exigences de validation des méthodes et d'estimation de l'incertitude accrue [2]. Afin de garantir la fiabilité des résultats de notre méthode nous avons suivis la démarche harmonisée décrite dans le guide de validation élaboré par une commission SFSTP publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

En effet notre travail est scindé en deux parties, une est une revue de la littérature comportant deux chapitres : généralités sur la Tyrosine et validation analytique. L'autre partie de ce mémoire est la mise au point et la validation d'une méthode de dosage de la Tyrosine par HPLC.

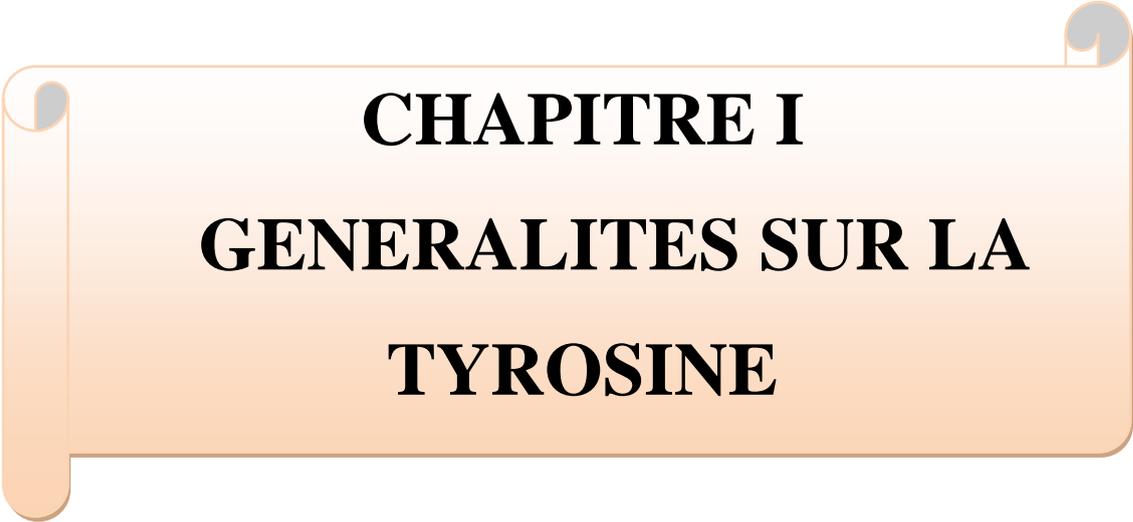
Objectif

L'objectif de cette étude est de valider une méthode analytique simple, rapide, économique et réalisable en routine de dosage de la Tyrosine dans le sérum humain par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec le détecteur spectrofluorimétrique, en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision.

Pour atteindre cet objectif, cette méthode doit être validée selon le protocole élaboré par la commission de la société française des sciences techniques et pharmaceutiques (SFSTP) décrivant une approche de validation harmonisée, publié dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006.



PARTIE THEORIQUE

An orange scroll graphic with a gradient from light to dark orange, featuring a vertical strip on the left and a circular tab on the right. The text is centered on the scroll.

CHAPITRE I
GENERALITES SUR LA
TYROSINE

1. Acides aminés : généralités

1.1. Rappel physiopathologique

1.1.1. Définition

Les acides aminés sont les briques moléculaires qui forment une protéine.

Ils possèdent une fonction amine primaire et une fonction carboxylique.

Ils diffèrent par la nature de la chaîne latérale (radical R qui détermine l'identité de l'aa) [3].

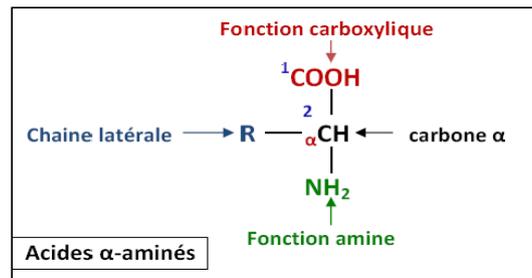


Figure 1 : structure générale des acides aminés [4].

1.1.2. Classification

Les acides aminés peuvent être classés:

❖ selon la structure de la chaîne latérale

- Aliphatique :
 - ✓ hydrocarbonée (5aa) :
 - linéaire : glycine, alanine.
 - ramifié : valine, leucine, isoleucine.
 - ✓ à fonction alcool (2aa) : sérine, thréonine.
 - ✓ à fonction soufrée (2aa) : cystéine, méthionine.
 - ✓ à fonction acide et amide correspondante (4aa) : Ac aspartique, Asparagine, Ac glutamique, Glutamine.
 - ✓ à fonction basique (3aa) : lysine, arginine, histidine.

➤ Cyclique :

- ✓ Aromatique (3aa) : phénylalanine, tyrosine, tryptophane.
- ✓ hétérocycle (1aa) : proline [5].

❖ selon la polarité de la chaîne latérale R

➤ polaires:

- ✓ non chargée ou non ionisable (6aa): sérine, thréonine, asparagine, glutamine, cystéine, tyrosine.
- ✓ chargée ou ionisable (5aa) : Ac aspartique, Ac glutamique, lysine, arginine, histidine.
- non polaire (9aa) : glycine, alanine, leucine, valine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, proline [6].

❖ On peut les classer aussi selon la source

Il existe deux groupes d'acides aminés déterminés par la capacité de l'organisme humain à les synthétiser ou non. Les aa (Leucine, Isoleucine, Valine, Thréonine, Phénylalanine, Tryptophane, Lysine, Méthionine) ne peuvent être synthétisés par l'homme. Ils sont appelés « Acides aminés essentiels » ou « indispensables ».

De même, le caractère non essentiel des autres aa demande à être précisé. En effet, l'essentialité de ces molécules a été définie à partir des besoins évalués chez l'adulte sain alimenté par voie orale. Or, il existe un certain nombre de situations au cours desquelles un apport exogène devient nécessaire, la synthèse endogène étant insuffisante par rapport aux besoins « ex : histidine et arginine en période de croissance » [7].

1.1.3. Importance des acides aminés

- Rôle biosynthétique : Précurseurs des protéines, d'hormones, de neurotransmetteurs, de nucléotides et de l'hème.
- Rôle énergétique : Substrats énergétiques.
 - leur catabolisme alimente le cycle de Krebs
 - certains sont des substrats de la néoglucogenèse (aa glucoformateurs : Ala, Gly, Ser, Cys...)
- Rôle fonctionnel : Certains, à l'état libre, ont une activité biologique propre ex: acide γ -aminobutyrique G.A.B.A ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- - \text{H}^+ + \text{CH}_2$) [3].

1.2. Aminoacidopathies

1.2.1. Définition

Les aminoacidopathies sont un groupe d'erreurs du métabolisme des acides aminés liés à une anomalie biochimique génétiquement déterminée. Plus de 50 maladies sont connues à l'heure actuelle. Ces affections sont rares et sont le plus souvent transmises selon le mode autosomique récessif [8].

Ces maladies peuvent être classées en 2 grands groupes :

- Aminoacidopathies par anomalie de transport membranaire, atteignant les membranes rénales, hépatiques, de l'entérocyte ou encore les membranes intracellulaires (mitochondries, lysosomes) ;
- Aminoacidopathies par enzymopathie : déficit enzymatique touchant une étape du catabolisme de l'acide aminé incriminé :

- Lorsque le déficit implique une enzyme située au début de la voie de dégradation, l'aminocidopathie se traduit par une accumulation d'acides aminés. Ex : phénylcétonurie et la leucinose.
- Lorsque le déficit implique une enzyme distale dans la voie de la dégradation, il peut y avoir une accumulation d'acides organiques, on parle alors d'acidémies organiques, ou d'aciduries organiques (Ex : acidurie propionique, méthyl malonique glutarique...), car elles sont souvent diagnostiquées à partir d'un dosage urinaire.
- Les déficits en enzymes du cycle de l'urée impliquées dans la détoxification de l'ammonium peuvent induire une hyperammoniémie dangereuse pour le cerveau et qui peut être non létale [9].

Les symptômes cliniques de la maladie sont dus aux effets toxiques de l'acide aminés ou des intermédiaires métaboliques qui s'accumulent dans le plasma, ou encore à un défaut d'épuration d'une substance toxique, l'ammoniac (très neurotoxique) [10].

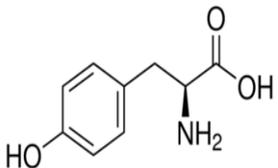
2. Tyrosine

2.1. Définition

La tyrosine est un acide aminé aromatique non essentiel. Son catabolisme entraîne la formation de fumarate et d'acétoacétate, deux composés importants pour la néoglucogénèse et la cétogénèse [11]. Les concentrations plasmatiques normales de tyrosine varient de 30 à 120 μ mole par litre. L'augmentation des taux peut être due à des maladies du foie ou des erreurs innées du catabolisme de la tyrosine [12].

2.2. Propriétés physico-chimique

Tableau I : propriétés physico-chimique de la tyrosine [13].

Formule brute	Formule développée	Dénomination chimique	PKa NH ₃	PKa COOH	PHi	Masse molaire	T° de fusion
C ₉ H ₁₁ N ₃		Acide(S)-2-amino-3-(4 hydroxyphényl) propanoïque	9.1	2.2	5.6	181.19	343

- Les acides aminés aromatiques présentent un pic d'absorption autour de 278 nm, propriété utilisée pour le dosage spectrophotométrique de ces derniers [14].

2.3. Origine

La tyrosine est essentiellement synthétisée par l'organisme à partir de la phe, cependant, on la

trouve également dans les aliments riches en protéines tels que le lait, les œufs et la viande, ou sous forme de compléments alimentaires adaptés aux sportifs.

Les besoins journaliers chez l'adulte sain sont estimés à 1 à 2 grammes [15].

2.4. Métabolisme

La tyrosine est le produit de la phénylalanine hydroxylase, son catabolisme s'effectue au niveau du foie en passant par cinq étapes distinctes catalysées par cinq enzymes différentes jusqu'à la dégradation complète pour former du fumarate et de l'acétoacétate qui, au cours du jeûne, conduisent les carbones vers la gluconéogenèse et la cétogenèse [16].

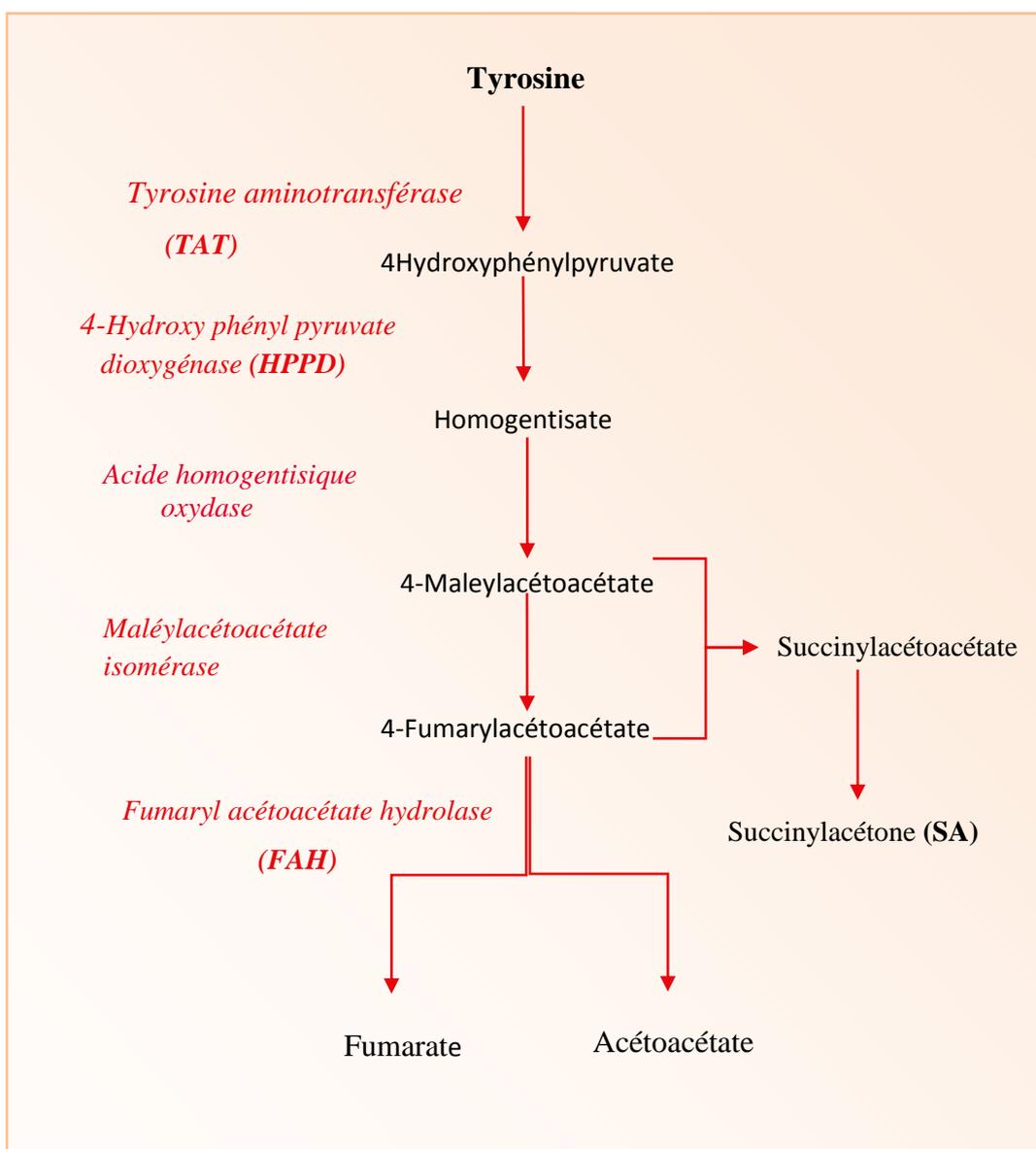


Figure 2: Métabolisme de la tyrosine [17].

2.5. Rôle physiologique de la tyrosine

▪ Synthèse de la mélanine

La mélanine est synthétisée à partir de la Tyr par la Tyrosinase dans les mélanosomes, organites provenant de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique du mélanocyte [18]. Le déficit en tyrosinase donne de l'albinisme [19].

▪ Précurseur des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont produites par les cellules épithéliales de la glande thyroïde, par iodation de la Tyr grâce à la thyroïde peroxydase. [20,21]

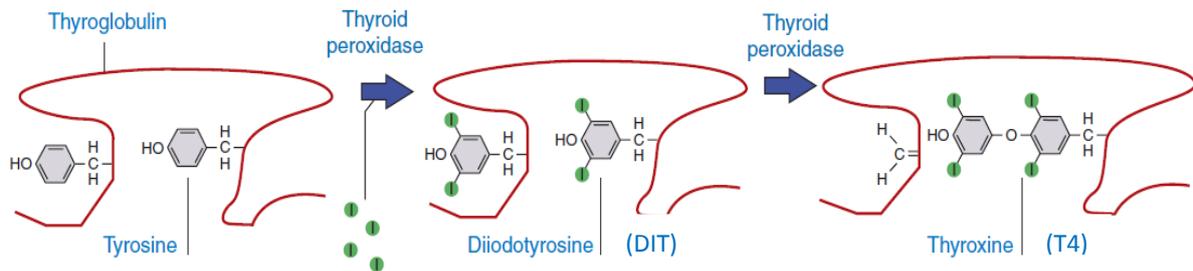


Figure 3 : synthèse des hormones thyroïdiennes à partir de la tyrosine [22].

▪ Précurseur des catécholamines

Les catécholamines sont synthétisées à partir de Tyr. La phase initiale implique l'hydroxylation en dihydroxyphénylalanine (DOPA), catalysée par l'enzyme tyrosinehydroxylase. Une fois formé, la DOPA est rapidement décarboxylée en Dopamine par la DOPA décarboxylase [23].

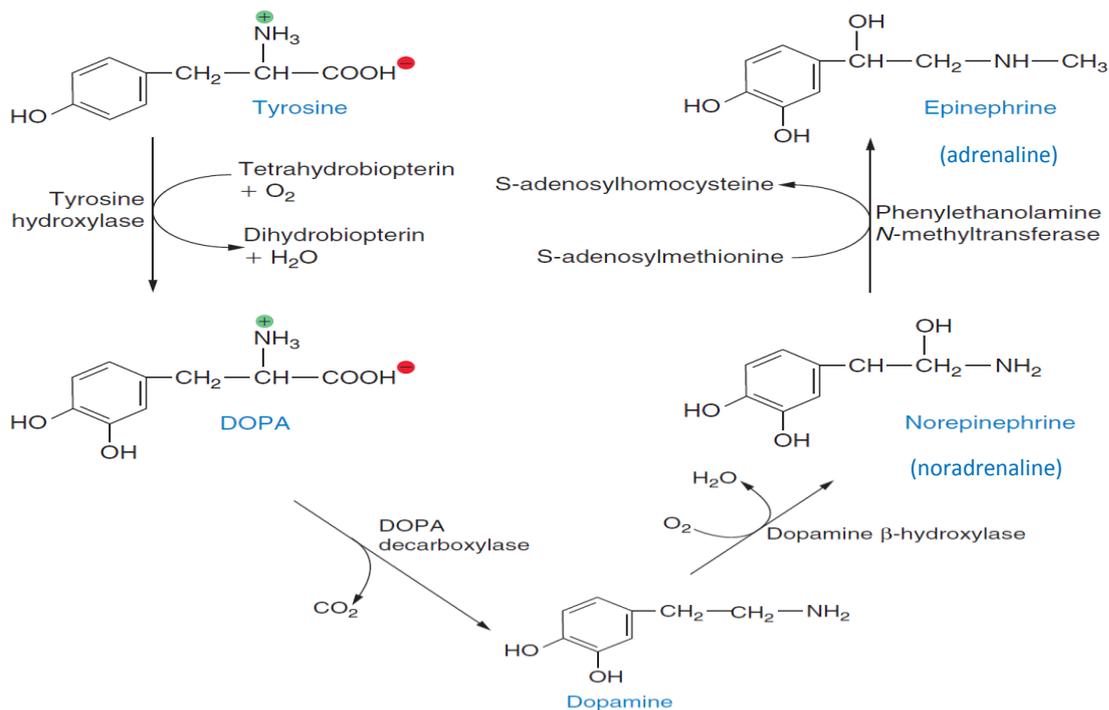


Figure 4 : Conversion de la L-tyrosine en adrénaline et noradrénaline [22].

3. Tyrosinémie

La tyrosinémie est un trouble génétique caractérisé par des élévations des taux sanguins de la tyrosine. Elle résulte d'un déficit de l'une des enzymes essentielles du métabolisme de cette dernière qui engendre l'accumulation de la Tyr ou de ses différents métabolites dans les tissus.

Il existe plusieurs types de tyrosinémie présentant des symptômes distinctifs et causés par la déficience d'une enzyme différente. La tyrosinémie type I est la plus fréquente [24].

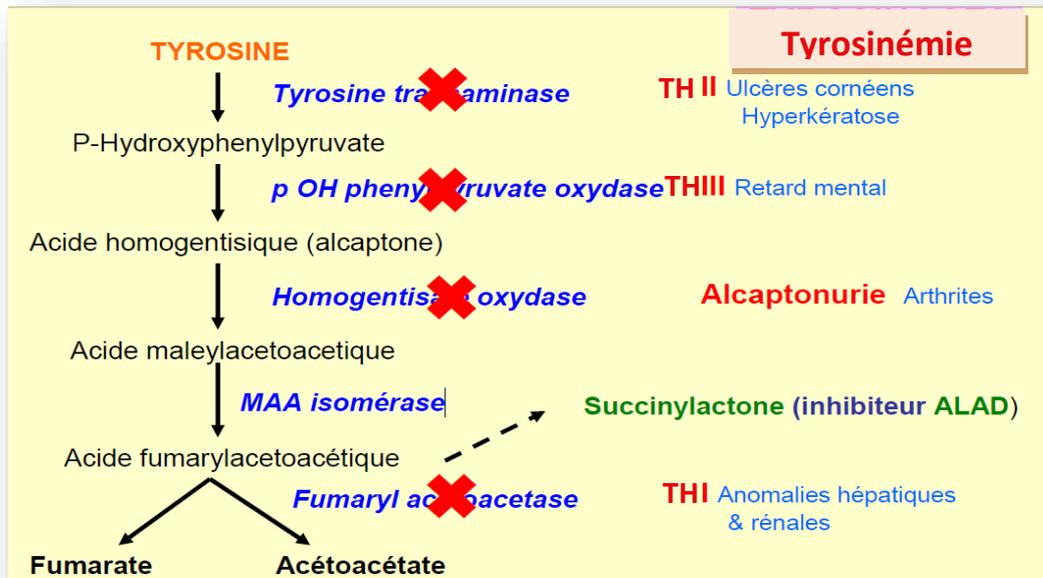


Figure 5 : Le sentier catabolique de la tyrosine et les maladies associées [25].

3.1. Tyrosinémie héréditaire de type I (Tyrosinémie hépato-rénale)

3.1.1. Définition

La THI est une maladie autosomique récessive, elle résulte d'un déficit en fumaryl acétoacétate hydrolase (FAH), la dernière enzyme impliquée dans la voie catabolique de la tyrosine [26].

Ce déficit entraîne une accumulation de métabolites tels que le fumarylacétoacétate (FAA), le maléylacétoacétate et le succinylacétone, l'accumulation de ces derniers est responsable des effets toxiques hépatiques et rénaux et des crises neurologiques chez les patients en bas âge [27].

C'est une aminoacidopathie rare dont l'évolution peut être fatale sans diagnostic et prise en charge précoces.

3.1.2. Génétiques et incidence de la TH1

La TH1 est une maladie autosomique récessive causée par diverses mutations causales dans le gène codant pour la FAH. Chez l'humain, le gène de la FAH comprend 14 exons répartis sur environ 35 kb localisés dans la région q23-q25 du chromosome 15 [28].

Quarante et une mutations associées à la TH1 ont été répertoriées dont 19 mutations faux sens, 13 mutations d'épissage, 8 mutations non-sens et une mutation silencieuse.

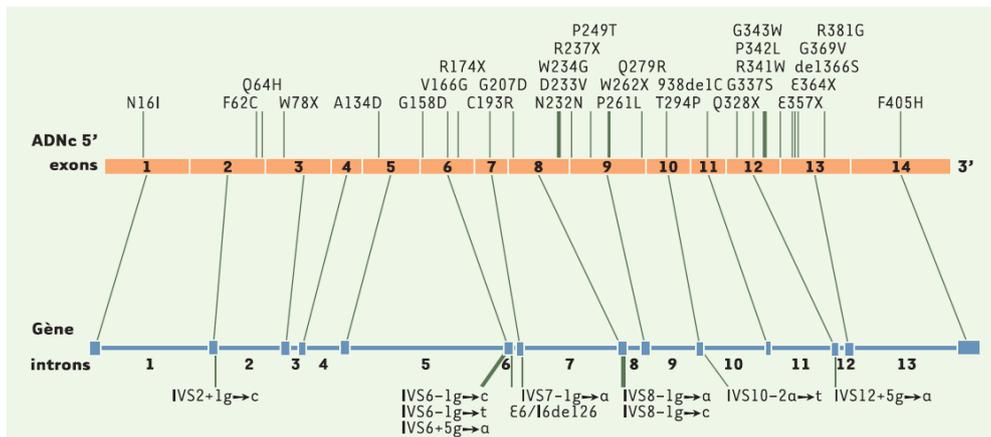


Figure 6 : Localisation des mutations dans le gène de la FAH au cours de la TH1 [27].

3.1.3. Clinique

La TH1 se regroupe sous deux formes distinctes : La forme aiguë et la forme chronique, qui sont classifiées selon l'évolution clinique, la sévérité de la maladie et l'âge d'apparition des symptômes.

- **La forme aiguë :**

Les symptômes de la forme aiguë se manifestent précocement après la naissance, entre 15 jours et 3 mois, et sont principalement caractérisés par une dysfonction hépatique sévère. Si aucun traitement n'est rapidement administré, l'enfant meurt en bas âge, dû à une cirrhose hépatique. De plus, les patients démontrent une incapacité à se développer normalement, des vomissements, des diarrhées et dégagent une odeur de choux. Fréquemment, de l'hépatomégalie ou l'hypertrophie du foie, de la fièvre, des œdèmes, de l'épistaxis, des crises abdominales et de la polyneuropathie sont aussi observés [16].

- **La forme chronique :**

Se distingue par une cirrhose hépatique progressive, le développement ultérieur d'un carcinome hépatocellulaire, un cancer primitif du foie, et une dysfonction rénale, communément nommée le syndrome de Fanconi [16].

3.1.4. Caractéristiques pathologiques

Au niveau hépatique : L'examen macroscopique montre de l'hypertrophie, de la cirrhose, une apparence nodulaire et une altération de la couleur du foie.

Au niveau rénal : L'examen pathologique des reins montre des caractéristiques semblables à celle du foie, dont une couleur altérée et de l'hypertrophie. Généralement, l'ensemble des changements pathologiques observés conduit à de l'insuffisance rénale.

Dans certains cas, des phases aiguës de crises neurologiques ont été observées chez des patients TH1. Les crises sont souvent caractérisées par de la douleur aux membres inférieurs, de la paresthésie, de la poly neuropathie, des signes de dysautonomie avec douleurs abdominales plutôt sévères, un déficit moteur et une atteinte respiratoire.

La TH1 peut affecter d'autres organes : cœur, pancréas, os [16].

3.1.5. Conséquences métaboliques

Un déficit en FAH entraîne une accumulation de deux puissants toxiques pour les cellules hépatiques et tubulaires rénales : le fumarylacétoacétate (FAA) et le maléylacétoacétate (MAA) en amont du blocage enzymatique. FAA et MAA sont ensuite dégradés en succinylacétoacétate (SAA) et en succinylacétone (SA), deux autres dérivés toxiques (en particulier le SA) [29].

❖ Hypertyrosinémie

La Tyrosinémie est 5 à 10 fois supérieure aux valeurs normales.

L'augmentation de la concentration plasmatique de tyrosine n'est pas spécifique de la Tyrosinémie Type I car elle peut être observée au cours de circonstances pathologiques diverses : prématuré (Tyrosinémie transitoire), Scorbut, insuffisance hépatique grave [29].

❖ Hyperméthioninémie

La méthionine plasmatique peut être notablement élevée.

Cette hyperméthioninémie est considérée comme la manifestation biologique du stade aigu de la maladie [30].

❖ Hypertyrosylurie

Elle correspond à l'élimination urinaire de la tyrosine et des acides parahydroxyphényl pyruvique, lactique et acétique qui sont des catabolites secondaires [31].

❖ Présence de l'inhibiteur (succinyl acetone)

Le terme « inhibiteur » désigne l'ensemble des métabolites qui s'accumulent dans la TH I et inhibent l'activité de l'enzyme δ -ALAD, le SA est l'un de ces composés [32].

L'inhibition de l'enzyme δ -ALAD cause une accumulation de δ -ALA et une inhibition de la biosynthèse de l'hème.

❖ Syndrome du tubulopathie complexe

Il apparaît souvent après la cirrhose mais peut parfois être contemporain de celle-ci.

Les anomalies retrouvées sont :

- Une protéinurie positive, mais elle est discrète, intermittente et de type tubulaire.
- La glycosurie sans hyperglycémie, modérée et intermittente.
- L'hyper-amino-acidurie est globale, l'élimination de la TYR est prépondérante.

D'autres perturbations tubulaires peuvent survenir :

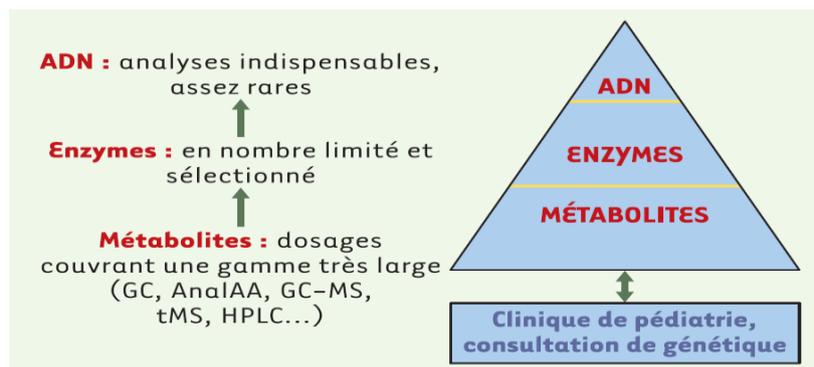
- Un défaut de concentration des urines responsable d'accidents de déshydratation.
- Une hypokaliémie.

Cette tubulopathie complexe réalise le plus souvent un véritable syndrome de TONI-DEBRE-FANCONI [33].

- une glomérulopathie progressive : qui peut entraîner une insuffisance rénale chronique.

3.1.6. Diagnostic

Le diagnostic précis et le suivi des maladies héréditaires du métabolisme reposent, d'une part, sur des examens classiques d'orientation (glycémie, cétose, ammoniémie...) suivis par l'utilisation des méthodes d'analyse biochimique complexes telles que les méthodes chromatographiques en phase liquide ou en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse, et des méthodes électrophorétiques.



- GC: chromatographie en phase gazeuse
- tMS: spectrométrie de masse en tandem ;
- Anal aa: analyse d'acides aminés;
- HPLC: chromatographie liquide haute Performance.
- MS: spectrométrie de masse ;

Figure 7 : Organisation du diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme dans un laboratoire de biochimie spécialisée [34].

Un diagnostic de la TH1 est fait sur la base d'une évaluation approfondie clinique, une histoire détaillée du patient et des tests spécialisés. Il peut être suspecté chez les nourrissons qui présentent un retard de croissance et une hypertrophie du foie (hépatomégalie) au cours des trois premiers mois de la vie [35].

➤ Chez les patients symptomatiques, Le diagnostic peut être établi à partir de tests sanguins et d'analyses d'urine :

❖ Analyses de base

- Le bilan hépatique est souvent perturbé aussi bien dans sa forme aiguë que chronique. Généralement les taux d'albumine sérique et de facteurs de coagulation sont abaissés, le taux des transaminases est de faiblement à modérément élevé, tandis que la bilirubine est augmentée de façon variable.
- Le bilan rénale : une hyperphosphaturie, une glycosurie, et une acidose métabolique seront observées [36].

❖ Analyses spécifiques

- Le diagnostic repose sur la détection de succinylacétate dans le sang et les urines (par spectrophotométrie ou CPG). La présence dans le plasma et surtout dans les urines de succinylacétone est le signe pathognomonique de la TH1.
- Présence des acides organiques dans les urines : dérivés de 4-hydroxyphényl (4-hydroxyphénylpyruvique, lactique et acétique).

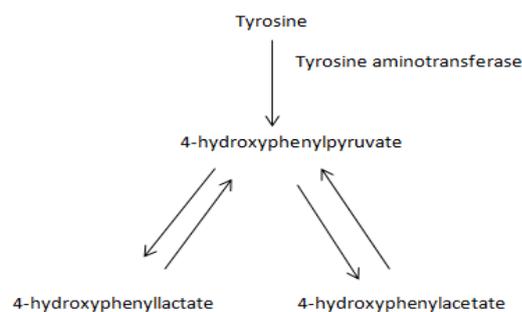


Figure 8 : Formation des dérivés de 4-hydroxyphényl [36].

- Présence de delta-aminolévulinate(ALA) : le SA étant un inhibiteur de l'enzyme delta-aminolévulinate-hydratase(δ -ALAD), cette propriété est utilisée pour le quantifier en mesurant par spectrophotométrie l'absence de porphobilinogène normalement produit par δ -ALAD en présence de 2 molécules d'ALA.
- La chromatographie des acides aminés, plasmatiques et urinaires.

- La confirmation du diagnostic nécessite la mesure de l'activité enzymatique de la FAH et la recherche de mutations en biologie moléculaire.

La mesure de l'activité FAH peut être réalisée sur biopsie hépatique, sur fibroblastes, sur des lymphocytes ou sur papier buvard. Les patients atteints de forme chronique ont une activité enzymatique de FAH résiduelle de l'ordre de 20 %, alors que celle-ci est nulle chez les patients atteints de la forme aiguë [36].

Le tableau suivant résume ces perturbations métaboliques et les variations plasmatiques et urinaires.

Tableau II: Les différentes perturbations métaboliques et les variations plasmatiques et urinaires au cours d'une TH I [36].

	Tyr	Met	Phe	AFP	SA	Phényl pyruvate	Acide delta Amino lévulinique
sanguin	↗↗↗	↗↗↗	↘	↗↗↗	↗↗	↗↗↗	
urinaire	↗↗↗		↗	↗↗↗	↗↗	↗↗↗	↗↗↗

Diagnostic prénatal

Il existe un diagnostic prénatal pour la TH I qui consiste à déterminer la présence de SA dans le liquide amniotique prélevé entre la 13^{ème} et la 16^{ème} semaine de grossesse. Le SA est dosé dans le liquide amniotique, sa présence indique que le fœtus est atteint de la maladie. Cependant ce test n'est offert qu'aux personnes à haut risque de transmettre la maladie, C'est-à-dire les couples ayant déjà un enfant atteint et ceux présentant une histoire familiale de TH I [37].

3.1.7. Prise en charge

❖ Régime alimentaire

Le traitement consiste à diminuer la prise de tyrosine et de phénylalanine dans l'alimentation des patients. Ceci a pour effet de diminuer l'accumulation des métabolites de la voie catabolique et donc de diminuer la gravité des symptômes du patient et améliorer son état général, mais ne prévient pas les dommages hépatiques (90% des enfants TH1 meurent avant l'âge de 12 ans (sur une diète seule) [28].

L'objectif du régime consiste à :

- Maintenir des taux sanguins de tyrosine inférieurs à 400 micromoles par litre pour éviter les complications secondaires à des taux élevés de tyrosine dans le sang. Ceci, tout en garantissant le besoin journalier en protéines naturelles tolérées,

- Avoir des apports nutritionnels suffisants pour obtenir une croissance staturo-pondérale normale et assurer un bon développement psychomoteur [28].

❖ **Traitement symptomatique**

Adapté à chaque cas et à chaque moment de l'évolution de la maladie, il comprend :

- La transfusion par le plasma frais congelé, les culots globulaires ou plaquettaire en fonction de l'atteinte hématologique.
- le traitement du rachitisme, par vitamine D à des fortes doses qui peuvent être importantes dans les formes chroniques de TH1 ou mieux par le 1,25 Di OH cholécalciférol.
- Le traitement de l'acidose hyperchlorémique.
- Le traitement de l'hypokaliémie... [28].

❖ **Traitement par NTBC (2 nitro-4-Trifluorométhyl-benzoyl 1, 3 cyclohexanédione)**

Il consiste à combiner la diète restrictive et la prise d'un inhibiteur du sentier catabolique de la tyrosine: le 2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione ou NTBC [28,38].

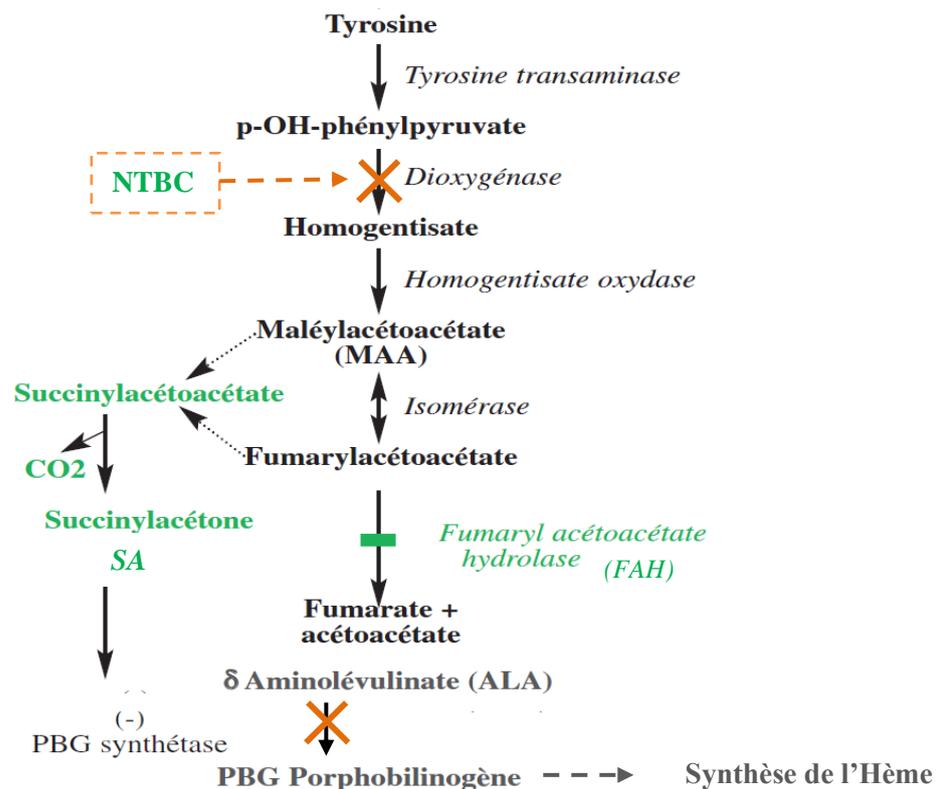


Figure 9 : principe de l'action métabolique de NTBC [39].

Cette molécule inhibe de façon compétitive l'enzyme ρ -hydroxy phényl pyruvate dioxygénase (HPPD). Ceci empêche la formation de FAA Ce qui a pour but de prévenir l'apparition des symptômes aigus de la maladie [40].

Les patients chez qui le NTBC est inefficace doivent subir une transplantation hépatique.

❖ Transplantation hépatique

C'est la plus drastique de ces mesures. Elle n'est maintenant pratiquée qu'en dernier recours puisque le patient doit subir une opération majeure qui peut entraîner plusieurs complications, dont le rejet de l'organe transplanté [41].

De plus, la prise d'immunosuppresseurs et leurs effets à long terme constituent d'autres facteurs qui incitent les médecins à considérer d'autres avenues de traitement. Cependant, la transplantation du foie est le seul traitement qui prévient l'apparition des hépatocarcinomes cellulaires [42].

3.2. Tyrosinémie Héritaire de type II (Tyrosinémie oculo-cutanée)

La TH II est une maladie autosomique récessive due à des mutations du gène TAT codant la tyrosine aminotransférase(TAT). Les taux élevés de la tyrosine par déficit en TAT entraîneraient des dépôts de cristaux de tyrosine à l'origine d'une réaction inflammatoire et des manifestations oculo-cutanées, dans certains cas, un déficit intellectuel. La maladie semble être plus fréquente dans les populations arabes et méditerranéennes [43,44].

➤ Méthodes diagnostiques

Le diagnostic repose sur les signes cliniques et sur la détection d'un taux élevé de tyrosine, plasmatique et urinaire, et d'un taux élevé des métabolites urinaires de la tyrosine (4-hydroxy-phényl pyruvate, 4-hydroxy-phényl lactate, 4-hydroxy-phényl acétate et N-acétyl tyrosine). La mesure de l'activité TAT sur biopsie hépatique n'est généralement pas nécessaire au diagnostic. Certains patients peuvent être détectés dans le cadre du programme de dépistage néonatal [45].

➤ Diagnostic différentiel

Les troubles oculaires représentent souvent les premiers signes de la maladie, la kératite pseudo-dendritique est fréquemment confondue avec une kératite herpétique [45].

➤ Diagnostic prénatal

Un diagnostic prénatal par analyse moléculaire a été rapporté, dans des familles où la mutation TAT avait été identifiée au préalable [45].

➤ **Prise en charge et traitement**

La prise en charge consiste en un régime diététique limité en phénylalanine et en tyrosine. Le traitement des lésions cutanées peut nécessiter la prise orale de rétinoïdes. Le régime diététique permet de diminuer l'hypertyrosinémie avec un effet rapide sur les manifestations oculo-cutanées. Cependant, le degré de neuroprotection du régime n'est pas certain [43].

3.3. Tyrosénémie de type III (tyrosinémie néonatale)

La TH III est une erreur innée du métabolisme de la tyrosine caractérisée par une hypertyrosinémie modérée et une excrétion urinaire élevée de 4-hydroxyphenylpyruvate, 4-hydroxyphenyllactate et de 4-hydroxyphenylacetate [46].

La TH III se transmet sur le mode autosomique récessif, elle est due à des mutations sur le gène HPD (12q14-qter) en codant le 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase.

C'est la forme la moins fréquente de tyrosinémie avec moins de 20 cas rapportés dans la littérature[47].

Le tableau clinique varie considérablement, d'asymptomatique chez des patients identifiés grâce au dépistage néonatal, jusqu'à des patients avec des manifestations neurologiques incluant déficit intellectuel et ataxie [48].

Prise en charge et traitement

Malgré la variabilité du tableau clinique, il est recommandé aux patients de suivre un régime alimentaire pauvre en phénylalanine et en tyrosine [48].

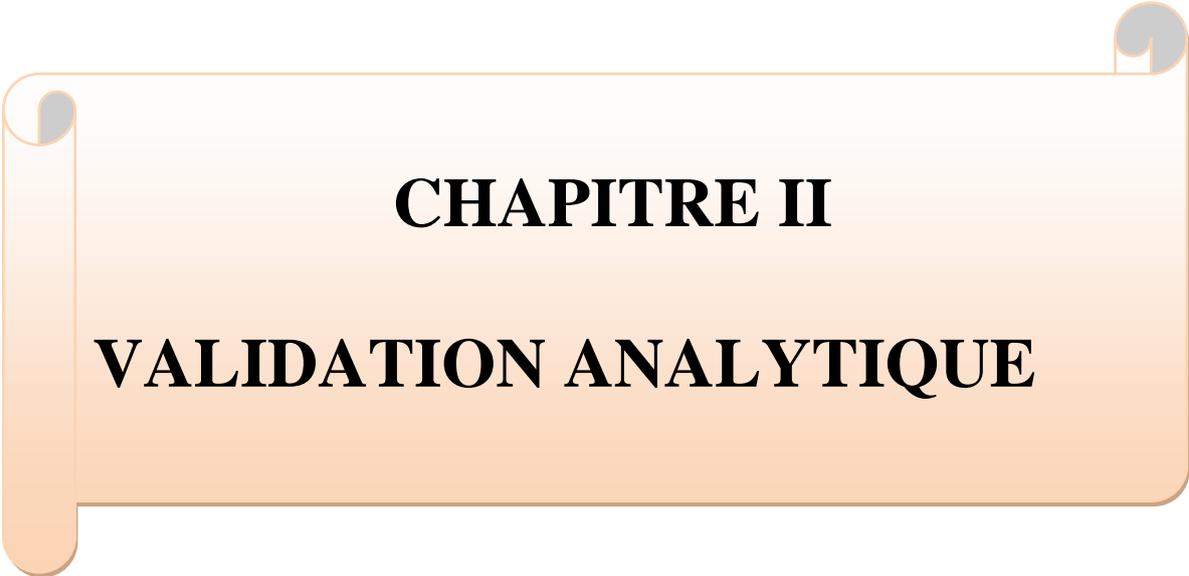
3.4. Alcaptonurie

L'Alcaptonurie, est une maladie héréditaire autosomique récessive rare touchant entre 1/250000 et 1/1million naissances [49].

Elle est caractérisée par un déficit de l'activité de l'homogentisate 1,2-dioxygénase dans le foie et les cellules tubulaires rénales proximales à l'origine d'une accumulation dans tous les tissus conjonctifs et une élimination urinaire accrue de l'acide homogentisique et de son métabolite oxydé (l'acide acétique benzoquinone). Ce dernier, en se polymérisant, se transforme en un pigment proche de la mélanine à l'origine de la coloration noirâtre des urines exposées à la lumière, et une pigmentation des tissus cartilagineux [50].

Le diagnostic positif est basé sur la triade : arthrite dégénérative en particulier les calcifications discales étagées intéressant essentiellement le rachis lombaire, la pigmentation ochronotique et le noircissement des urines à la lumière. La confirmation diagnostique est obtenue par le dosage de l'acide homogentisique urinaire.

Le traitement est essentiellement symptomatique [51,52].



CHAPITRE II

VALIDATION ANALYTIQUE

1. Définition et objectif de la validation

1.1. Définition de la validation d'une méthode d'analyse

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

Selon l'ICH : Ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé [53].

1.2. Objectif de la validation analytique

L'objectif de la validation est de :

- ✓ donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure [54].
- ✓ s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée [55].

2. contexte réglementaire

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ISO, ICH, notamment le guideline ICH Q2 (R1) paru en 2005 :

« Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ».

Son but est de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique.

En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement.

Ce guideline ICH est une exigence réglementaire, toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) doit répondre à ses exigences.

Il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires comme les guides de validation analytique de la SFSTP mais qui fournissent un outil pratique qui répond à ces exigences :

- SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d’une commission SFSTP »
 - I. Méthodologie, paru dans STP Pharma Prat. en 1992
 - II. Exemples d’application, paru dans STP Pharma Prat. en 1992
- SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d’une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Prat. en 1997
- SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »
 - I. Généralités, paru dans STP Pharma Prat. en 2003
 - II. Statistiques, paru dans STP Pharma Prat. en 2006
 - III. Exemples d’application, paru dans STP Pharma Prat. en 2006
 - IV. Exemples d’application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008[56].

3. Objectif d’une méthode analytique

L’objectif d’une bonne procédure analytique est de pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer.

En d’autres termes, ce que tout analyste attend d’une procédure analytique c’est que la différence entre le résultat rendu (x) et la « vraie valeur » inconnue de l’échantillon, qui par ailleurs restera toujours inconnue, soit petite ou du moins inférieure à une limite d’acceptation, c’est-à-dire: $-\lambda < x - \mu T < \lambda \iff |x - \mu T| < \lambda$

Avec λ la limite d’acceptation, qui peut être variable selon les exigences de l’analyste ou la finalité de la procédure analytique, laquelle est liée aux exigences communément admises par la pratique professionnelle (par exemple : 1 ou 2% sur des matières premières, 5% sur des spécialités pharmaceutiques, 15% en bioanalyse, environnement, etc.). Nous voyons ainsi apparaître deux principes fondamentaux : d’une part, une notion de limite d’acceptation des performances d’une procédure analytique, d’autre part, de manière implicite, celle de la responsabilité de l’analyste dans la décision d’accepter ou non une procédure en fonction de ses performances et de l’usage pour lequel elle est prévue [54, 57].

4. Cycle de vie d’une méthode analytique

Afin de comprendre le rôle et la place de la validation dans la vie d’une méthode d’analyse, il est intéressant de décrire son cycle de vie (figure1) depuis le moment où elle est choisie jusqu’au moment où on l’abandonne [53].

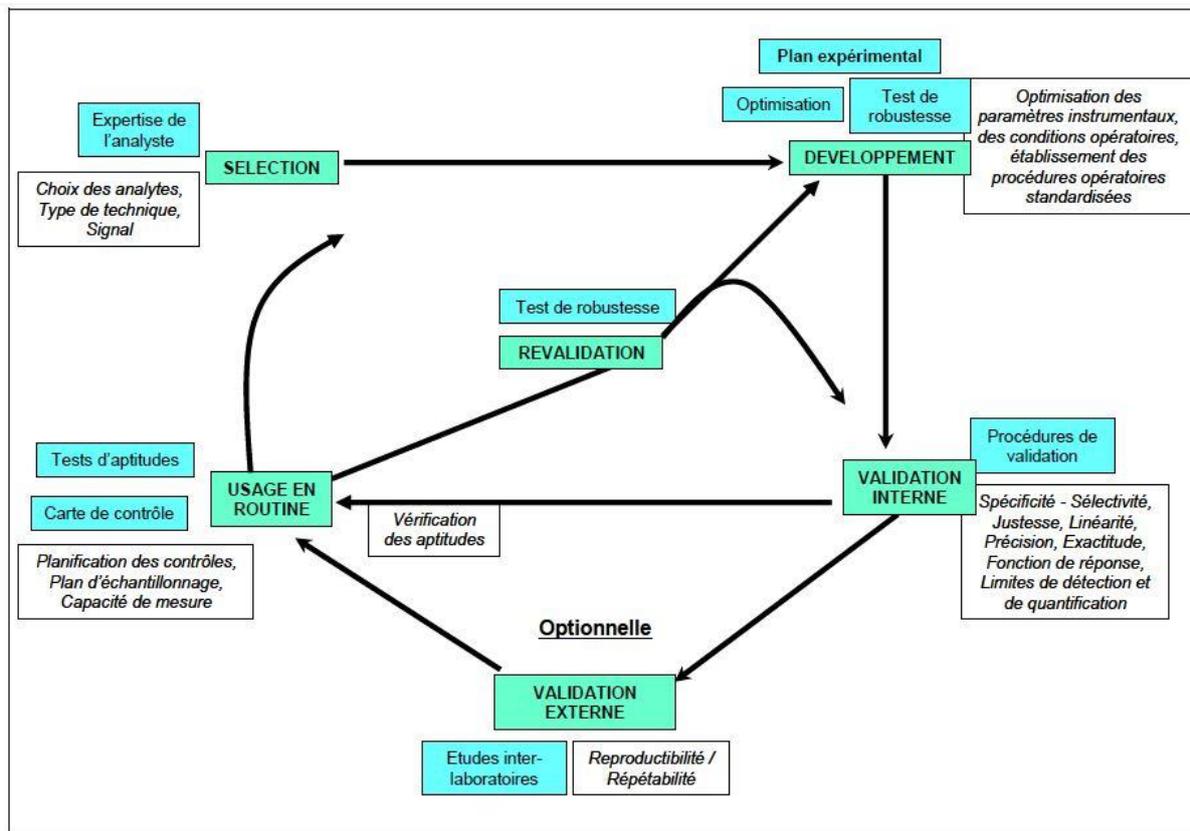


Figure 10 : Cycle de vie d'une méthode analytique [53].

Les principales étapes de ce cycle sont les suivantes :

- Etape préliminaire (étape « 0 ») : expression du déploiement et de la mise en œuvre d'une méthode pour un client/prescripteur et/ou pour un usage spécifié sous la forme d'un cahier des charges ;
- Etape 1 : phase de sélection des outils, des analytes, ... ;
- Etape 2 : phase de développement / optimisation de la méthode (en l'absence de méthode préexistante pour le domaine d'application considéré) ;
- Etape 3 : caractérisation intra-laboratoire et, au besoin, inter-laboratoires, de la méthode ;
- Etape 4 : validation de la méthode développée au regard de l'usage attendu.

À l'issue de ces étapes, l'utilisation en routine de la méthode peut être envisagée (étape 5). La revue périodique de la méthode peut donner lieu à un besoin de revalidation ou d'un nouveau développement (étape 6) [58].

5. Critères de validation

Tableau III : Les principaux critères de validation [54].

Critères	Définitions		
Spécificité-sélectivité	La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents. Une procédure d'analyse est dite «spécifique» lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser.		
Linéarité	La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité en analyte dans l'échantillon.		
Fidélité	La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux :		
	<table border="1"> <tr> <td>répétabilité : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.</td> <td>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.</td> <td>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.</td> </tr> </table>	répétabilité : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais 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.
répétabilité : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais 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.	
Justesse	La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée		
Exactitude	L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée (valeur conventionnellement vraie).L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.		
Sensibilité	Une procédure est dite « sensible » si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse.		
Limite de détection	Est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.		
Limite de quantification	C'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.		
Robustesse	La robustesse est la capacité, pour une méthode, de donner des résultats proches en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de la procédure [59].		

Limite d'acceptabilité	La limite d'acceptabilité d'une méthode sert à chiffrer ses objectifs. Il s'agit d'une valeur seuil globale exprimée le plus souvent sous forme de pourcentage, fixée de préférence par l'utilisateur du résultat.
Intervalle de confiance (IC)	L'intervalle de confiance déterminé au risque α % est un intervalle de valeurs qui a $(1-\alpha)$ % de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé : par exemple, l'intervalle de confiance déterminé au risque de 5% à 95% de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé.

6. choix des critères de validation

Les critères de validation ne doivent pas être systématiquement étudiés et documentés mais l'absence d'un ou plusieurs critères doit être justifiée dans le rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse [58].

Tableau IV : Critères de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives [58].

Étape du processus de validation	Critères	Critères de performance		
		Qualitative	Quantitative	
Caractérisation Intra labo	Spécificité	X	X	
	Sensibilité	X	(X) ¹	
	Fonction d'étalonnage		X	
	Fidélité	Répétabilité	(X)	X
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse	sans objet ²	X	
	Exactitude (justesse + fidélité) ³	sans objet	X	
	Linéarité	sans objet	X	
	Limite de quantification	détection	sans objet	X
			X	(X)
	Domaine de validité	X	X	
Caractérisation interlaboratoires	Reproductibilité	X	X	
	Répétabilité	(X)	X	
	LD	(X)	sans objet	
	LQ	sans objet	(X)	
	Spécificité ⁴	X	sans objet	
	Sensibilité ⁵	X	sans objet	
	Autres caractéristiques non techniques à définir selon les points critiques et le cahier des charges (délai, rapidité, efficacité, coût...)	X	X	

¹ Les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées

² Sans objet : caractéristique non pertinente

³ Pour les méthodes analytiques quantitatives, l'exactitude représente toujours la combinaison de la justesse et de la fidélité

⁴ ou taux de faux positifs dans certains référentiels

⁵ ou taux de faux négatifs dans certains référentiels

7. Choix du protocole de validation

Le logigramme de la figure 11 présente la démarche proposée dans le guide SFSTP pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve [54].

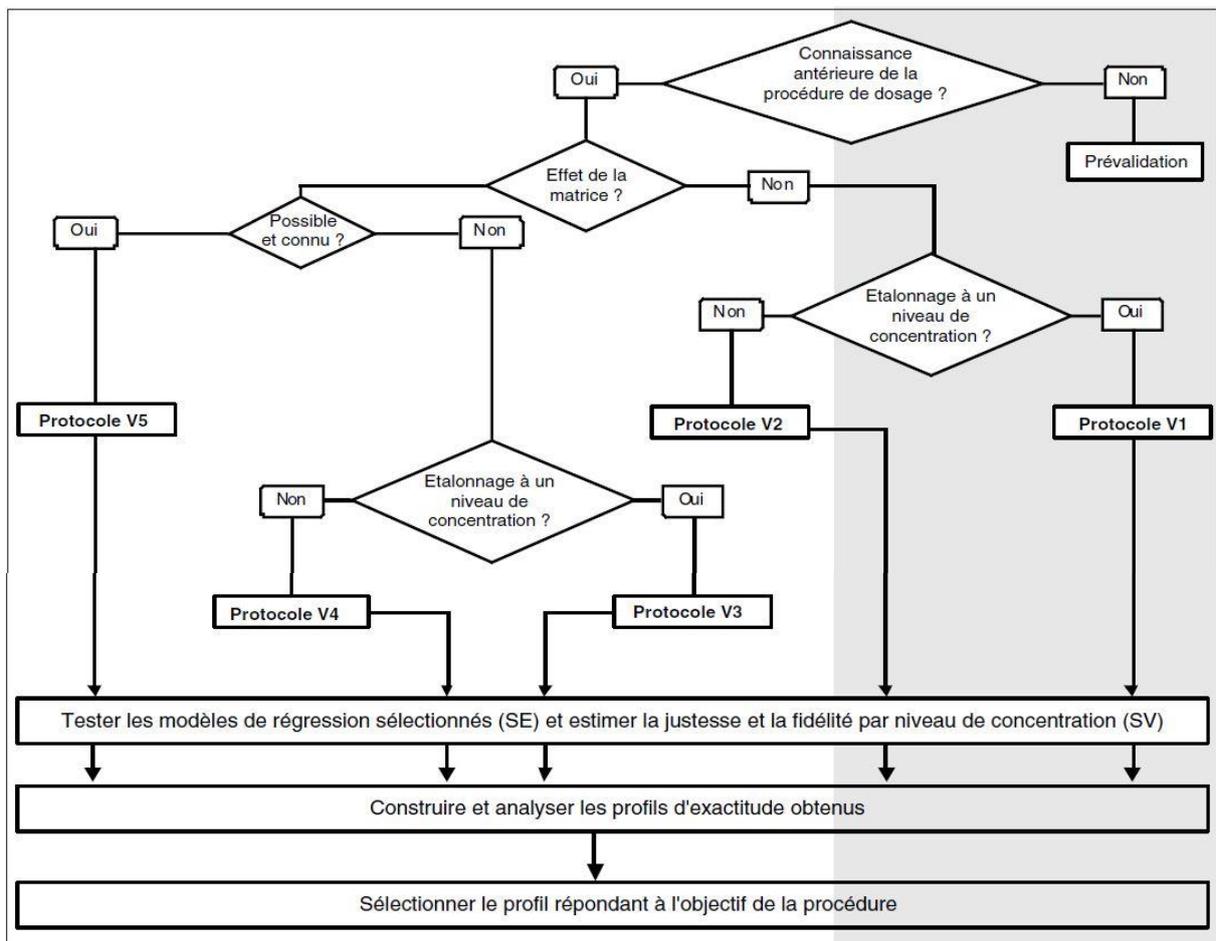


Figure 11 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation [54].

Le tableau suivant présente selon le protocole choisi, le nombre total minimal d'essai à réaliser pour valider la procédure analytique concernée :

Tableau V : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi [54].

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage Sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	
	Haut	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	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
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min.)		33	45	39	63	45

8. Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude

1. Disposer du mode opératoire et définir le mesurande ;
2. Définir le domaine de validation (gamme de concentrations) et l'objectif attendu de la méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité ;
3. Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues ;
4. Choisir un plan d'expérience de validation ;
5. Pour les méthodes indirectes, choisir un plan d'expérience d'étalonnage ;
6. Collecter les données ;
7. Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse ;
8. Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées : principalement les écarts-types de fidélité, de fidélité intermédiaire et des biais de justesse ;
9. Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude ;
10. Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non [53].

¹ 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.

² Sélection d'un niveau de concentration supérieure à la concentration cible pour l'étalonnage (exemple : 120% de la concentration cible).

³ Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe (exemple : fonction logistique à quatre paramètres).

9. Démarches statistiques de la validation

9.1. Spécificité

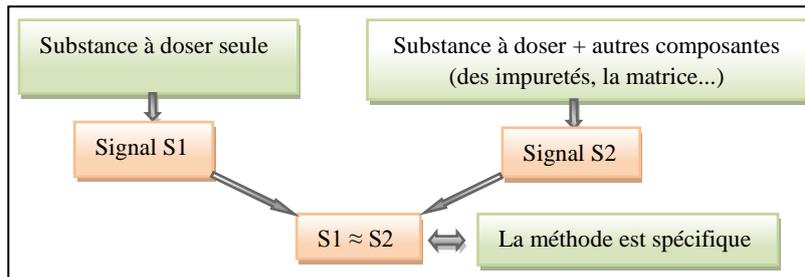


Figure 12 : schéma explicatif de la spécificité [60].

La spécificité peut être démontrée par deux façons :

- Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des quatre solutions suivantes :
 - le diluant - une solution standard à 100% préparée dans le diluant.
 - la matrice - une solution échantillon à 100% préparée dans la matrice.

Les chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard 100% et l'échantillon 100% doivent renfermer des pics au même temps de rétention et avec des surfaces comparables et les chromatogrammes obtenus à partir du diluant et de la matrice ne doivent pas présenter un pic au même temps de rétention que l'analyte.

- Soit par comparaison de la droite obtenue avec les standards de validation (avec matrice) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage (sans matrice).

La comparaison des droites est basée sur le test *t* de student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et ou d'erreur systémique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage de la substance seule et avec matrice [61].

9.2 Fonction de réponse

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:

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

Où ε est 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. Deux familles de fonctions se dégagent de

cet ensemble : les fonctions dites linéaires en leurs paramètres et les fonctions non linéaires. Une fonction est dite linéaire si elle est une combinaison linéaire de ses paramètres. On peut noter que la fonction quadratique, bien que sa représentation graphique ne soit pas droite, est effectivement linéaire en ses paramètres. Si ce n'est pas le cas, comme dans le cas des fonctions logistiques, la fonction est dite non linéaire en ses paramètres. La façon d'ajuster ces fonctions de réponse dépend de cette distinction. Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré au tableau VI. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bio analytique, immuno-dosage, etc) [61].

Tableau VI : Exemples de fonction de réponses [61].

Type	Equation	Paramètres	Linéaire
Droite passant par l'origine	$y = \beta x$	β	oui
Droite	$y = \alpha + \beta x$	α, β	oui
Fonction quadratique	$y = \alpha + \beta x + \gamma x^2$	α, β, γ	oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	non
Fonction logistique à 5 paramètres	$y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\beta\right]^\psi}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \psi$	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.

Dans le cas d'un immuno-dosage, le choix se portera sur les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres.

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 [61].

9.3 Alignements des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de 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 fonctions de réponses obtenues avec les standards d'étalonnage [61]

Ainsi l'alignement des n_{ij} répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit :

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

Tableau VII : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses [61].

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

9.4 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 alors mieux les aligner comme décrit dans la section précédente. [61].

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit (tableau VIII).

Tableau VIII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses [61].

Fonction de réponse	Concentration calculée
Droite passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left[\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}} - 1 \right]^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

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 IX).

Tableau IX : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée [61].

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

9.5 Calcul de la justesse et de la fidélité

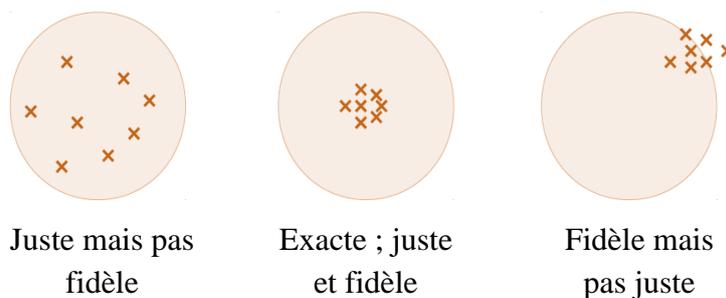


Figure 13 : représentation schématique des notions de justesse et de fidélité [62].

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 :

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

Où

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 [61].

$$\hat{\mu}_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk,calc}$$

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

$$MSE_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij} - p} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{ij,calc})^2$$

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) :

Si $MSE_j < MSM_j$ alors :

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

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

Sinon :

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

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

9.5.2 Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées [61]. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit:

$$\begin{aligned} \text{biais}_j &= \hat{\mu}_j - \bar{x}_{.j} \\ \text{biais}(\%)_j &= 100 \times \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_{.j}}{\bar{x}_{.j}} \\ \text{Recouvrement}(\%)_j &= 100 \times \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_{.j}} \end{aligned}$$

\bar{x}_j : Moyenne des concentrations introduites.

$\bar{\mu}_j$: Moyenne des concentrations prédites.

9.5.3 Fidélité

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 [61] :

Répétabilité : $\hat{\sigma}_{Re,j}^2 = \hat{\sigma}_{w,j}^2$

Fidélité intermédiaire : $\hat{\sigma}_{IP,j}^2 = \hat{\sigma}_{w,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$

9.6 Calcul de l'exactitude

L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui de la méthode analytique) exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure:

$$\text{Exactitude} = X - \mu$$

Avec :

X : concentration prédite

μ : concentration introduite

Pour chaque modèle et chaque observation l'exactitude de la mesure en valeur relative est

donnée comme suit :

$$\text{Exactitude}(\%) = \frac{(X - \mu)}{\mu} 100$$

L'erreur maximale relative, observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries, montre déjà l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats [61].

9.7. Erreur totale et profil d'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 :

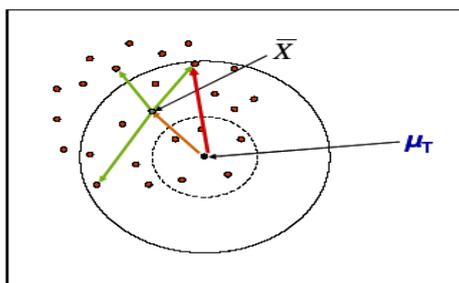
$$X = \mu + |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}}$$

$$X - \mu = |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}}$$

$$X - \mu = \text{Erreur totale}_{\text{procédure}}$$

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 [61].

Pour mieux comprendre et différencier entre la justesse, la fidélité et l'exactitude ; il faut bien différencier les erreurs ; l'erreur systématique qui représente la justesse et l'erreur aléatoire qui représente la fidélité. La somme de ces deux critères de performance d'une méthode d'analyse nous renseigne sur la qualité d'un résultat de mesure à travers cette erreur totale ou dite globale qui représente l'exactitude de mesure [63].



- \bar{X} est la moyenne des résultats (points rouges).
- μ_T est la vraie valeur.
- Flèche orange: Erreur systématique ou biais.
- Flèche verte : erreur aléatoire ou écart type.
- Flèche rouge : erreur totale.

Figure 14 : Représentation schématique des composantes de l'erreur [63].

Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse et de la fidélité.

Il est normal que l'erreur maximale observée sur un grand nombre d'observations soit sensiblement plus grande que l'erreur totale, vu que ces erreurs maximales représentent des événements rares tandis que l'erreur totale reflète plutôt les plus grandes erreurs auxquelles on peut s'attendre dans la plupart des cas. L'erreur totale d'une procédure analytique est donc bien un bon indicateur de l'exactitude des résultats qu'elle produit [61].

9.8. Calcul de l'intervalle de tolérance

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats obtenus que nous obtenions 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.

L'estimation des paramètres μ_j , $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{W,j}^2$ à chaque niveau de concentration j a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observation dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$, c'est-à-dire :

$$E_{\hat{\mu}, \hat{\sigma}}\{P [|X - \mu_T| < \lambda] \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M\} \geq \beta$$

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation. Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue:

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{P_X[\hat{\mu}_M - K\hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + K\hat{\sigma}_M | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M]\} = \beta$$

Où
$$\hat{\sigma}_{F.I.j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2 ;$$

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{W,j}^2} ;$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}} ;$$

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{pn}} ;$$

$Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$ est le quantile β de la distribution t de Student à v degrés de liberté.

Le même intervalle en échelle relative devient :

$$\left[\text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{F.I.j}} ; \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{F.I.j}} \right]$$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés.

La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclut dans les limites $[-\gamma, \gamma]$ définies a priori en fonction des objectifs de la méthode [61].

9.9. Profil d'exactitude et décision

9.9.1. Calcul

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

$$L_j(\text{borne supérieure}) = \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{F.I.j}}$$

$$U_j(\text{borne inférieure}) = \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{F.I.j}}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$) [61].

9.9.2. Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vu que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation retenues pour cet exemple. 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 ne renseigne pas sur la qualité des résultats.

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 [61].

9.10. Linéarité

La linéarité de la méthode de dosage est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation. La linéarité est, dans un premier temps, évaluée par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales Y en fonction des concentrations introduites X selon la fonction $[Y = f(X)]$, pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les standards d'étalonnage. Dans un deuxième temps, la linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées Z et les concentrations introduites X est évaluée en représentant graphiquement la fonction $[Z = f(X)]$ pour les trois séries de validation conjointement. Une analyse statistique de la droite obtenue est effectuée, la pente est comparée à la valeur de référence 1, l'ordonnée à l'origine est comparée à la valeur de référence 0, et la vérification de l'ajustement est effectuée [64, 65].

9.11. Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles des mesures attendues, permet donc, de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure 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 (LQ_{inf}) et haute (LQ_{sup}) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie [61].



PARTIE PRATIQUE



**MATRIELS ET
METHODES**

La tyrosine est l'acide aminé responsable de la Tyrosinémie qui est une maladie métabolique dont le diagnostic précoce permet d'éviter des séquelles très graves chez les enfants atteints.

C'est ce qui nous a inspiré pour développer et valider une méthode de dosage de cet aa par chromatographie liquide à haute performance HPLC dans le sérum humain et contribuer au diagnostic néonatal.

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Chimie analytique du Département de Pharmacie de Tizi-Ouzou, en se référant aux directives de la commission de la société française des sciences techniques et pharmaceutiques (SFSTP) publiées dans la revue STP pharma pratique en janvier 2006.

1. Matériels

1.1. Verreries, consommables et autres

Tableau X : Matériels utilisés dans notre travail

Verreries	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettes jaugées de 1ml, 2ml, 5ml, 10ml; • Pipettes graduées de 2ml et 20ml ; • Fioles de 20ml, 50ml, 250ml, 500ml et 1l ; • Bêchers ; • Eprouvette de 10ml ; • Verres de montre ; • Entonnoirs ; • Erlenmeyer de 1000ml ; • Vials.
Consommables	<ul style="list-style-type: none"> • Tubes à essai; • Embouts bleus et jaunes ; • Papiers filtre millipores ; • Gants ; • Bavettes.
Autres	<ul style="list-style-type: none"> • Poire ; • Pissettes ; • Spatules ; • Portoirs ; • Comptes gouttes ; • Micropipettes de 1000μl, 200 μl, 100μl ,50μl ; • Barreaux magnétiques ; • Masques ; • Lunettes.

1.2. Matières premières

Tableau XI : Matières premières utilisées dans notre travail.

Matières premières	Provenance	Données physicochimiques
L-Tyrosine	BIOCHEM Chemopharma	N° CAS : 60-18-4 Formule brute : $C_9H_{11}NO_3$ Mr : 181.19 g/mol Pureté : $\geq 98.5\%$
N –méthylphénylalanine hydrochloride	SIGMA-ALDRICH	N° CAS : 66866, Formule brute : $C_{19}H_{13}NO_2$ Mr : 215.68 g/mol Pureté : $\geq 98\%$

1.3. Réactifs

Tableau XII : Réactifs utilisés dans notre travail.

Les réactifs	Provenance	Données physicochimiques
Phosphate de potassium monobasique	SIGMA ALDRICH	N° CAS : 7778-77-0 Formule brute: KH_2PO_4 Mr : 136.09 g/mol Pureté : $> 99\%$
Acide trichloracétique	SIGMA ALDRICH	N° CAS : 76-03-9 Formule brute: $C_2HCl_3O_2$ Mr : 163.39 g/mol Pureté : $> 99\%$
Acide chlorhydrique	SIGMA ALDRICH	N° CAS : 7647-01-0 Formule brute : HCl Mr : 36,46 g/mol ρ : 1,19 g / cm ⁻³

Méthanol grade HPLC	BIOCHEM Chemopharma	N° CAS : 67-56-1 Formule brute : CH ₄ O Mr : 32,04 g/mol ρ : 0,79 g / cm ⁻³
Acétonitrile grade HPLC	BIOCHEM Chemopharma	N° CAS : 75-05-8 Formule brute : C ₂ H ₃ N Mr : 41,05 g/mol ρ : 0,8g / cm ⁻³
Eau purifiée	Préparée avec le purificateur OSMOSEURMINI OP 100	N° CAS : 7732-18-5 Formule brute : H ₂ O Mr : 18 g/mol ρ : 1 g / cm ⁻³

1.4. Appareillage

Tableau XIII : Appareillages utilisés dans notre travail.

Désignation	Spécification		Usage
HPLC (SHIMADZU LC20)	Pompe	Lc20 at	Séparation et dosage
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	Supelco C8 (15cm)	
	Détecteur	Fluorimètre	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Purificateur	OSMOSEUR MINI OP 100		Production de l'eau purifiée
Pompe à vide	Fisher bioblock scientific Pmax = 4 bar		Filtration de la phase mobile
Sonicateur	Advantage-Lab		Solubilisation
Agitateurs magnétique	NAHITA Model 690-1		Homogénéisation des solutions
Balances analytiques	KERN ALT 220-5 DAM		Pesée
Centrifugeuse	Hettich-EBA20		Centrifuger
Vortex	IKA MS3 digital		Agitation des échantillons
Etuve	MEMMERT		Séchage de la verrerie

2. Méthodes

2.1. Optimisation de la méthode

C'est une méthode adoptée à partir des travaux publiés par NEURAUTER G. et al, et elle n'est appliquée qu'après de nombreuses modifications et optimisations pour l'adapter à nos conditions de travail.

Par rapport à la méthode d'origine, la plupart des mesures et des concentrations utilisées ont été carrément changées, ainsi que toutes les étapes de préparation et de dilution des échantillons avec un changement remarquable des conditions chromatographiques en termes de colonne utilisée, de débit et de volume d'injection en gardant juste les longueurs d'onde et la composition de la phase mobile.

Cette méthode modifiée a été essayée pour doser la Phénylalanine et la Tyrosine dans le cadre d'un mémoire de fin d'étude durant l'année 2016/1017, et elle s'est révélée valide pour la Phénylalanine et non pas pour la Tyrosine. C'est pour cela que des améliorations ont été apportées par ce présent travail afin de la valider pour la Tyrosine et d'élargir son intervalle de dosage.

Nous avons surtout amélioré la méthodologie du protocole opératoire en terme de matériel de mesure utilisé et aussi nous avons essayé d'élargir l'intervalle de concentration à valider en allant jusqu'à 200 $\mu\text{mol/L}$, ainsi le protocole de validation a été changé en appliquant le protocole V2 qui est le plus facile (après qu'on a démontré l'absence de l'effet matrice). Enfin, une matrice qui ne contient pas au préalable une quantité biologique de Tyrosine a été utilisée.

Ses améliorations ont porté un résultat très satisfaisant, ce qui nous a permis de valider la méthode de dosage pour la Tyrosine avec un intervalle de validation bien acceptable.

Avant l'application du protocole de validation, et en essayant des valeurs différentes, nous avons optimisé plusieurs paramètres :

- ✓ Le niveau de concentration maximal qu'on peut atteindre (200 $\mu\text{mol/L}$)
- ✓ La dilution finale de l'échantillon (1/9)
- ✓ Le volume d'injection (10 μL)
- ✓ Le type de la colonne (C8, 15cm)
- ✓ Le débit de la phase mobile (0.8ml)

2.2. Principe de la méthode

La méthode consiste à doser la Tyr par HPLC et la quantifier par un détecteur fluorimétrique en présence d'un étalon interne la N- méthyl L-phénylalanine hydrochloride (utilisé pour pallier aux erreurs de la dilution).

La technique met à profit la capacité des acides aminés aromatiques (Tyr) à absorber à une longueur d'onde de 210nm et à émettre une fluorescence à une longueur d'onde de 302nm.

2.3. Choix des paramètres de validation

2.3.1. Le choix du plan d'expérience

Afin de valider la technique de dosage de Tyr par HPLC nous avons suivi le logigramme de la SFSTP qui permet de sélectionner un protocole de validation (Figure 11, Tableau V), sachant que la procédure de dosage est connue ultérieurement, (absence d'un effet matrice et l'étalonnage ne se fait pas à un niveau de concentration) nous avons opté pour le protocole V2 modifié (avec cinq niveaux de concentration) proposé par la SFSTP 2006.

Ce protocole exige trois jours de validation (3 séries), chaque jour comporte :

- Un standard d'étalonnage (SE), avec deux répétitions (R).
- Un standard de validation (SV) avec trois répétitions.

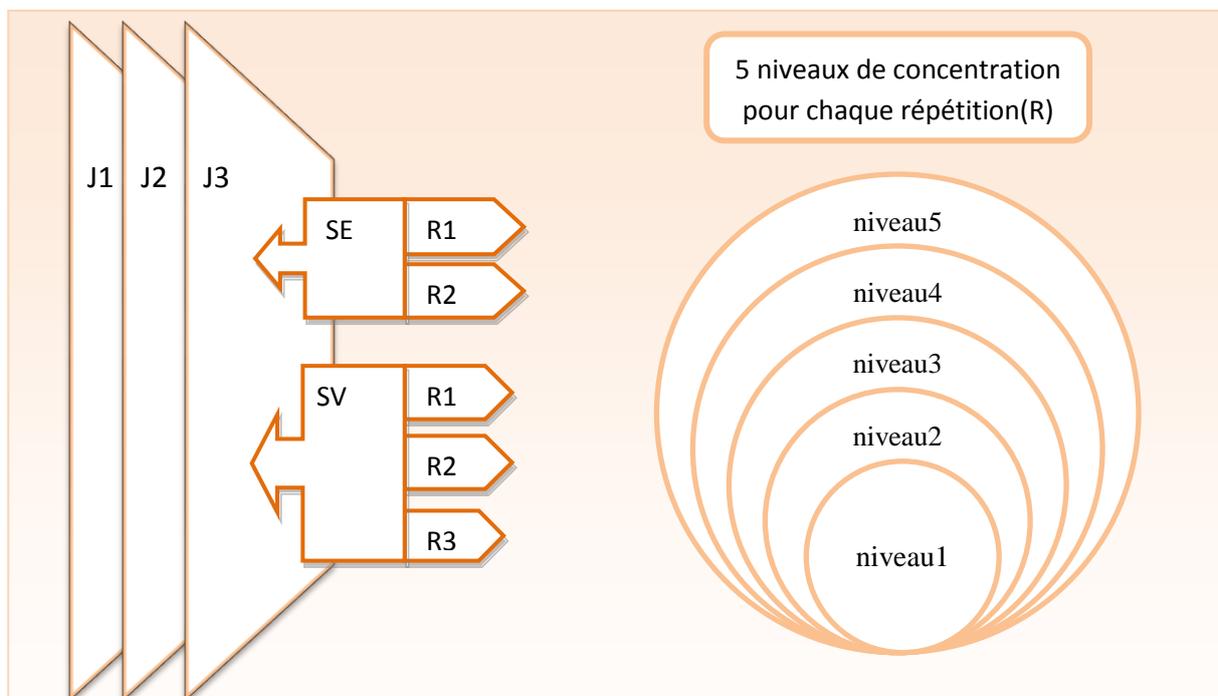


Figure 15 : Plan d'expérience de la validation.

Le nombre d'essais obtenus est égale à :

- Standards d'étalonnage : 3(séries) x 2(répétitions) x 5(niveaux) = 30 essais.
- Standards de validation : 3(séries) x 3(répétitions) x 5(niveaux) = 45 essais.

2.3.2. Le choix des niveaux de concentration

Le choix des niveaux de concentrations de la Tyr est fait de sorte que la gamme des concentrations puisse couvrir les valeurs physiologiques et pathologiques de la Tyr dans le plasma (les valeurs physiologiques de la tyr : 30-120 μ mol/l).

Les niveaux de concentrations choisis pour la Tyr sont 10, 50, 100,150, 200 μ mol/l dans l'échantillon.

2.3.3. Le choix des limites d'acceptabilité

Pour le dosage en milieux biologiques, et à partir des propositions données par la SFSTP, la limite d'acceptabilité λ est fixée à 15%. Nous voulons que 85% des futures mesures soient à l'intérieur de ces limites ($\beta=85\%$) avec un risque α de 15%.

2.4. Préparation des solutions

2.4.1. Préparation de la phase mobile (solution de KH_2PO_4 0.015M)

Dans un verre de montre peser 2.04g de KH_2PO_4 puis les verser dans une fiole de 1L à l'aide d'un entonnoir, ajouter de l'eau distillée puis agiter avec l'agitateur magnétique jusqu'à dissolution totale et compléter au trait de jauge par l'eau distillée.

Avant son utilisation, la phase mobile doit être filtrée et dégazée.

2.4.2. Préparation de la solution de HCl 0.1M

A l'aide d'une éprouvette prélever 4.15 ml d' HCl pure, puis les verser dans une fiole de 500ml contenant au préalable une quantité d'eau distillée, bien agiter et enfin compléter au trait de jauge avec le même solvant.

2.4.3. Préparation de TCA (Acide trichloracétique) 0.33M

Dans un verre de montre, peser 2.72g de TCA puis les dissoudre dans une fiole de 50ml avec de l'eau distillée, agiter avec l'agitateur magnétique et compléter avec le même solvant au trait de jauge.

2.4.4. Préparation de l'étalon interne 6000 μ M

Dans une fiole de 50ml peser 64.8mg de EI, ajouter l'eau distillée, le dissoudre au sonicateur pendant 4min, compléter avec le même solvant au trait de jauge.

2.4.5. Préparation de la matrice

Reconstitution de sérum bovin lyophilisé de calibration par le diluant pour avoir une matrice assimilable au sérum humain.

2.5. Mode opératoire

Il comporte plusieurs étapes résumées comme suit :

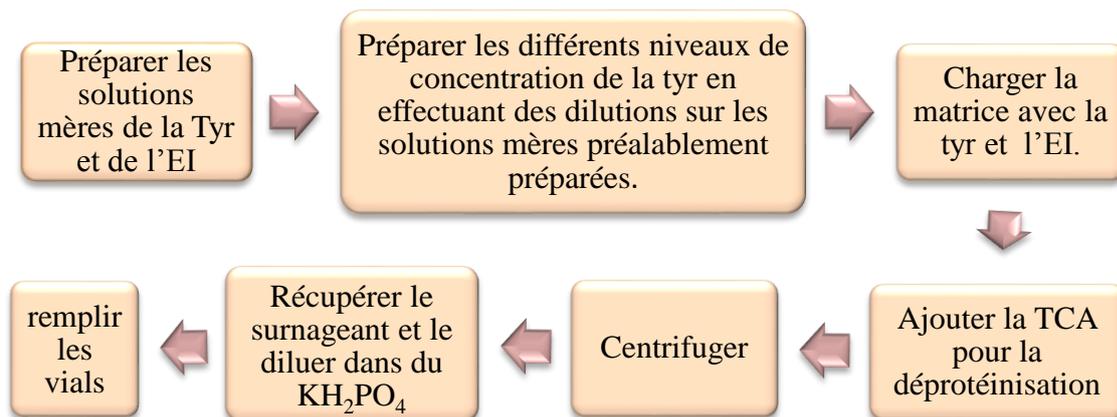


Figure 16: Mode opératoire de la validation.

2.5.1. Première étape : préparation de la solution mère Tyr à 1mmol/l

Dans une fiole de 50ml peser 9.055 mg de Tyr, compléter au trait de jauge avec HCl à 0.1M, dissoudre au sonicateur pendant 4min.

Chaque jour, cinq solutions mères de Tyr sont préparées : deux pour les standards d'étalonnage et trois pour les standards de validation.

2.5.2. Deuxième étape : dilution des solutions mères

La gamme de concentration est obtenue par dilution des solutions mères

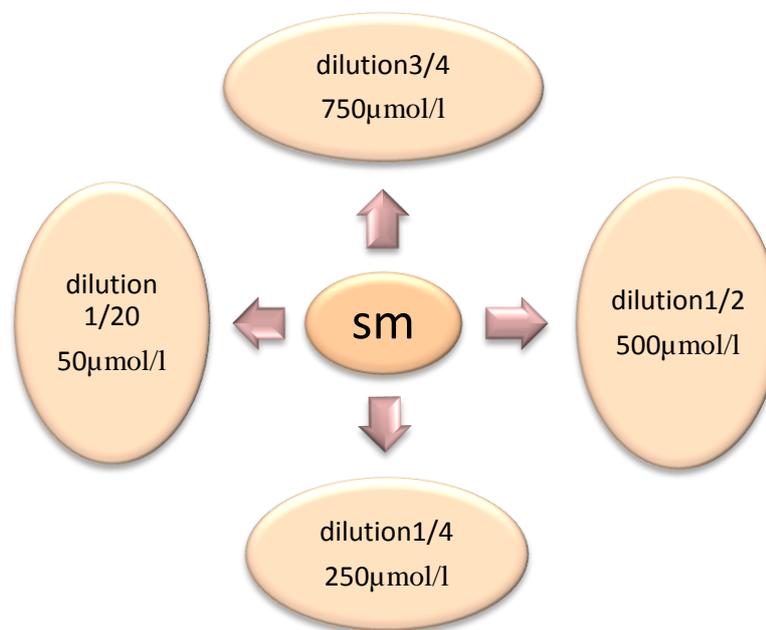


Figure 17 : Dilution de la solution mère de tyrosine.

Pour chaque solution mère quatre dilutions sont effectuées

• Dilution 3/4

Prélever 15ml de la solution mère à l'aide d'une pipette de 20ml, les verser dans une fiole de 20ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

• Dilution 1/2

Prélever 10ml de la solution mère à l'aide d'une pipette de 10ml, les verser dans une fiole de 20ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

• Dilution 1/4

Prélever 5ml de la solution mère à l'aide d'une pipette de 5ml, les verser dans une fiole de 20ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

• Dilution 1/20

Prélever 1ml de la solution mère à l'aide d'une pipette de 1ml, les verser dans une fiole de 20ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

2.5.3. Troisième étape : Charger la matrice avec la tyrosine et l'étalon interne

Dans chaque tube à essai préalablement étiqueté introduire 350 μ l de sérum bovin à l'aide d'une micropipette, ajouter 50 μ l d'étalon interne, 100 μ l de solution de Tyr correspondant à chaque niveau de concentration et cela à l'aide d'une micropipette, agiter au vortex pendant 30 seconde (pour obtenir des concentrations finales de la Tyrosine dans le sérum : 10, 50, 100, 150 et 200 μ mol/L).

2.5.4. Quatrième étape : Déprotéinisation

A l'aide d'une pipette de 2 ml ajouter dans chaque tube à essai 1.5ml de TCA, notée la formation d'un précipité blanchâtre.

2.5.5. Cinquième étape : Centrifugation

Centrifuger les tubes à essai à 6000tr/min pendant 20 min.

2.5.6. Sixième étape : dilution dans du KH_2PO_4

Récupérer 250 μ l de surnageant à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai et ajouter 2ml de KH_2PO_4 0.15 mmol/l, agiter au vortex pendant 30 seconde et remplir les vials.

2.5.7. Septième étape : analyse des échantillons

Le dosage se fait par HPLC avec une détection fluorimétrique à une longueur d'onde d'excitation de $\lambda=210\text{nm}$ et une longueur d'onde d'émission de $\lambda=310\text{ nm}$, avec un volume d'injection de 10 μ l et un débit de la phase mobile de 0.8ml /min, le temps d'analyse pour chaque échantillon est de 11min.

NB : vu la complexité de matrice et l'absence de la précolonne, il est nécessaire d'effectuer entre chaque série des lavages de la colonne avec un mélange à volumes égaux d'eau et d'acétonitrile afin d'éliminer les éventuels résidus du sérum.

2.6. Conditions chromatographiques

- ✓ Phase mobile : KH_2PO_4
- ✓ Débit : 0.8ml/min
- ✓ Colonne : C8, 15cm
- ✓ Température : 30°C
- ✓ Volume d'injection : 10 μ l
- ✓ Temps d'analyse : 11min



RESULTATS

1. Chromatogrammes obtenus

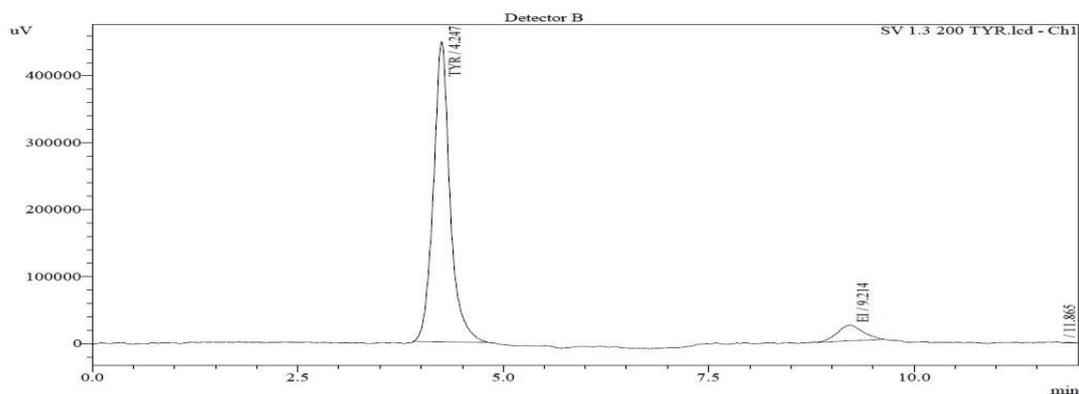


Figure 18: Exemple d'un pic chromatographique

Tableau XIV : Moyenne des temps de rétention obtenus

Composé	Moyenne des temps de rétention (min)
Tyrosine	4.230
Etalon interne	9.23

2. Informations concernant les données brutes

- ✓ Généralement lorsqu'on travaille avec un étalon interne, on construit les fonctions d'étalonnage et de validation en utilisant les rapports de concentrations (concentration introduite/concentration de l'étalon interne) comme abscisses et le rapport des réponses comme ordonnées.
- ✓ Les résultats obtenus sont multipliés fois la concentration de l'EI (supposée constante et égale à **600.45** $\mu\text{mol/l}$) pour avoir la concentration de l'échantillon, ici et pour des raisons de simplification et plus de clarté concernant les niveaux de concentrations utilisés, nous avons travaillé directement avec les concentrations aux axes des abscisses.

3. Spécificité et effet matrice

L'étude statistique de la spécificité et d'effet matrice est réalisée sur les standards d'étalonnage sans matrice et les standards de validation (avec matrice) et les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XV : résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage sans matrice de la Tyrosine

Niveaux	1 ^{ère} répétitions de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (µmol /l)	Réponses instrumentales (Yi) (Rapports)	Réponses calculées (Y*i)	$(Y_i - Y^*_i)^2$	$(X_i - X')^2$
1	1	9.99	0.60349	0.36386	0.05742062	8460.060285
	2	10.00	0.69594	0.36448	0.109870528	8458.029863
	3	10.00	0.57727	0.36448	0.0452827	8458.029863
2	1	49.95	2.64261	2.59539	0.002229823	2706.135639
	2	50.00	2.74241	2.59847	0.020716135	2700.396587
	3	50.00	2.76213	2.59847	0.026783313	2700.396587
3	1	99.90	4.58389	5.38481	0.641466643	4.297171802
	2	100.01	5.35845	5.39097	0.001057579	3.851723068
	3	100.01	5.27289	5.39097	0.013942754	3.851723068
4	1	149.84	7.99559	8.17422	0.031907977	2291.977973
	2	150.01	7.20924	8.18347	0.949116228	2307.858781
	3	150.01	7.19738	8.18347	0.972374796	2307.858781
5	1	199.79	11.19530	10.96364	0.053666414	9569.178042
	2	200.01	11.76645	10.97597	0.624871341	9612.417761
	3	200.01	11.90558	10.97597	0.864181931	9612.417761
Pente		0.05584686				
ordonnée à l'origine		-0.194022594				
Erreur pente		0.002215365				
Erreur ordonnée à l'origine		0.271421666				

Tableau XVI : résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (avec matrice) de la Tyrosine.

Niveaux	1 ^{ère} répétitions de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (umol /l)	Réponses instrumentales (Yi) (Rapports)	Réponses calculées (Y*i)	(Yi-Y*i) ²	(Xi-X') ²
1	1	10.00	0.53991	0.53336	0.0000428	8451.1282
	2	9.99	0.57553	0.53273	0.0018320	8453.1578
	3	9.99	0.50908	0.53273	0.0005592	8453.1578
2	1	50.00	2.78176	2.81702	0.0012431	2696.4975
	2	49.95	2.77891	2.81387	0.0012221	2702.2324
	3	49.95	2.79938	2.81387	0.0002098	2702.2324
3	1	100.01	5.65182	5.67160	0.0003911	3.7058215
	2	99.90	5.96279	5.66530	0.0885020	4.1429851
	3	99.90	5.99516	5.66530	0.1088076	4.1429851
4	1	150.01	8.01538	8.52617	0.2609076	2311.4660
	2	149.84	8.35141	8.51672	0.0273266	2295.5728
	3	149.84	8.13186	8.51672	0.1481143	2295.5728
5	1	200.01	11.27134	11.38075	0.0119697	9619.7782
	2	199.79	11.57011	11.36815	0.0407874	9576.5219
	3	199.79	11.78798	11.36815	0.1762586	9576.5219
Pente		0.057088378				
ordonnée à l'origine		-0.037556156				
Erreur pente		0.000982763				
Erreur ordonnée à l'origine		0.12036166				

Tableau XVII : comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine pour la Tyrosine.

Comparaison des deux pentes des deux droites de régression	t calculé	0.512	différence non significative
	t°(α ; 26)	1.483	
	Condition	t calculé < t°(α ; 26)	
Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression	t calculé	0.527	différence non significative
	t°(α ; 26)	1.483	
	Condition	t calculé < t°(α ; 26)	

4. Fonction de réponse

Pour but de choisir le modèle d'étalonnage le plus adéquat qui est capable de produire une proportion suffisante de futures mesures qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité, nous avons étudié cinq modèles reliant les rapports des surfaces des pics ($\frac{\text{aire de tyrosine}}{\text{aire de EI}}$) aux concentrations introduites.

Les tableaux suivants regroupent les résultats des calculs statistiques pour tous les modèles générés suivi par leurs courbes d'étalonnage correspondantes à chaque série.

4.1. Droite : $y = bx + a$

Tableau XVIII: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $y = bx + a$ (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		X_i ($\mu\text{mol/l}$)	Y_i	X_i ($\mu\text{mol/l}$)	Y_i	X_i ($\mu\text{mol/l}$)	Y_i
1	1	9.99	0.60349	10.00	0.69594	10.00	0.57727
	2	9.99	0.59816	9.99	0.69515	10.01	0.55752
2	1	49.95	2.64261	50.00	2.74241	50.00	2.76213
	2	49.95	2.84727	49.95	2.80987	50.06	2.87210
3	1	99.90	4.58389	100.01	5.35845	100.01	5.27289
	2	99.90	5.37814	99.90	5.14857	100.12	5.25723
4	1	149.84	7.99559	150.01	7.20924	150.01	7.19738
	2	149.84	7.71325	149.84	7.13602	150.17	7.30922
5	1	199.79	11.19530	200.01	11.76645	200.01	11.90558
	2	199.79	11.24516	199.79	11.85503	200.23	11.77672
Pente		0.055023919		Pente	0.05561187	Pente	0.0562643
Ordonnée à l'origine		-0.126268792		Ordonnée à l'origine	-0.127879294	Ordonnée à l'origine	-0.1936357

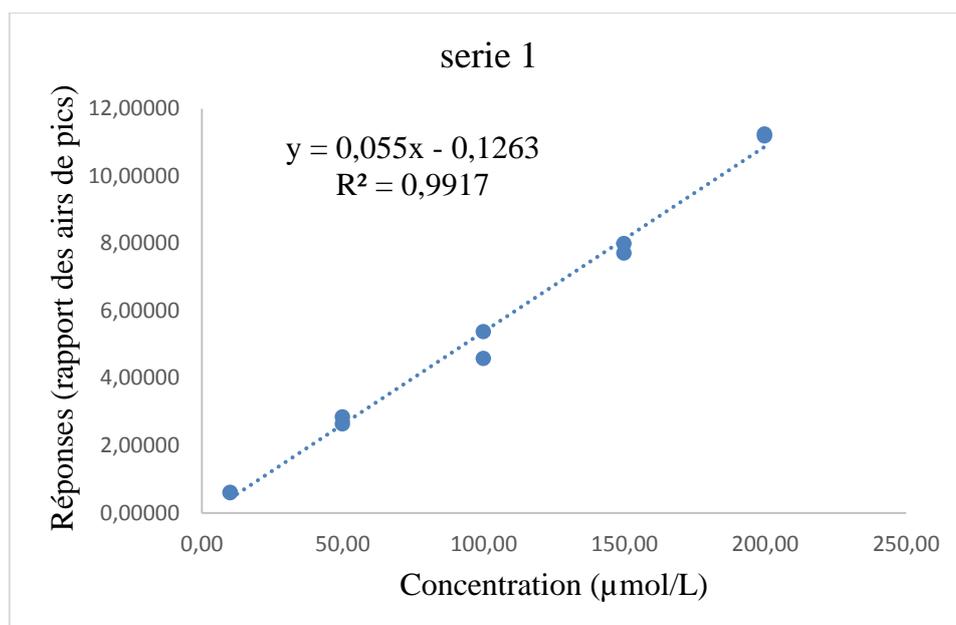


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 1)

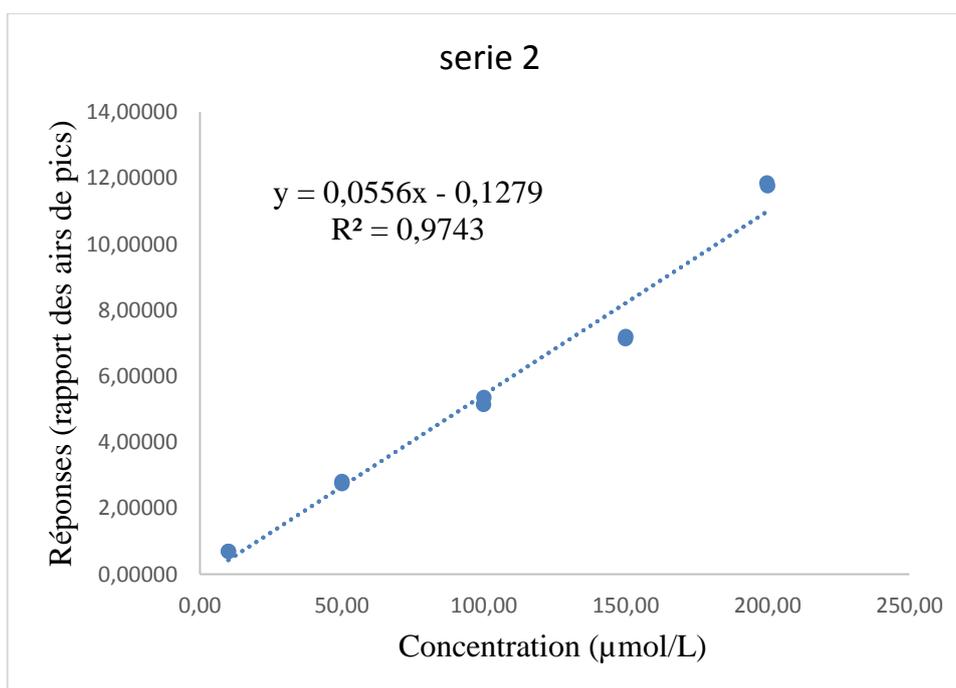


Figure 20 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 2)

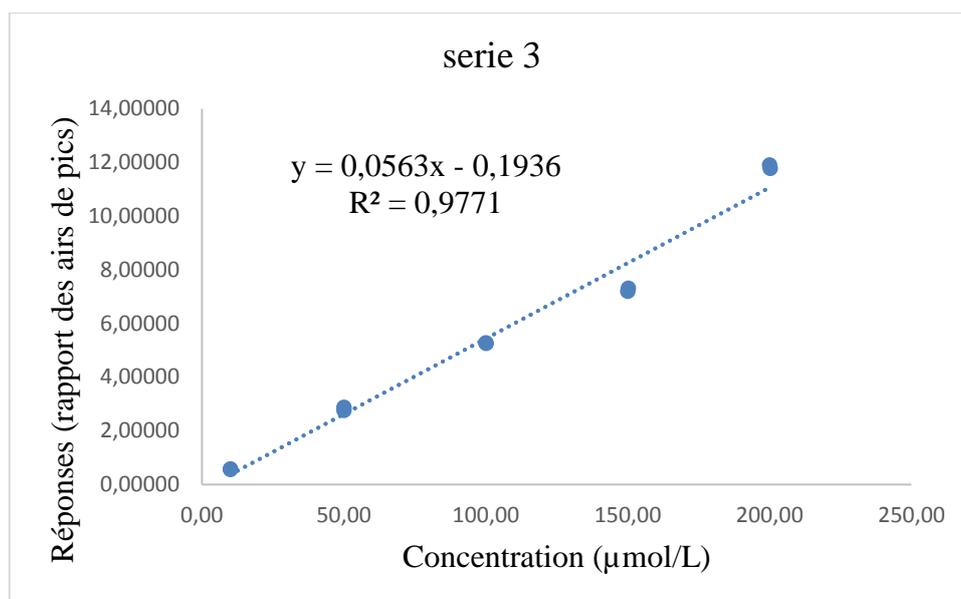


Figure 21: Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 3)

4.2. Droite passante par 0 : $y = bx$

Tableau XIX : Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $y = bx$ (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		X_i ($\mu\text{mol/l}$)	Y_i	X_i ($\mu\text{mol/l}$)	Y_i	X_i ($\mu\text{mol/l}$)	Y_i
1	1	9.99	0.60349	10.00	0.69594	10.00	0.57727
	2	9.99	0.59816	9.99	0.69515	10.01	0.55752
2	1	49.95	2.64261	50.00	2.74241	50.00	2.76213
	2	49.95	2.84727	49.95	2.80987	50.06	2.87210
3	1	99.90	4.58389	100.01	5.35845	100.01	5.27289
	2	99.90	5.37814	99.90	5.14857	100.12	5.25723
4	1	149.84	7.99559	150.01	7.20924	150.01	7.19738
	2	149.84	7.71325	149.84	7.13602	150.17	7.30922
5	1	199.79	11.19530	200.01	11.76645	200.01	11.90558
	2	199.79	11.24516	199.79	11.85503	200.23	11.77672
Pente		0.0542		Pente	0.0547	Pente	0.055
Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine	0	Ordonnée à l'origine	0

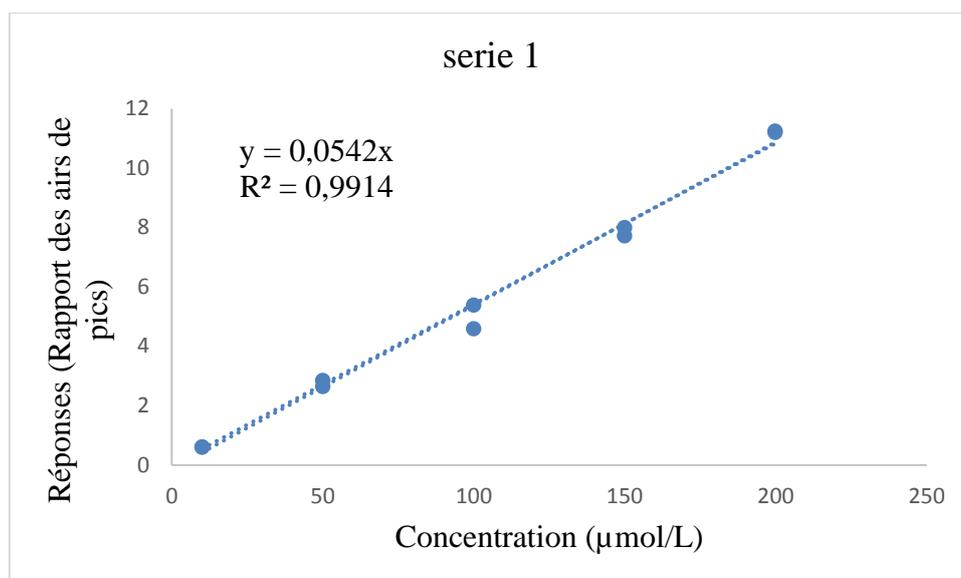


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 1)

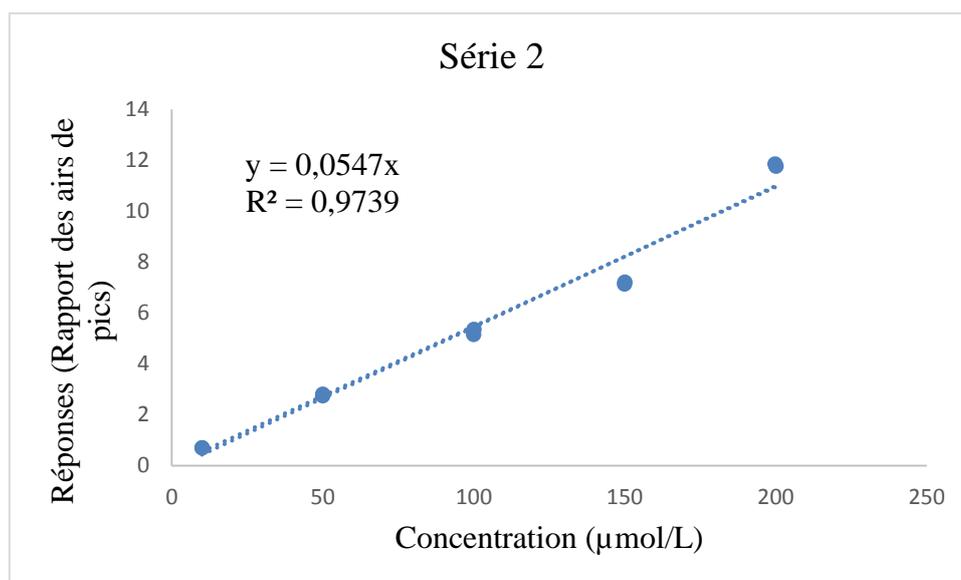
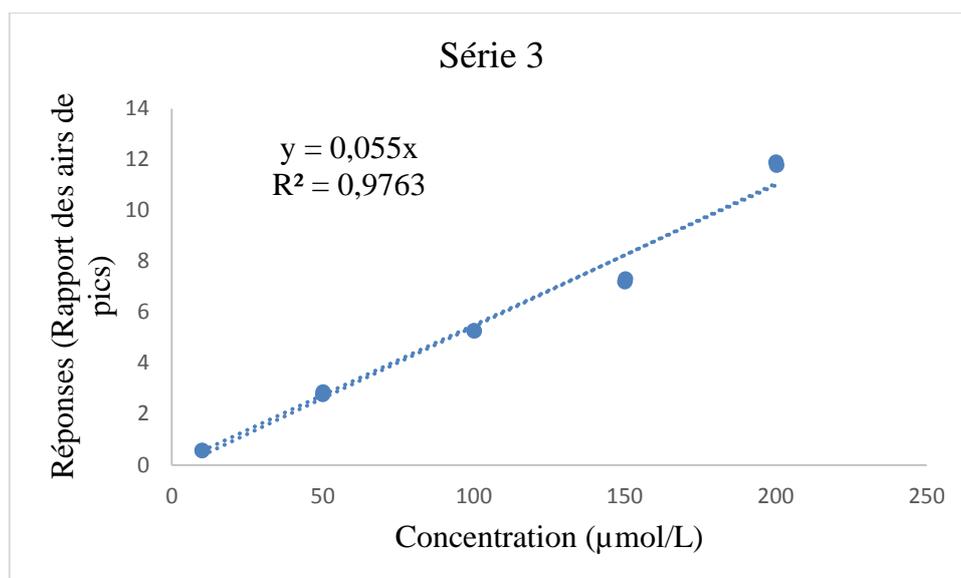


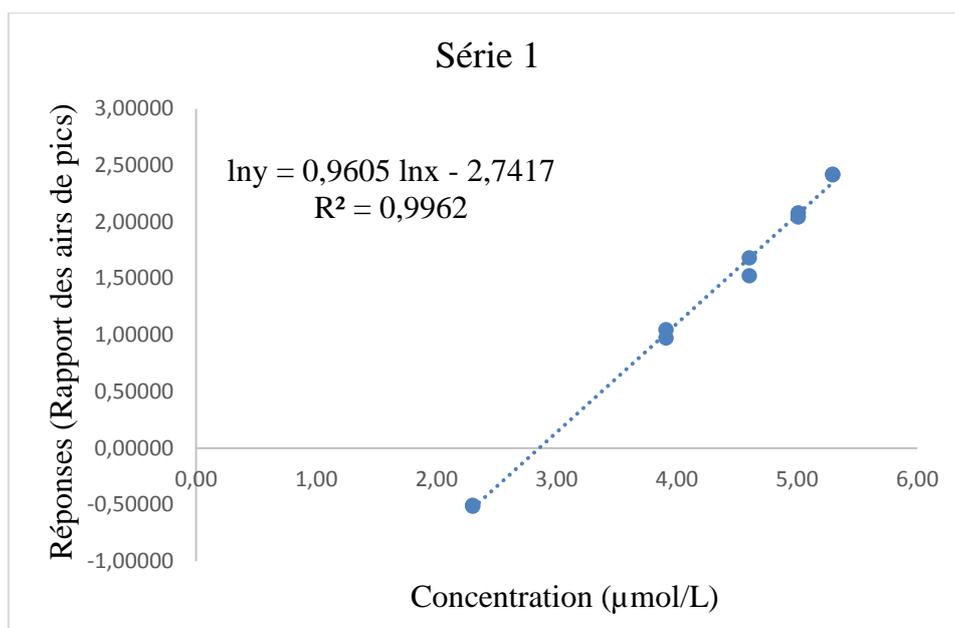
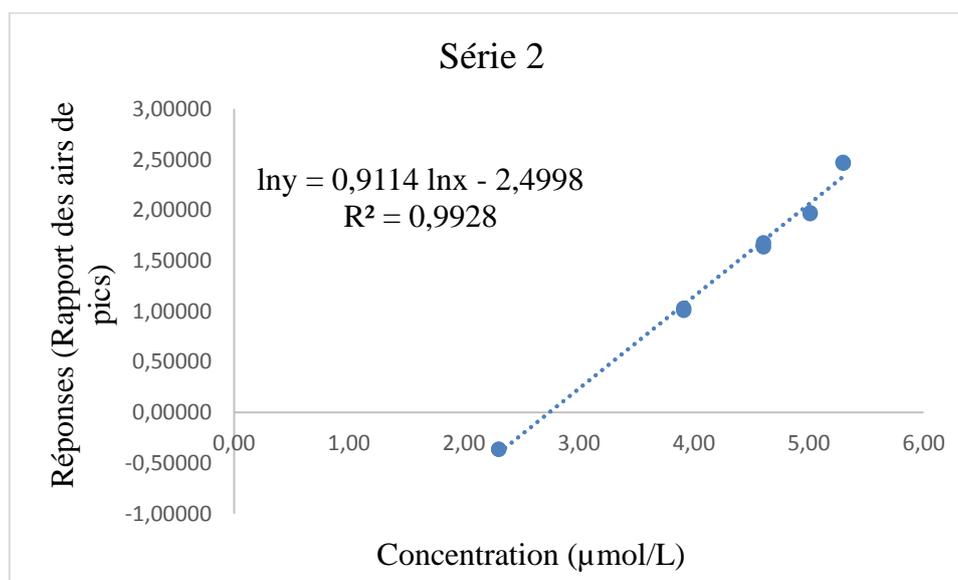
Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 2)

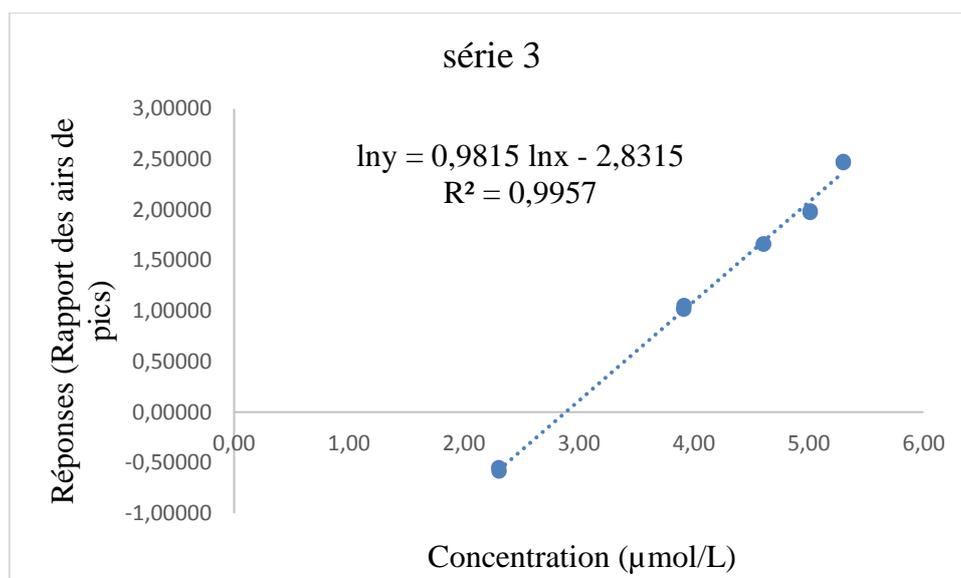
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 3)

4.3. Logarithme népérien : $\ln y = f(\ln x)$

Tableau XX : Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		$\ln X_i$	$\ln Y_i$	$\ln X_i$	$\ln Y_i$	$\ln X_i$	$\ln Y_i$				
1	1	2.30	-0.50503	2.30	-0.36249	2.30	-0.54944				
	2	2.30	-0.51390	2.30	-0.36363	2.30	-0.58426				
2	1	3.91	0.97177	3.91	1.00884	3.91	1.01600				
	2	3.91	1.04636	3.91	1.03314	3.91	1.05504				
3	1	4.60	1.52255	4.61	1.67867	4.61	1.66258				
	2	4.60	1.68234	4.60	1.63872	4.61	1.65960				
4	1	5.01	2.07889	5.01	1.97536	5.01	1.97372				
	2	5.01	2.04294	5.01	1.96516	5.01	1.98914				
5	1	5.30	2.41549	5.30	2.46525	5.30	2.47701				
	2	5.30	2.41994	5.30	2.47275	5.30	2.46612				
Pente		0.9605069		Pente		0.9114279		Pente		0.9814742	
Ordonnée à l'origine		-2.7417161		Ordonnée à l'origine		-2.4998321		Ordonnée à l'origine		-2.8315045	

Figure 25: Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 1)Figure 26: Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 2)

Figure 27: Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 3)

4.4. Racine carrée : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Tableau XXI : Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$	$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$	$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$
1	1	3.16	0.77684	3.16	0.83423	3.16	0.75979
	2	3.16	0.77341	3.16	0.83376	3.16	0.74667
2	1	7.07	1.62561	7.07	1.65602	7.07	1.66197
	2	7.07	1.68738	7.07	1.67627	7.08	1.69473
3	1	9.99	2.14100	10.00	2.31483	10.00	2.29628
	2	9.99	2.31908	9.99	2.26905	10.01	2.29286
4	1	12.24	2.82765	12.25	2.68500	12.25	2.68279
	2	12.24	2.77727	12.24	2.67133	12.25	2.70356
5	1	14.13	3.34594	14.14	3.43023	14.14	3.45045
	2	14.13	3.35338	14.13	3.44311	14.15	3.43172
Pente		0.230322		Pente	0.2264469	Pente	0.2334562
Ordonnée à l'origine		0.016226		Ordonnée à l'origine	0.0703841	Ordonnée à l'origine	-0.0054618

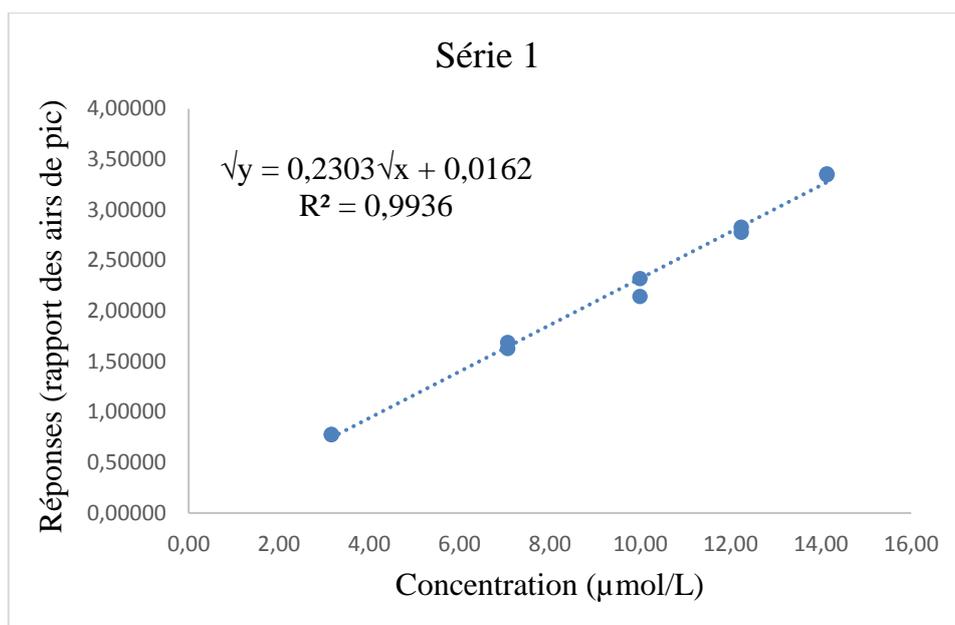


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série1)

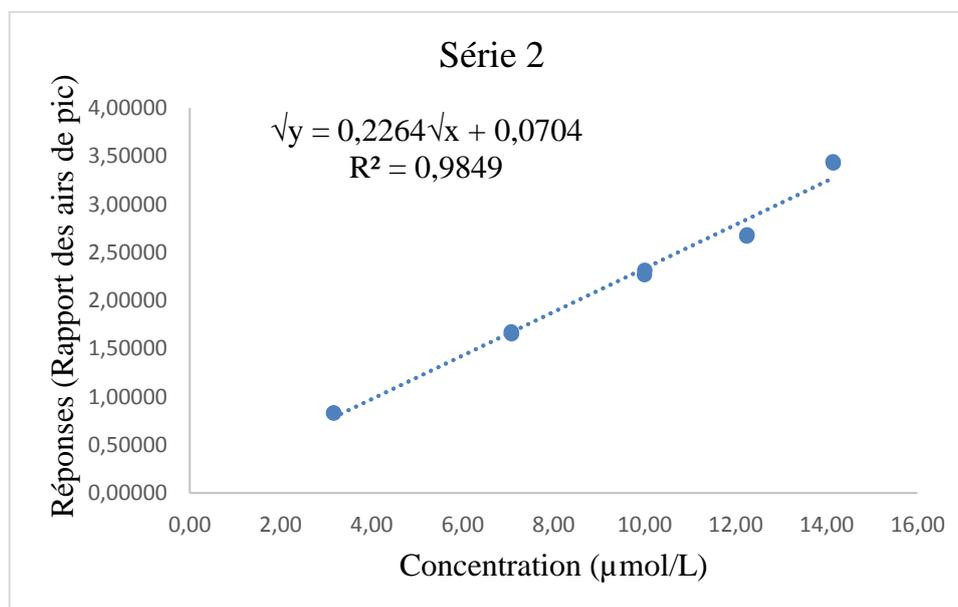


Figure 29 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série2)

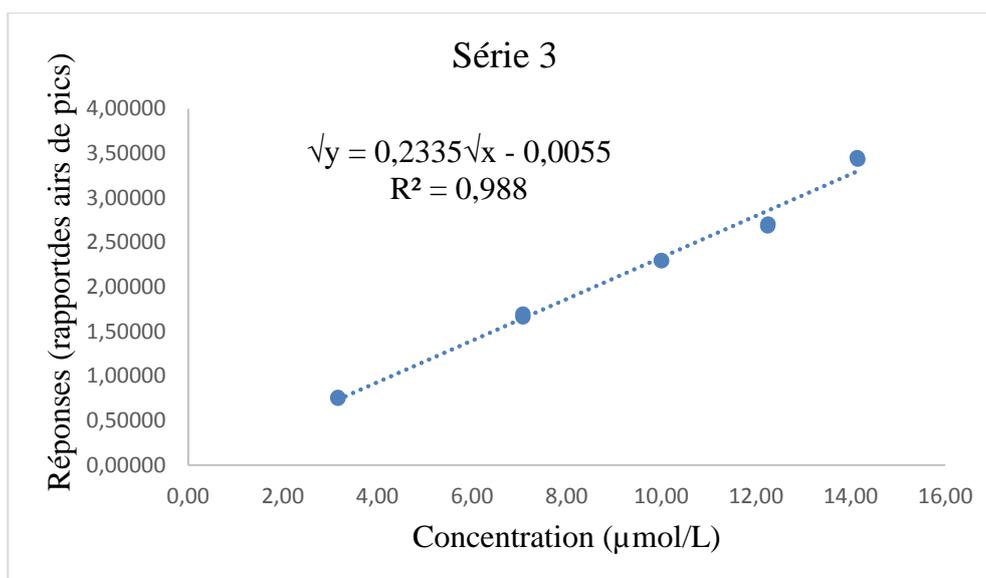


Figure 30 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série3)

4.5. Fonction polynomiale : $y = cx^2 + bx + a$

Tableau XXII: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (sans matrice)

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi
1	1	9.99	0.60	10.00	0.70	10.00	0.58
	2	9.99	0.60	9.99	0.70	10.01	0.56
2	1	49.95	2.64	50.00	2.74	50.00	2.76
	2	49.95	2.85	49.95	2.81	50.06	2.87
3	1	99.90	4.58	100.01	5.36	100.01	5.27
	2	99.90	5.38	99.90	5.15	100.12	5.26
4	1	149.84	8.00	150.01	7.21	150.01	7.20
	2	149.84	7.71	149.84	7.14	150.17	7.31
5	1	199.79	11.20	200.01	11.77	200.01	11.91
	2	199.79	11.25	199.79	11.86	200.23	11.78
c		0.00007		0.0001		0.0001	
b		0.041		0.031		0.0302	
a		0.2989		0.6185		0.7073	

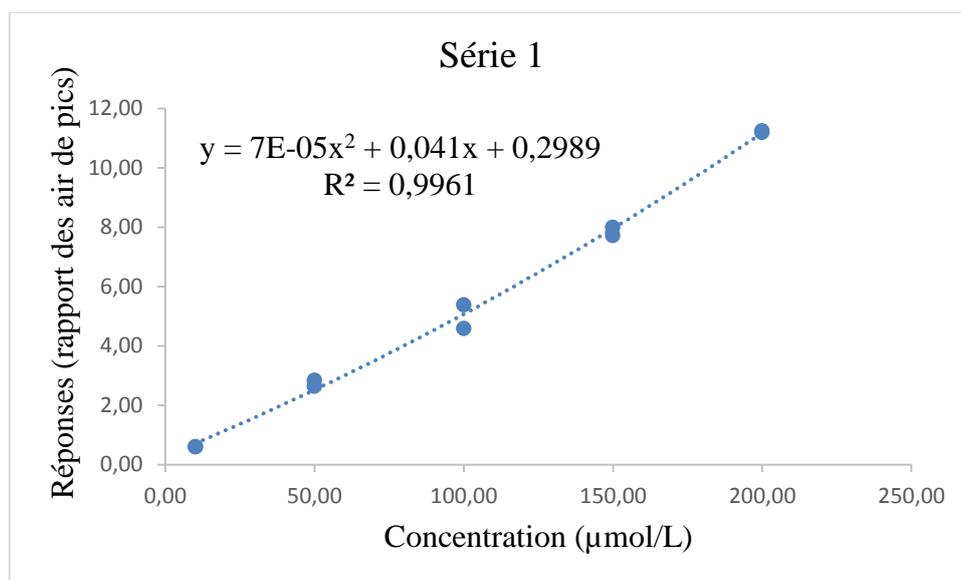


Figure 31 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (Série1)

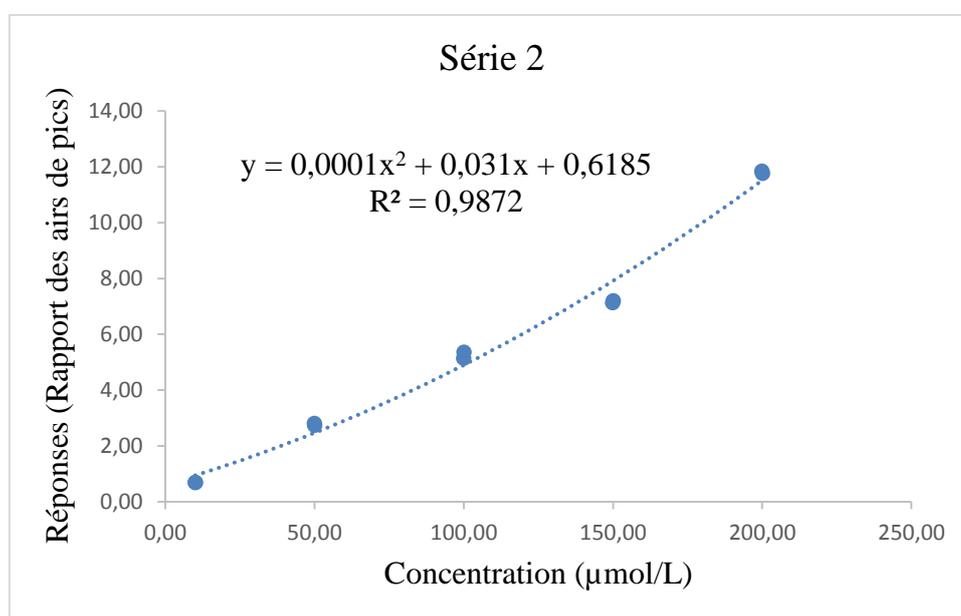


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (Série2)

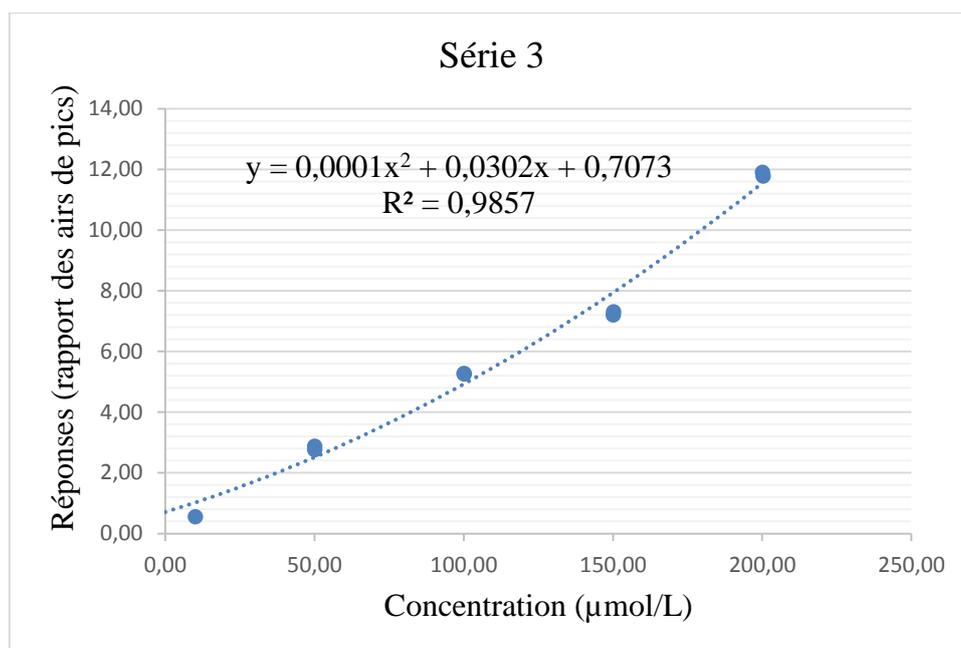


Figure 33 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine obtenue avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (Série3)

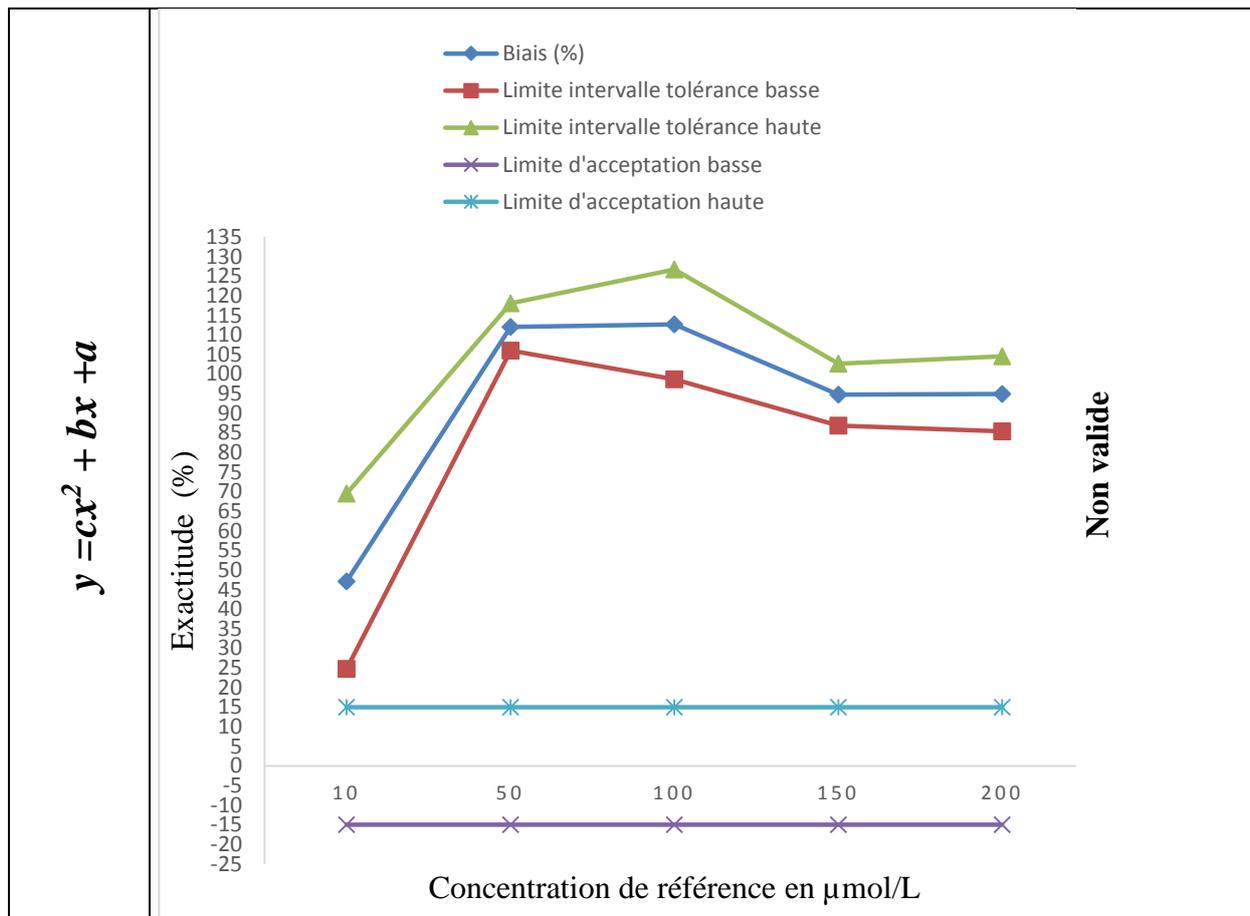
5. Profils d'exactitude obtenus

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 XXIII : profils d'exactitude obtenus pour la Tyrosine

Modèle de fonction de réponse	Profils d'exactitude	Intervalle de dosage (µmol/L)																																				
$y = bx + a$	<p>Legend:</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Biais (%) ■ Limite intervalle tolérance basse ▲ Limite intervalle tolérance haute × Limite d'acceptation basse * Limite d'acceptation haute <table border="1"> <caption>Approximate data for y = bx + a</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (µmol/L)</th> <th>Biais (%)</th> <th>Limite tolérance basse (%)</th> <th>Limite tolérance haute (%)</th> <th>Limite d'acceptation basse (%)</th> <th>Limite d'acceptation haute (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10</td> <td>23</td> <td>14</td> <td>32</td> <td>-15</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>5</td> <td>3</td> <td>9</td> <td>-15</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>7</td> <td>-1</td> <td>14</td> <td>-15</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>-1</td> <td>-6</td> <td>5</td> <td>-15</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>4</td> <td>-3</td> <td>10</td> <td>-15</td> <td>15</td> </tr> </tbody> </table>	Concentration (µmol/L)	Biais (%)	Limite tolérance basse (%)	Limite tolérance haute (%)	Limite d'acceptation basse (%)	Limite d'acceptation haute (%)	10	23	14	32	-15	15	50	5	3	9	-15	15	100	7	-1	14	-15	15	150	-1	-6	5	-15	15	200	4	-3	10	-15	15	<p>[40 – 200]</p>
Concentration (µmol/L)	Biais (%)	Limite tolérance basse (%)	Limite tolérance haute (%)	Limite d'acceptation basse (%)	Limite d'acceptation haute (%)																																	
10	23	14	32	-15	15																																	
50	5	3	9	-15	15																																	
100	7	-1	14	-15	15																																	
150	-1	-6	5	-15	15																																	
200	4	-3	10	-15	15																																	
$y = bx$	<table border="1"> <caption>Approximate data for y = bx</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (µmol/L)</th> <th>Biais (%)</th> <th>Limite tolérance basse (%)</th> <th>Limite tolérance haute (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>200</td> <td>105</td> <td>95</td> <td>115</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>100</td> <td>95</td> <td>105</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>105</td> <td>80</td> <td>130</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>125</td> <td>85</td> <td>160</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>130</td> <td>105</td> <td>150</td> </tr> </tbody> </table>	Concentration (µmol/L)	Biais (%)	Limite tolérance basse (%)	Limite tolérance haute (%)	200	105	95	115	150	100	95	105	100	105	80	130	50	125	85	160	10	130	105	150	<p>[122 – 200]</p>												
Concentration (µmol/L)	Biais (%)	Limite tolérance basse (%)	Limite tolérance haute (%)																																			
200	105	95	115																																			
150	100	95	105																																			
100	105	80	130																																			
50	125	85	160																																			
10	130	105	150																																			

<p>$Ln y = f(Ln x)$</p>	<p>Exatctitude (%)</p> <p>Concentration de référence en $\mu\text{mol/L}$</p> <p>Legend: ◆ Biais (%) ■ Limite intervalle tolérance basse ▲ Limite intervalle tolérance haute × Limite d'acceptation basse * Limite d'acceptation haute</p>	<p>[13.83 – 195]</p>
<p>$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$</p>	<p>Exatctitude (%)</p> <p>Concentration de référence en $\mu\text{mol/L}$</p> <p>Legend: ◆ Biais (%) ■ Limite intervalle tolérance basse ▲ Limite intervalle tolérance haute × Limite d'acceptation basse * Limite d'acceptation haute</p>	<p>[10.29– 200]</p>



6. Choix de la fonction de réponse

Notre objectif est de choisir une fonction de réponse qui donne un intervalle de tolérance le plus étroit, c'est-à-dire avoir le maximum des résultats entre les limites d'acceptabilité, pour cela nous avons choisi le profil d'exactitude qui donne l'intervalle de dosage le plus large.

La fonction choisie est : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Le calcul des différents critères de validation est détaillé pour la fonction choisie, sachant que la même démarche est suivie pour les autres modèles d'étalonnage.

7. Alignement des observations

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

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XXIV : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour la Tyrosine

Niveaux	Moyenne des concentrations ($\mu\text{mol/l}$)	répétitions	Séries (Jours)								
			1			2			3		
			Racine des concentrations des SV (\sqrt{x})	Réponses instrumentales (\sqrt{y})	Alignement ($\sqrt{y^*}$)	Racine des concentrations des SV (\sqrt{x})	Réponses instrumentales (\sqrt{y})	Alignement ($\sqrt{y^*}$)	Racine des concentrations des SV (\sqrt{x})	Réponses instrumentales (\sqrt{y})	Alignement ($\sqrt{y^*}$)
1	9.99	1	3.16	0.73478	0.73451	3.16	0.75864	0.75877	3.16	0.71350	0.71363
		2	3.16	0.76342	0.76315	3.16	0.72700	0.72634	3.16	0.72800	0.72814
		3	3.16	0.73965	0.73979	3.16	0.70854	0.70906	3.16	0.69681	0.69694
2	49.96	1	7.07	1.66786	1.66726	7.07	1.66701	1.66730	7.07	1.67314	1.67344
		2	7.07	1.68872	1.68812	7.08	1.66749	1.66602	7.07	1.67896	1.67926
		3	7.07	1.64369	1.64399	7.06	1.68037	1.68155	7.07	1.65712	1.65742
3	99.93	1	10.00	2.37736	2.37651	9.99	2.44188	2.44230	9.99	2.44850	2.44893
		2	10.00	2.42066	2.41981	10.01	2.40680	2.40472	9.99	2.40658	2.40701
		3	9.99	2.42037	2.42079	9.99	2.37950	2.38117	9.99	2.30691	2.30734
4	149.89	1	12.25	2.83114	2.83011	12.24	2.88988	2.89039	12.24	2.85164	2.85217
		2	12.25	2.82426	2.82322	12.25	2.87290	2.87035	12.24	2.94650	2.94703
		3	12.24	2.81181	2.81233	12.23	2.85844	2.86049	12.24	2.82850	2.82902
5	199.86	1	14.14	3.35728	3.35608	14.13	3.40149	3.40207	14.13	3.43336	3.43397
		2	14.14	3.36077	3.35957	14.15	3.40717	3.40422	14.13	3.25560	3.25621
		3	14.13	3.42459	3.42519	14.13	3.41756	3.41991	14.13	3.27664	3.27724

8. Prédications inverses

Les concentrations prédites à partir des réponses alignées sont représentées pour chaque prise d'essai dans le tableau suivant :

Tableau XXV: concentrations calculées par prédiction inverse pour la Tyrosine

Niveaux	Moyenne des prédictions ($\mu\text{mol/l}$)	répétitions	Série 1		Série 2		Série 2	
			Réponses alignées ($\sqrt{y^*}$)	prédications inverses ($\mu\text{mol/L}$)	Réponses alignées ($\sqrt{y^*}$)	prédications inverses ($\mu\text{mol/L}$)	Réponses alignées ($\sqrt{y^*}$)	prédications inverses ($\mu\text{mol/L}$)
1	9.35	1	0.73451	9.73	0.75877	9.24	0.71363	9.49
		2	0.76315	10.52	0.72634	8.39	0.72814	9.87
		3	0.73979	9.87	0.70906	7.95	0.69694	9.05
2	50.95	1	1.66726	51.39	1.66730	49.73	1.67344	51.72
		2	1.68812	52.69	1.66602	49.65	1.67926	52.08
		3	1.64399	49.95	1.68155	50.62	1.65742	50.74
3	106.50	1	2.37651	105.02	2.44230	109.71	2.44893	110.53
		2	2.41981	108.90	2.40472	106.27	2.40701	106.79
		3	2.42079	108.99	2.38117	104.13	2.30734	98.14
4	151.35	1	2.83011	149.26	2.89039	155.08	2.85217	149.83
		2	2.82322	148.53	2.87035	152.89	2.94703	159.94
		3	2.81233	147.38	2.86049	151.81	2.82902	147.41
5	211.34	1	3.35608	210.27	3.40207	216.47	3.43397	217.05
		2	3.35957	210.71	3.40422	216.75	3.25621	195.20
		3	3.42519	219.07	3.41991	218.79	3.27724	197.72

9. 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 XXVI: Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour la Tyrosine

Niveau de concentration	1	2	3	4	5
Moyenne des Concentrations introduites ($\mu\text{mol/L}$)	9.99	49.97	99.93	149.90	199.86
moyenne des Concentrations calculées ($\mu\text{mol/L}$)	9.35	50.95	106.50	151.35	211.34
Biais absolu	-0.65	0.99	6.57	1.45	11.47
Biais relatif (%)	-6.476965	1.972070	6.571146	0.967935	5.740381
Taux de recouvrement	93.52303	101.9720	106.5711	100.9679	105.7431

10. Fidélité

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

Tableau XXVII: fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour la Tyrosine.

Niveaux de Concentrations	1	2	3	4	5
Concentration moyenne retrouvé	9.35	50.95	106.50	151.35	211.34
SCE résiduelle	1.549	5.318	106.877	95.728	338.211
SCE totale	5.032	9.415	116.332	136.268	651.080
SCE inter-séries	3.483	4.097	9.455	40.540	312.869
Ecart type de répétabilité	0.508	0.941	4.221	3.994	7.508
Ecart type inter-séries	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ecart type de fidélité intermédiaire	0.508	0.941	4.221	3.994	7.508
CV de répétabilité	5.437	1.848	3.963	2.639	3.553
CV de fidélité intermédiaire	5.437	1.848	3.963	2.639	3.553

11. Exactitude

A partir des concentrations prédites, l'exactitude relative peut être calculée par rapport à la concentration introduite. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus :

Tableau XXVIII: Résultats du calcul de l'exactitude relative de la Tyrosine.

Niveaux	répétitions	Séries (Jour)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (μmol /L)	Concentration prédite (μmol /L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (μmol /L)	Concentration prédite (μmol /L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (μmol /L)	Concentration prédite (μmol /L)	Exactitude relative (%)
1	1	10.00	9.726	2.825	9.99	9.241	8.097	9.99	9.488	5.288
	2	10.00	10.517	-4.908	10.01	8.391	19.312	9.99	9.874	1.167
	3	9.99	9.869	1.220	9.98	7.955	25.438	9.99	9.052	10.352
2	1	50.00	51.386	-2.691	49.95	49.732	0.434	49.95	51.718	-3.423
	2	50.00	52.692	-5.104	50.06	49.652	0.818	49.95	52.077	-4.089
	3	49.95	49.947	0.001	49.89	50.623	-1.444	49.95	50.736	-1.553
3	1	100.01	105.016	-4.771	99.90	109.715	-8.950	99.90	110.529	-9.621
	2	100.01	108.905	-8.172	100.12	106.266	-5.787	99.90	106.786	-6.453
	3	99.90	108.994	-8.348	99.78	104.133	-4.175	99.90	98.144	1.784
4	1	150.01	149.259	0.502	149.84	155.084	-3.380	149.84	149.831	0.008
	2	150.01	148.529	0.996	150.17	152.887	-1.775	149.84	159.943	-6.315
	3	149.84	147.379	1.672	149.68	151.812	-1.407	149.84	147.413	1.648
5	1	200.01	210.274	-4.881	199.79	216.469	-7.705	199.79	217.051	-7.953
	2	200.01	210.713	-5.079	200.23	216.749	-7.620	199.79	195.195	2.354
	3	199.79	219.065	-8.799	199.57	218.794	-8.786	199.79	197.721	1.047

12. Erreur totale et profil d'erreur totale

Nous avons calculé l'erreur totale absolue et relative pour chaque niveau de concentration et les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XXIX : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation de la tyrosine

Niveau	1	2	3	4	5
Moyenne des concentrations théoriques ($\mu\text{mol/L}$)	9.35	50.95	106.50	151.35	211.34
Biais relatif (%)	-6.477	1.972	6.571	0.968	5.740
Biais relatif en valeur absolue	6.477	1.972	6.571	0.968	5.740
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)	5.437	1.848	3.963	2.639	3.553
ERREUR TOTALE (%)	11.914	3.820	10.534	3.607	9.293

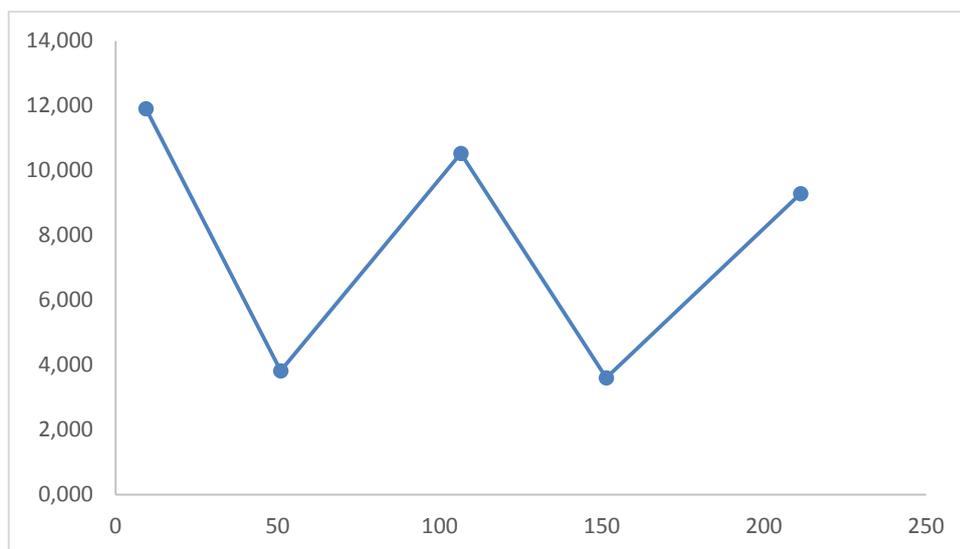


Figure 34 : profil d'erreur total pour la Tyrosine.

13. Intervalle de tolérance

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

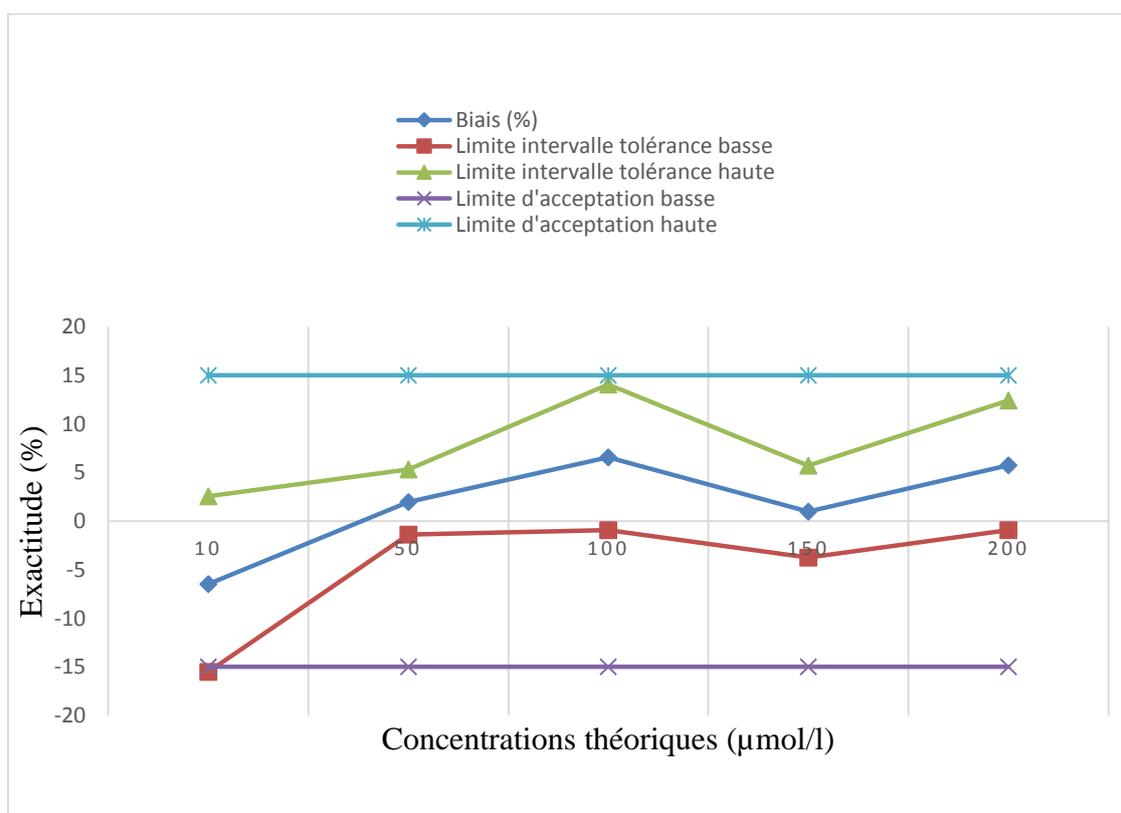
Tableau XXX : Intervalle de tolérance pour chaque niveau de concentration.

Niveaux	1	2	3	4	5
Concentration moyenne théorique ($\mu\text{mol/L}$)	9.99	49.97	99.93	149.90	199.86
Limite de l'intervalle de tolérance basse	-15.51	-1.38	-0.93	-3.77	-0.93
Limite de l'intervalle de tolérance haute	2.56	5.32	14.08	5.70	12.42

14. Profil d'exactitude

Après le calcul des critères de validation, tous les données obtenues sont collectées 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, tous dans une courbe qui donne l'exactitude (%) en fonction des concentrations théoriques.

Le profil d'exactitude obtenu en utilisant la fonction choisie est représenté ci-dessous :

Figure 35 : Profil d'exactitude de la Tyrosine avec ($\beta = 85\%$ et $\lambda = 15\%$)

15. 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 :

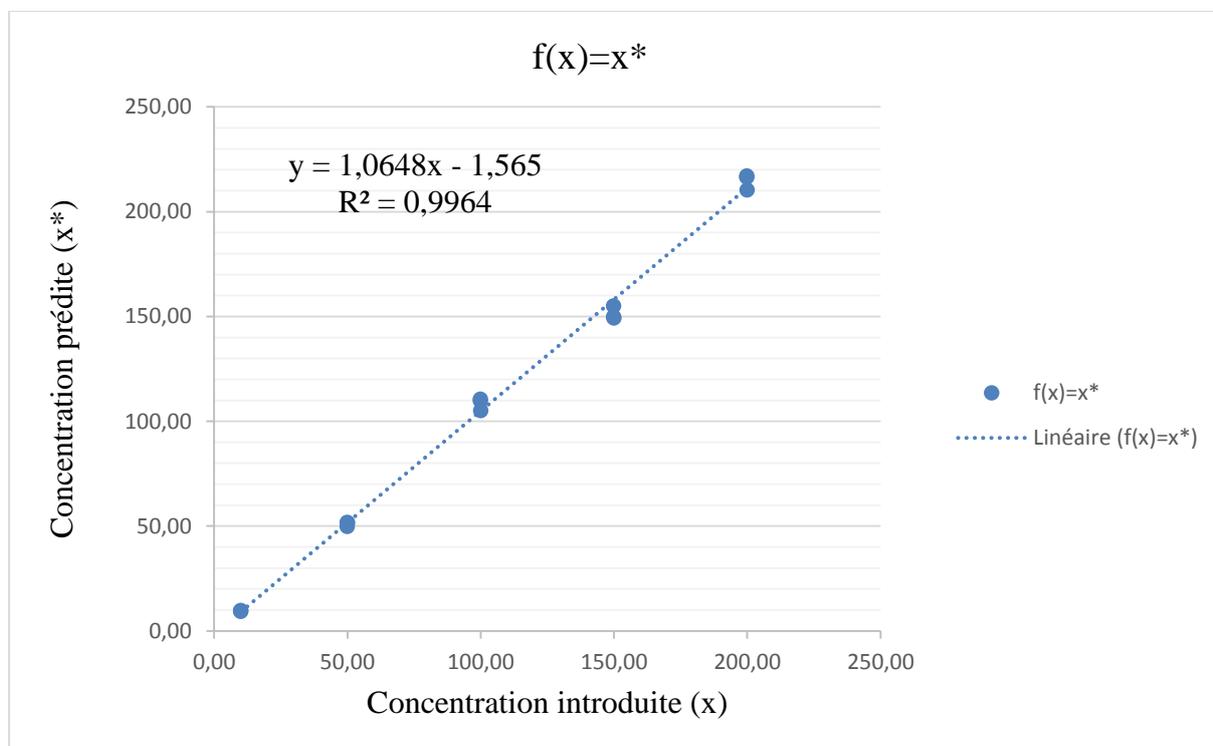


Figure 36 : Droite de linéarité de la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Tyrosine.

La linéarité de la concentration prédite est évaluée statistiquement en comparant la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0.

Tableau XXXI : Résultats des comparaisons statistiques de la linéarité.

Pente	1.06477316		
ordonnée à l'origine	-1.565024799		
Erreur pente	0.017629184		
Erreur ordonnée à l'origine	2.159093833		
Comparaison de la pente avec 0	t calculé	60.3983237	différence significative
	t° (α ; 13)	1.529919606	
	Condition	t calculé > t° (α ; 13)	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	t calculé	0.72485261	différence non significative
	t° (α ; 13)	1.529919606	
	Condition	t calculé < t° (α ; 13)	

16. 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 choisie (β).

A partir du profil d'exactitude de la Tyrosine nous constatons qu'il existe un seul point d'intersection entre la borne inférieure de l'intervalle de tolérance et la limite inférieure d'acceptabilité, et ceci entre le premier et le deuxième niveau de concentration, ce point constitue la limite basse de l'intervalle de quantification (intervalle de dosage) et son calcul sera détaillé ci-dessous.

Nous pouvons constater aussi qu'il n'y a pas un point d'intersection au niveau des concentrations les plus hautes ce qui nous permet de confirmer que la limite supérieure de quantification correspond au plus haut niveau de concentration étudié à savoir : 200 $\mu\text{mol/L}$.

Tableau XXXII : Calcul des limites de quantification de la Tyrosine.

Niveau de concentration	Niveau 2	Niveau 3
Concentration moyenne théorique	9.99	49.97
Limite de l'intervalle tolérance basse	8.443032122	49.27855088
Limite d'acceptabilité basse	8.49	42.47
	Pente	Origine
Droite de l'intervalle tolérance	1.021583346	-1.765847568
Droite d'acceptabilité	0.85	0.00000
Limite de quantification BASSE	10.29148582 $\mu\text{mol/L}$	

En conclusion les limites de quantification validées de la Tyrosine sont : **[10.29 ; 200]** $\mu\text{mol/L}$



DISCUSSION

1. Spécificité et effet matrice

1.1. Comparaison des chromatogrammes

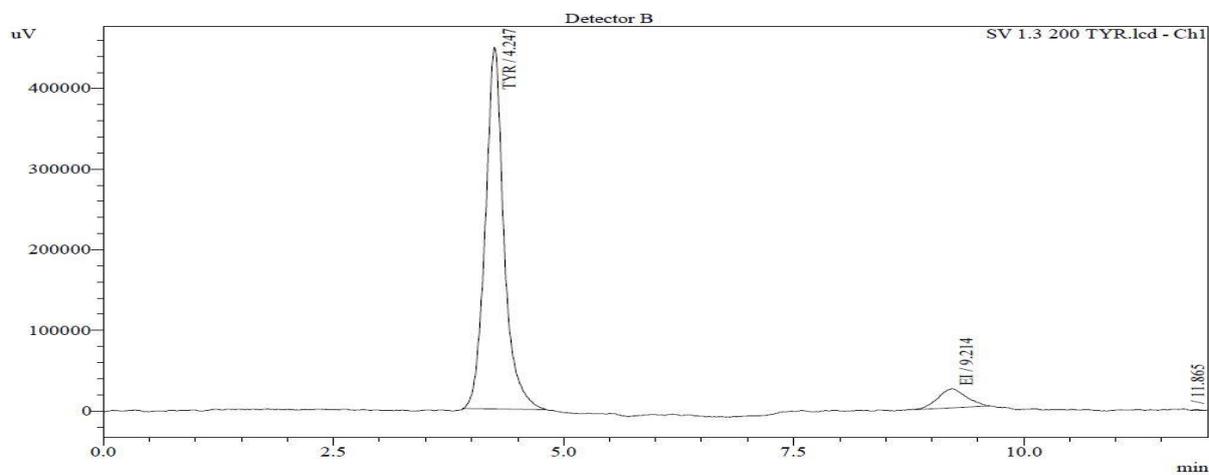


Figure 37 : Chromatogramme obtenu avec un standard de validation(avec matrice).

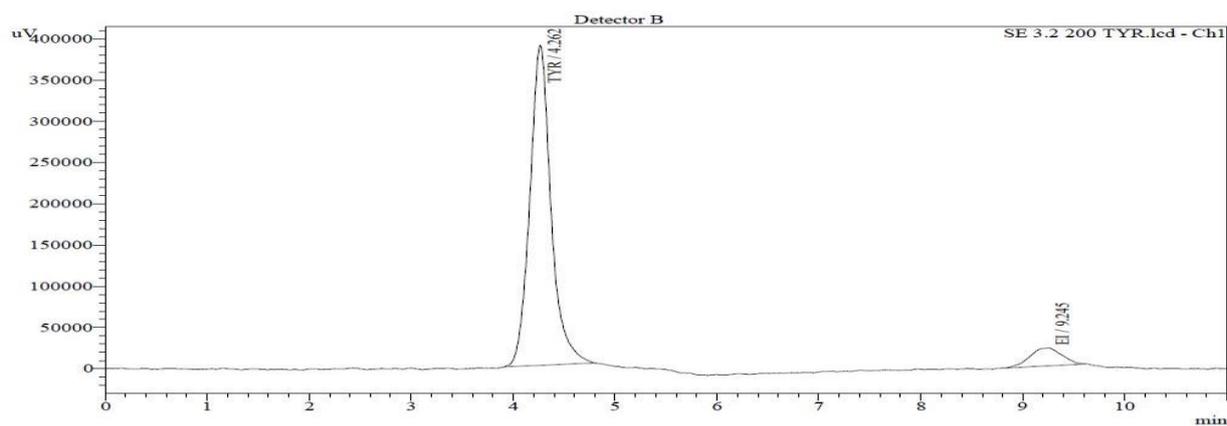


Figure 38 : Chromatogramme obtenu avec un standard d'étalonnage(sans matrice).

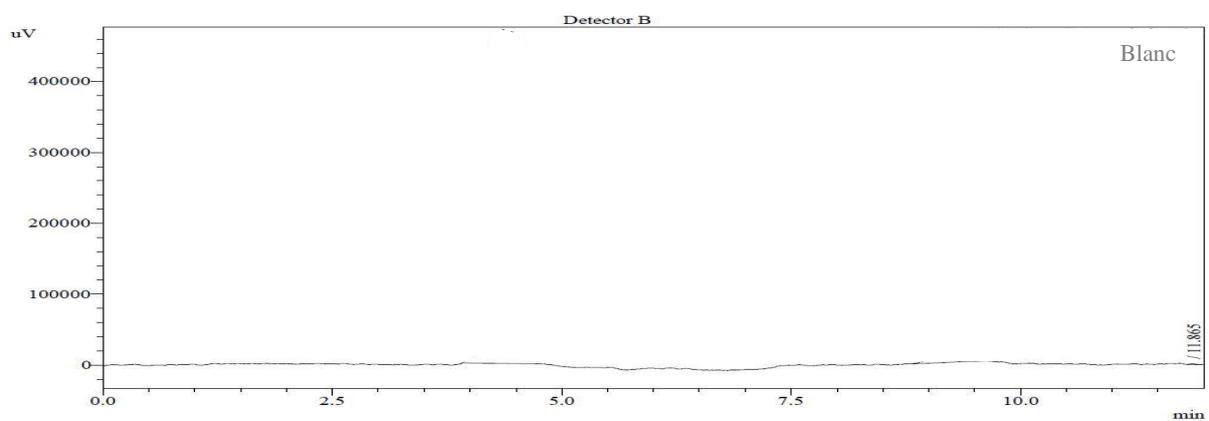


Figure 39 : Chromatogramme obtenu avec un blanc non chargé par la tyrosine.

La comparaison des pics obtenus à partir des échantillons de Tyrosine avec matrice et sans matrice a montré une semblance parfaite ce qui confirme l'absence de l'effet matrice.

On peut confirmer aussi que les pics obtenus sont bien ceux des substances étudiées (Tyrosine et étalon interne) en comparant les résultats du blanc (non chargé) avec ceux du standard d'étalonnage sans matrice (donc la méthode est spécifique), ainsi on a pu enregistrer le temps de rétention spécifique pour la Tyrosine.

1.2. Etude statistique de l'effet matrice

La comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine obtenues à partir des standards avec et sans matrice a donné les résultats suivant :

Tableau XXXIII : Interprétation des résultats de l'étude statistique de l'effet matrice.

Test	Résultat	Signification
Les pentes sont-elles comparables ?	OUI	Pas d'effet matrice
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables ?	OUI	Pas d'erreur systématique

On peut dire qu'avec un risque de 15% (qui est un risque très acceptable en milieu biologique), statistiquement la méthode n'a pas d'effet matrice ni d'erreur systématique.

2. Le choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude élucidés et les intervalles de dosage calculés on a choisi la fonction de réponse qui donne l'intervalle de dosage le plus élargi à savoir la fonction :

$$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$$

3. 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 tous les niveaux de la Tyrosine (biais relatif < 7%). Donc on peut conclure que notre méthode de dosage est juste suivant les exigences fixées au préalable.

4. Fidélité

Le degré de dispersion des concentrations prédites obtenues de la Tyrosine est assez étroit pour tous les niveaux (CV < 6%) ce qui confirme la fidélité des résultats obtenues.

La valeur du coefficient de variation la plus élevée est obtenue avec le niveau de concentration le plus bas (10 $\mu\text{mol/L}$), ce qui peut être expliqué par la difficulté de la préparation des échantillons (prises d'essai et dilutions) avec des faibles quantités sachant que l'incertitude de mesure augmente avec la diminution des concentrations.

Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, ils sont une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, et les données obtenues vont nous servir à tracer le profil d'exactitude utilisé pour l'interprétation des résultats.

5. Erreur totale

Selon le profil d'erreur totale élucidé on constate que :

Tous les niveaux de concentration présentent une erreur totale relative acceptable (inférieur à 11%), sauf pour le premier niveau (10 $\mu\text{mol/L}$) qui a une erreur dépassant légèrement les 11%. Et ceci est confirmé par l'erreur maximale observée pour le premier niveau lors du calcul d'exactitude relative.

6. Profil d'exactitude

- ✓ Avec la fonction d'étalonnage choisit on peut dire que la méthode analytique étudiée est valide dans des limites de quantification entre [10.29 ; 200] $\mu\text{mol/L}$ et que dans

cette intervalle, 85% des futures résultats se situeront dans les limites d'acceptabilité de $\lambda = \pm 15$.

7. Linéarité

- Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est très acceptable ($R^2 = 0,994$). Bien que ce coefficient ne renseigne que très peu sur la qualité de la régression, sa valeur peut nous orienter, surtout par le fait qu'elle est très proche de 1.
- L'étude statistique de la linéarité a confirmé que la pente est différente de 0 et que l'ordonnée à l'origine est comparable avec 0 ce qui prouve la validité de la régression et de la linéarité.

En effet :

- ✓ La validation des méthodes analytique en milieux biologique présente des difficultés énormes en termes d'application des protocoles de dosage, de la complexité des matrices et la nécessité de matériel adéquat et adapté...etc. Et ceci sans parler du temps et d'effort qu'il faut pour procéder à une validation.
- ✓ La méthode analytique proposée est valide dans un intervalle de dosage allant du domaine des valeurs biologiques normales vers les valeurs pathologiques, ce qui permet de détecter les hypertyrosinémies orientant ainsi les cliniciens pour ce type de pathologie.
- ✓ Pour l'utilisation en routine de cette méthode, et vu de choix de la racine carré comme fonction de réponse, il ne faut pas oublier de calculer à chaque fois les concentrations par transformation inverse de la racine carrée (puissance 2) des résultats obtenus.
- ✓ Nous avons rencontré plusieurs difficultés pendant la réalisation de ce travail notamment du fait de la complexité du milieu biologique et le temps qu'il faut pour la préparation des séries de validation en plus de la nécessité d'effectuer plusieurs lavages de la colonne après chaque essai ce qui nous laisse proposer quelques recommandations pour améliorer le travail :
 - l'utilisation d'une pré-colonne qui permet d'éliminer les interférences dues à la complexité de la matrice.
 - Malgré que l'HPLC soit une méthode séparative et vu que nous avons utilisé une matrice préparée à partir d'un sérum, il est recommandé de faire des tests de

comparaison des résultats avec un plasma pour permettre de doser la tyrosine sur des prélèvements avec un anticoagulant.

- Essayer de vérifier encore plus de paramètres surtout la stabilité et la robustesse de la méthode.
- Vu que la limite maximale de l'intervalle de dosage qui a été validé est de $200\mu\text{mol/L}$ et que les Tyrosinémies peuvent atteindre des valeurs plus élevées, il est recommandé d'effectuer des dilutions sur les échantillons qui présentent des valeurs supérieures à $200\mu\text{mol/L}$ avant de procéder au dosage par notre méthode et ceci pour ne pas dépasser les limites de quantification.

Fiche technique

1. Utilisation :

La méthode de dosage validée utilisée sur une HPLC doté d'un détecteur par fluorescence est un test de diagnostic in vitro conçu pour la détermination quantitative de la Tyrosine dans le sérum ou plasma humain.

2. Principe de la méthode :

Après une séparation chromatographique des constituants de l'échantillon injecté, les molécules passent vers le détecteur pour être quantifier.

La méthode est basée sur les propriétés fluorimétriques de la Tyrosine (acide aminé aromatique) après une excitation par une longueur d'onde de 210nm et une émission de fluorescence à 302nm.

Le résultat est enregistré sous forme d'un pic chromatographique. L'aire de ce pic servira pour calculer la concentration de la Tyrosine en se référant à un étalonnage préalable.

3. Réactifs :

KH_2PO_4 : 0.015mol/l (phase mobile)

Acide trichloroacétique (TCA) : 0.33mol/l (déproteinisation)

N-méthyl phénylalanine : 6000 $\mu\text{mol/l}$ (Etalon interne)

4. Conservation des réactifs : 2-8⁰C

5. Prélèvement et manipulation des échantillons : Sérum ou plasma hépariné. Conservés à 2-8⁰C

6. Mode opératoire :

6.1. Etalonnage :

- ✓ Préparer les solutions mères de la Tyrosine à : 1000, 750, 500, 250, 50 $\mu\text{mol/l}$;
- ✓ Prendre 350 μl d'eau distillée et 100 μl de chaque solution mère pour constituer 5 niveaux de concentration (10, 50, 100, 150 et 200 $\mu\text{mol/L}$) ;
- ✓ Ajouter 50 μl d'étalon interne ;

- ✓ Ajouter 1.5ml de TCA, centrifuger à 6000tr/min ;
- ✓ Récupérer le surnageant et le diluer à 1/9^{ème} avec le KH_2PO_4 ;
- ✓ Remplir les vials et injecter au chromatographe.

6.2. Dosage :

- ✓ Prendre 450 μl de sérum ou de plasma ;
- ✓ Ajouter 50 μl de l'étalon interne ;
- ✓ Ajouter 1.5ml de TCA, centrifuger à 6000tr/min ;
- ✓ Récupérer le surnageant et le diluer à 1/9^{ème} avec le KH_2PO_4 ;
- ✓ Remplir les vials et injecter au chromatographe.

6.3. Conditions chromatographiques :

- ✓ Phase mobile : KH_2PO_4
- ✓ Débit : 0.8ml/min
- ✓ Colonne : C8, 15cm
- ✓ Température : 30⁰C
- ✓ Volume d'injection : 10 μl
- ✓ Temps d'analyse : 11min



CONCLUSION

Conclusion

La tyrosinémie est une aminoacidopathie congénitale, caractérisée par une élévation de la concentration de la tyrosine ou de ses métabolites dans le sang et les urines, son dépistage à bas âge permet de réduire les séquelles et d'offrir une meilleure qualité de vie.

Réputée rare, cette maladie reste encore probablement dans de nombreux cas non diagnostiquée. Cependant, la complexité croissante de la tyrosinémie et des investigations rend indispensable une collaboration étroite entre les pédiatres, les généticiens, les biochimistes et parfois les équipes de recherche. A cet égard, les biologistes utilisent des méthodes analytiques qui doivent être valides.

Le présent travail a proposé une méthode de dosage de la tyrosine par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur spectrofluorimétrique, examinée selon le protocole développé et proposé par les guides de validation SFSTP 2006, qui repose sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible et exacte dans l'intervalle de concentration [10.29 ; 200] $\mu\text{mol/l}$ avec un risque d'avoir au maximum 15% des mesures en dehors des limites d'acceptation fixées à [-15% ; +15%].

Cela atteste la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de biochimie médicale pour le dosage de la tyrosine.

La méthode atteint deux objectifs qui la distinguent des autres méthodes HPLC actuellement utilisées pour le dosage des acides aminés ; elle est en effet rapide « résultat en 11 mn » et avec une sensibilité élevée garantie par la détection par fluorescence.

L'application de cette technique à l'issu du diagnostic et le suivi des tyrosinémies devrait être le prochain projet afin de mettre en évidence son intérêt clinique et déceler des éventuelles insuffisances.



BIBLIOGRAPHIE

1. Les maladies métaboliques de l'enfance à l'âge adulte : médecine interne 26(2009)606-609.
2. Feinberg M. Approche globale et harmonisée de la validation. Spectra analyse. 2006 ; 35(249):16
3. Moussard C. Biochimie structurale et métabolique. Boeck Supérieur; 2006.
4. Lewandowski et al. Sequence-Specific Peptide Synthesis by an Artificial Small-Molecule Machine. Science. 2013 ; 339 : 189-193.
5. Jacotot B, Campillo B. Nutrition humaine. Paris: Masson. 2007; 311 p.
6. Jaspard et al. Computational and Statistical Analyses of Amino Acid Usage and Physico-Chemical Properties of the Twelve Late Embryogenesis Abundant Protein Classes. Plos ONE 7, e36968. 2012.
7. Vaubourdolle M. Biochimie Hématologie, tome 2, Pharmacie-biologie. 2007 ; 1116 p.
8. P. de Lonlay et al aminoacidopathies. EMC pédiatrie 4-059-P-10. 2008.
9. Thioulouse E, Berthe MC, Couderc R. Les aminoacidopathies héréditaires (AAH). Revue Francophone des Laboratoires. 2010 ; 425:53–64.
10. Touati G et al. les maladies métaboliques à l'âge adulte de point de vue de pédiatrie, rev neuro. Paris. 2007 ; 879-882.
11. Aljammaz SA. Nutritional Management of aminoacidopathies in Saudi Arabia. [thesis].london.
12. Heylen E, Scherer G, Vincent MF, Marie S, Fischer J, Nassogne MC. Tyrosinemia Type III detected via neonatal screening, Management and outcome. Molecular Genetics and Metabolism. nov 2012;107(3):605-7.
13. Beaumont S. Biochimie-UE1: 1re année santé. ÉdiScience : Dunod ; 2015.
14. Gazengee JM, Orecchioni AM. Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique (2e ed.). Google Livres [Internet].
15. Hardman CA, Herbert VM, Brunstrom JM, Roger PJ. Récompense de dopamine et de l'alimentation : effets de l'appauvrissement de tyrosine- phenylalanine aigue sur l'appeti. Physiol Behav. 2012.
16. Vincent R. Changements physiopathologiques et moléculaires lors de la dysfonction hépatique dans un modèle murin de la tyrosinémie héréditaire de type 1.Canada : Université LAVAL. Maitrise en biologie cellulaire et moléculaire. 2015.
17. Laval F. La tyrosinémie de type I : de la tyrosine à la réplication et à la réparation de l'ADN. médecine/sciences. 1999 ; 15 : 706-8.

18. Ma XP, Sun XX, éditeurs. Melanin: biosynthesis, functions, and health effects. [Hauppauge] N.Y: Nova Science Publishers. 2012 ; 255 p.
19. Borg, Reeber. Biochimie métabolique.
20. Degroot LJ, Niepomniszcz H. Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism*. 1977; 26(6):665–718.
21. Turakulov YK, Gagelgans AI, Salakhova NS, Mirakhmedov AK, Golber LM, Kandror VI, et al. Thyroid Hormones [Internet]. Turakulov YK, éditeur. Boston, MA: Springer US; 1975. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-2705-7>.
22. Gerald L, Human Biochemistry and Disease. Elsevier Inc.2008.
23. Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *The Journal of nutrition*. 2007;137(6):1539S–1547S.
24. Toussaint B, Laanan F, Pereira T, Goyens Ph, Laeremans H, Vincent MF, et al. Le dépistage néonatal des anomalies métaboliques. 2013.
25. Bergeron A, D'Astous M, Timm DE et Tanguay RM. Structural and functional analysis of missense mutations in fumarylacetoacetate hydrolase, the gene deficient in hereditary tyrosinemia type 1. *The journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(18) : 225-31.
26. Mckiernan PJ, Preece MA, ChakrapaniA. Outcome of children with hereditary tyrosinaemia following newborn screening.2015.
27. Tanguay RM, Bergeron A, Jorquera R, La tyrosinémie héréditaire: une maladie du stress du reticulum endoplasmique. *M/S n° 10*, vol. 19, octobre 2003 ; Article disponible sur le site <http://www.medecinesciences.org>.
28. Gharnati K. La tyrosinémie type I (à propos de 12 cas) [Thèse]. Royaume du MAROC. 2016.
29. Patrick AD, Gray RGF, Preston FE, et al. Acute hereditary tyrosinemia type I: clinical, biochemical and hematological studies in twins. *J.inherited metab dis*. 1981; 4, p: 37-40,
30. P. de Lonlay et al. Prise en charge médicale et diététique des maladies héréditaires du métabolisme : Tyrosinémie de types I et II. France. 2013 ; p188.
31. FONTAINE G. La Tyrosinose, Actualités métaboliques en pédiatrie, deuxième série. p: 377-415.
32. Grant AM, Marie AL et Lise B. Tyrosinémie hépatorénale. *Progrès en pédiatrie 8-maladies métaboliques*. 1991 ; p: 153-155.
33. Kvittigen EA. Tyrosinemia – treatment and outcome.*Metab. Dis*.18 (1995) 375-379.
34. Ricquier D. Maladies héréditaires du métabolisme et apports de la métabolomique *M/S n° 5*, vol. 21, mai 2005. Article disponible sur le site <http://www.medecinesciences.org>

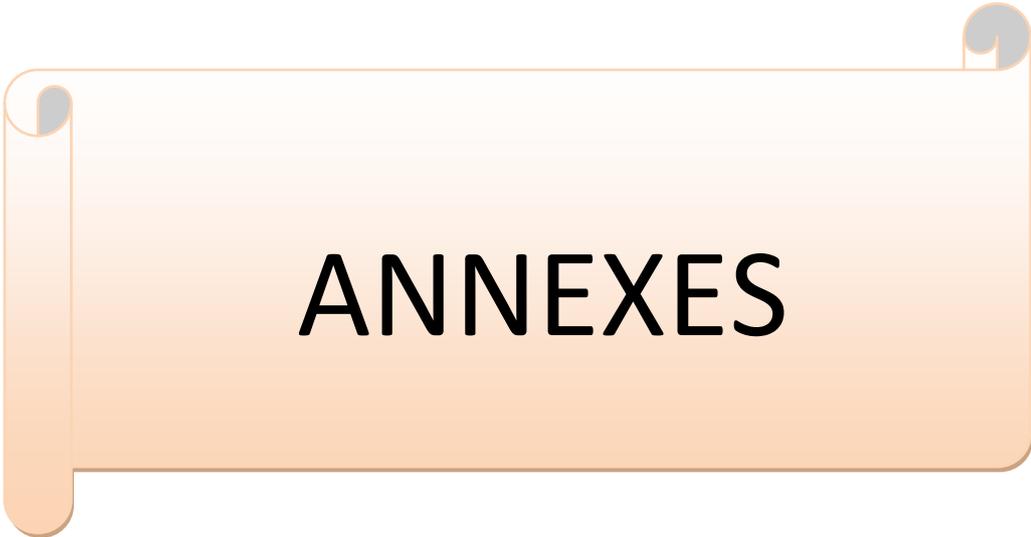
35. Tyrosinémie de type 1. TOP SANTE Informations de recherches en santé et nature pour une vie plus saine. 27 juin 2016.
36. Couce ML, Aldámiz-Echevarría L, Baldellou A, Blasco J, Bueno MA, Dalmau J, et al. Recomendaciones y manejo de la tirosinemia hereditaria Tipo I o Tirosinemiahepatorrenal. *Anales de Pediatría*. nov 2010;73(5):279.e1-279.e4.
37. Lebel F. évaluation de trois tests de dépistage de porteurs et recherche d'un effet fondateur dans la tyrosinémie héréditaire de type 1 au SAGUENAY-LAC-ST-JEAN, [MÉMOIRE]. Jan 1992.
38. Larochelle J, Alvarez F, Bussieres JF, Chevalier I, Dallaire L, Dubois J, et al. Effect of nitisinone (NTBC) treatment on the clinical course of hepatorenal tyrosinemia in Quebec. *Mol Genet Metab*. 2012 ; 107: 49-50.
39. Larochelle J, Alvarez F, Bussieres JF, Chevalier I, Dallaire L, Dubois J, et al. Effect of nitisinone (NTBC) treatment on the clinical course of hepatorenal tyrosinemia in Quebec. *Mol Genet Metab*. 2012 ; 107: 41-54.
40. Schlune A, Thimm E, Herebian D, Spiekerkoetter U. Single dose NTBC-treatment of hereditary tyrosinemia type I. *J Inher Metab Dis*. 2012
41. Houssin O, Valayer J, Bernard O. Transplantation hépatique chez l'enfant. *La presse médicale* 1989, 18 N° 36 p : 1778-1780.
42. Otte JB, et al. La transplantation d'organe chez l'enfant. Paris sondoz. 1989.
43. Bouyacoub Y, Zribi H, Azzouz H, Nasrallah F, Ben Abdelaziz R, Kacem M, et al. Novel and recurrent mutations in the TAT gene in Tunisian families affected with Richner–Hanhart Syndrome. *Gene Tunisia*. 2013.
44. Diogo C, Soares L, Mariana N, et al. Herpetiform keratitis and palmoplantar hyperkeratosis: warning signs for Richner-Hanhart syndrome. 2016.
45. Meissner T, Betz RC, Pasternack SM, Eigelshoven S, Ruzicka T, Kruse R, et al. Richner–Hanhart Syndrome Detected by Expanded Newborn Screening. *Pediatric Dermatology* Vol. 25 No. 3 378–380 ; 2008.
46. Heylen E, Scherer G, Vincent MF, Marie S, Fischer J, Nassogne MC. Tyrosinemia Type III detected via neonatal screening: Management and outcome. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012.
47. Blundell J, Frisson S, Chakrapani A, Kearney S, Vijay S, Gissen P, et al. Markers of cognitive function in individuals with metabolic disease: Morquio syndrome and tyrosinemia type III, *Cognitive Neuropsychology*, 2018 ; 35:3-4, 120-147

48. Najafi R, Mostofi zadeh N, Hashemipour M. A Case of Tyrosinemia Type III with Status Epilepticus and Mental Retardation. *Adv Biomed Res. Iran* ; 2018.
49. Chauveau D, Vanderperren B, Tricot L et al. Manifestations rénales des maladies héréditaires du métabolisme chez l'adulte. *Flammarion médecine sciences – Actualités néphrologiques*. Paris 2004 ; 119-142.
50. Essalmi L, Roncato M, Mermet N et al. Sclérotiques et oreilles brun – bleuâtres. *Rev Med Interne*. 2007 ; 28 : 42-43.
51. Adonis-Koffy L, Gonzalès E, Nathanson S, Spodek C, Bensman A. L'alcaptonurie une cause rare de coloration anormale des urines. A propos d'un cas chez le nourrisson. *Arch Pédiatr*. 2000 ; 7 : 844-46.
52. Charlín R, Barcaui CB, Kac BK, Soares DB, Rabello-Fonseca R, Azulay-Abulafial. Hydroquinone-induced exogenous ochronosis: a report of four cases and usefulness of dermoscopy. *Int J Dermatol* 2008; 47:19-23.
53. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. ISO/CEI 17025. 2005.
54. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, et al. Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. *STP Pharma Pratiques*. 2003, 13, 3, 101-138.
55. Assurance de la qualité de produits pharmaceutiques, Comité OMS d'experts des Spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques. Trente-deuxième Rapport. Genève. 1998 ; 278 pages
56. Isabelle Pinguet. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. *Sciences pharmaceutiques*. 2015 ; P14.
57. Ph. Hubert et al. / *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004) 579–586.
58. Guide de validation des méthodes d'analyses. ANSES. Agence nationale de sécurité sanitaire .2015 ; p : 6-60.
59. Guide OMS des normes relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF) Partie 2 : Validation mai. 2001 ; P 66. disponible sur Internet : www.who.int/vaccines-documents/.
60. Dr MAMOU M. cours : validation des méthodes analytiques ; 2016.
61. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B et al. 2006. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II – Statistiques. *STP PHARMA PRATIQUES*. 2006 ; 16 :43-54

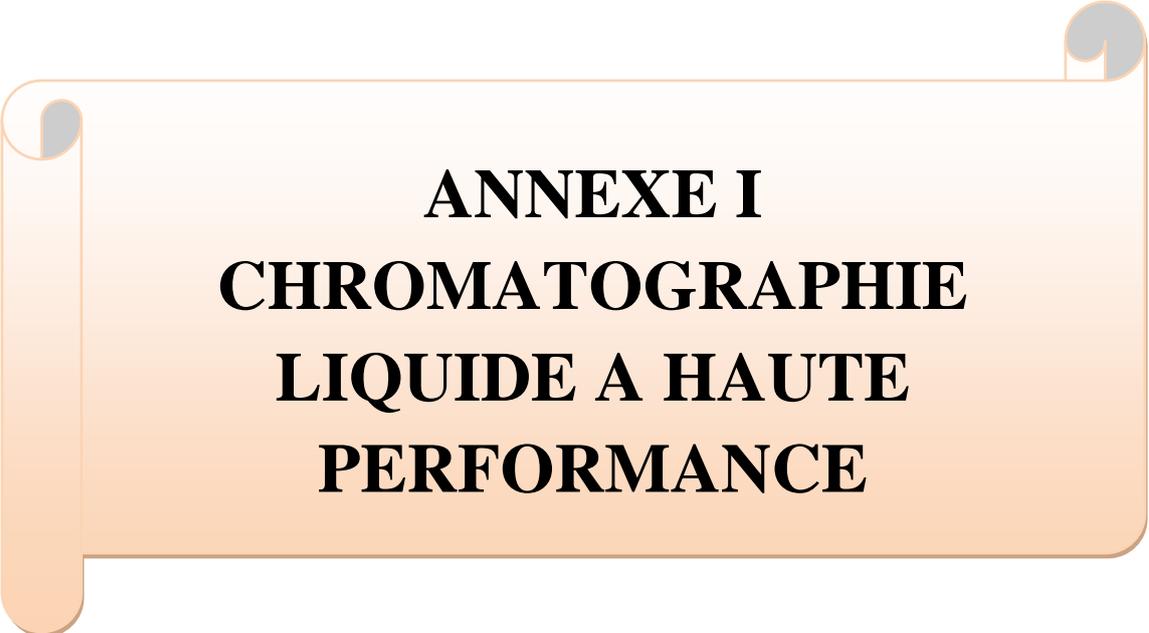
62. SIAVELIS A. Analyse des différentes approches de validation de méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière [thèse] ; 2014.
63. Bouabidi A. Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques. Faculté des Sciences Ben M'Sik Casablanca ; 2013.
64. Isabelle Pinguet. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015 ; P74.
65. Ph. Hubert et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45 (2007) 70–81.
66. Skoog DA, West DM. Chimie analytique. De Boeck Supérieur; 2015. 1174 p
67. Denat F. ICMUB UMR 5260 9, Av. Alain Savary BP 47870 21078 Dijon France. Denat@u-bourgogne.fr.
68. Dubey PK, Murali PM. Core Components of Analytical Method Validation for Small Molecules: An Overview. Int. Res. J Pharm. 2012 ; 3(5).
69. USP32- NF27, General Chapter 1225, Validation of Compendial Methods, 2009.
70. USFDA. Draft Guidance for Industry: Analytical Procedures and Method Validation. Center for Drug Evaluation and Research. Rockville, MD.
71. Briere T, cours de chromatographie liquide Université de La Réunion. <http://www.chimie-briere.com>
72. Mahuzier G, Hamon M. Abrégé de chimie analytique: Méthodes de séparation. tome II. Masson; 1997. 262 p.
73. Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine – Académie de Rouen - HPLC Principe et appareillage [Internet]. [cité 7 juillet 2017]. Disponible sur : <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php>.
74. Jean LC. Cours chromatographie liquide, Université Montpellier (2001), p4
75. Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen - HPLC Principe et appareillage [Internet].
76. Ben Saad L. Étude de la séparation des fluoroquinolones par HPLC : application à l'étude de leur dégradation par rayonnement GAMMA [mémoire]. Tunisie ; 2013.
77. Gupta V, Jain A, Gill N, Gupta K. Development and validation of HPLC method – a review. Int. Res J Pharm. App Sci. 2012 ; 2(4):17-25
78. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. 2010 ; 911 p.
79. Thierry B - Professeur agrégé – Département de Chimie, Université de La Réunion, (2001), p36-37

80. Dr Thierry Briere - Professeur agrégé – Département de Chimie, Université de La Réunion,(2001), p44-45
81. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. 2010. 913 p.
82. Dr Thierry B - Professeur agrégé – Département de Chimie, Université de La Réunion, (2001), p46
83. Skoog DA, West DM. Chimie analytique. De Boeck Superieur; 2015. 1174 p.
84. File ://C :\\html\\physique\\CHIM\\Jumber\\HPLC\\Chromatographie-en-pha-HPLC.pdf [Internet].[cité 7 juillet 2017]. Disponible sur : [http : //www4.ac-nancy-metz.fr/physique/liens/Jumber/pdf-chimie/HPLC.pdf](http://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/liens/Jumber/pdf-chimie/HPLC.pdf)
85. Dong M. W. Regulatory Aspects of HPLC Analysis: HPLC System and Method Validation, Modern HPLC for Practicing Scientists. 1st ed. John Wiley and Sons. New Jersey. 2006.
86. Shah BP, Jain S, Mansuri NY. Stability Indicating HPLC. Method Development: A Review. Int J Pharm Res Sci. 2012; 3(9), 2978-2988.
87. Rouessac F, Rouessac A. Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes. Paris: Dunod. 2004.
88. Dr. BEN SI SAID Hassan. Cours de Chromatographie Liquide Haute Performance HPLC.2017.
89. Vogel AI, Jeffery GH. Vogel's textbook of quantitative chemical analysis. 5th ed. Harlow, Essex, England : New York: Longman Scientific & Technical ; Wiley. 2012; 877 p.
90. Vogel, Mendhman, Denney, Barnes, Thomas. Analyse chimique quantitative de VOGEL. 6eme éd. 2000.
91. Yamaguchi T et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ; 2014.
92. Songara R, Prakashkumar A Overview of Analytical Method Validation in Pharmaceutical Industries. IJPI's Journal of Analytical Chemistry. 2011; 1(5).10-20.
93. Ravichandran V, Shalini S, Sundram KM, Harish R. Validation of Analytical Methods- Strategies and Importance. Int J Pharmacy and Pharm Sci. 2010; 2(3), 18-22.
94. Jimidar MI, Heylen P, Smet MD. Method Validation in HPLC Method Development for pharmaceuticals. Edited by Satinder Ahuja and Henrik Rasmussen. Academic Press. London. 2007.

95. Gupta V, Jain ADK, Gill NS, Gupta K. Development and validation of HPLC method – a review. *Int. Res J Pharm. App Sci.*2012; 2(4):17-25.
96. Ludwig H. Validation of Analytical Methods and Processes, in *Pharmaceutical Process Validation*. 3rd ed. Edited by Robert A. Nash and Alfred H. Wachter. Marcel Dekker. New York. 2003.
97. Jardy. *Chromatographie en phase liquide, théorie des méthodes de séparation*, 4ème édition. 2004 ; p12
98. Jardy, *Chromatographie en phase liquide, théorie des méthodes de séparation*, 4ème édition. 2004 ; p25.
99. Degraeve J, Berthou F. *Méthodes chromatographiques*, 2ème édition.2009 ; p392.
100. USP32- NF27, General Chapter 621, *Chromatography*, 2009.



ANNEXES

A decorative orange scroll-like graphic with rounded corners and a vertical tab on the left side. The text is centered within the scroll.

ANNEXE I
CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE A HAUTE
PERFORMANCE

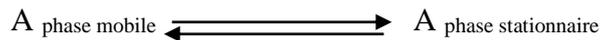
1. Généralité sur la chromatographie

1.1. Définition de la chromatographie

La chromatographie est un ensemble de procédés de séparation applicables à des mélanges moléculaires ou ioniques, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire et une phase mobile continue: les deux phases étant mises en contact intime et à contre-courant [65,66].

1.2 Principe

Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire (liquide ou solide) et la phase mobile (gaz ou liquide) qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...) [67].



$$K = CS/CM$$

K : Coefficient de distribution

CS : Concentration de l'analyte A dans la phase stationnaire

CM : Concentration de l'analyte A dans la phase mobile

1.3. Classification des méthodes chromatographiques

1.3.1. Classification selon la nature des phases

-la phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz, soit encore un fluide supercritique.

-la phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide (fixé sur un support solide). La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- ❖ chromatographie liquide-solide (LSC)
- ❖ chromatographie liquide -liquide (LLC)
- ❖ chromatographie gaz- solide (GSC ou GC)
- ❖ chromatographie gaz- liquide (GLC ou GC)
- ❖ la chromatographie supercritique (SFC) La SFC représente un cas intermédiaire entre LC et GC, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz [68].

1.3.2. Classification selon le phénomène chromatographique

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On distinguera donc :

- la chromatographie d'adsorption (LSC, GSC) (lorsque la phase stationnaire est un solide); par extension on pourrait y rattacher la chromatographie d'affinité, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).
- la chromatographie de partage (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).
- la chromatographie d'échange d'ions (IEC), où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.
- la chromatographie d'exclusion (SEC) où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC) [69].

1.3.3. Classifications selon les procédés utilisés

➤ Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

- Chromatographie sur colonne
- Chromatographie sur papier
- Chromatographie sur couche mince.

➤ Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera:

- Chromatographie par développement (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire)
- Chromatographie d'élution (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire) [70].

1.3.4. Classification selon les paramètres intervenant dans la séparation.

Les paramètres physico-chimiques sur lesquels reposent les principes de séparation sont :

- la polarité et/ou l'hydrophobicité : polarité de phase normale ou inversée
- la charge électrique : échange d'ions
- la taille et la forme (en fait, le volume) : exclusion ou perméation de gel
- L'existence de structures particulières qui permettent d'établir des liaisons spécifiques: chromatographie d'affinité [71].

1.4. Théories de base de la chromatographie

1.4.1. Théorie des plateaux

La colonne chromatographique est assimilée à une colonne à distiller de longueur L ou la progression des substances est considérée comme une succession d'équilibres se réalisant entièrement dans des étages ou plateaux fictifs « plateaux théoriques »

Une colonne est constituée de N plateaux théoriques (de même hauteur). La taille des plateaux, H, est appelée Hauteur équivalente à un plateau théorique HEPT [72].

$$HEPT = L/N$$

1.4.2. Théorie cinétique

Dans la théorie cinétique l'aspect dynamique de la phase mobile est pris en considération ainsi que l'influence de facteurs tels que la température et la pression [72].

2. chromatographie liquide à haute performance

2.1. Principe

Les composés à analyser (solutés) sont mis en solution et entraînés par une phase mobile liquide (éluant) tout au long d'une phase stationnaire pour être séparés grâce à une répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (partage, adsorption...) exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le 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 représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. [73 ,74]

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire [75].

Ce principe est traduit par le schéma suivant (figure 40) :

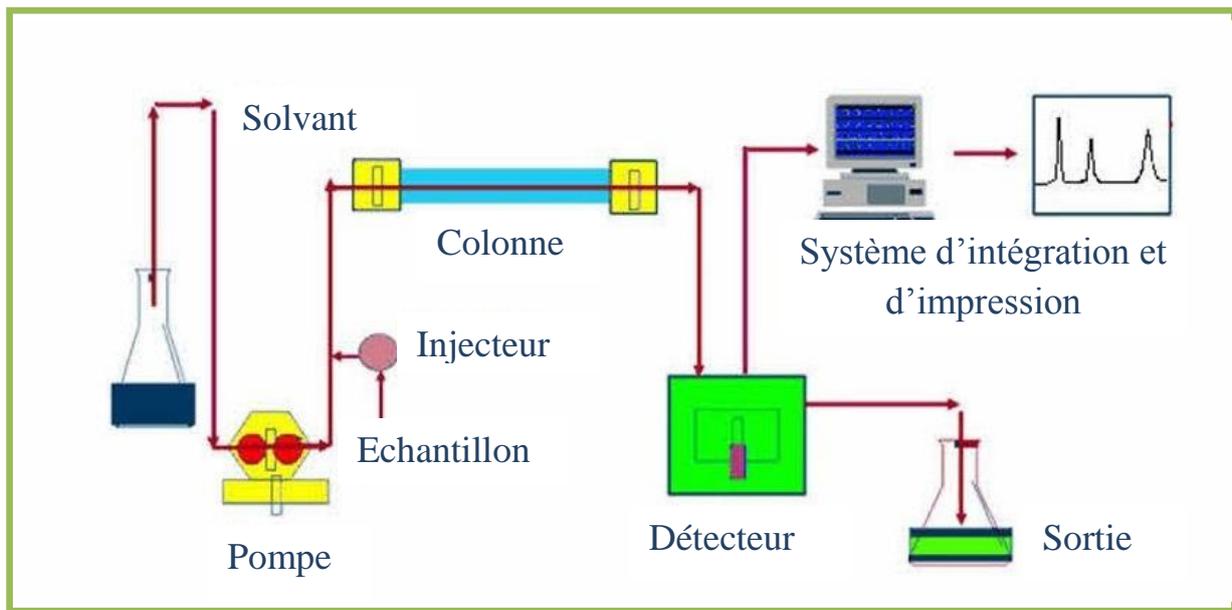


Figure 40 : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC [76]

2.2. Appareillage

Les différentes composantes d'une chaîne HPLC sont présentées sur la photo suivante (figure 41). Tous les organes du système sont liés à un micro-ordinateur qui pilote tous les processus.



Figure 41 : Les organes d'une chaîne HPLC (Laboratoire de biochimie. Département de pharmacie de l'UMMTO)

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux [77]).

2.2.1 Le réservoir de la phase mobile

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé [78].

2.2.2 La pompe

Elle doit fournir la phase mobile à un débit constant à une certaine pression pour atteindre la colonne. Elle permet de travailler soit :

- ❖ En mode isocratique : c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- ❖ En mode gradient : c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μL à plusieurs mL/min [79].

La pression à imposer dépend des facteurs suivants :

1. débit de la phase mobile
2. viscosité du modificateur organique
3. taille des grains de la phase stationnaire
4. géométrie de la colonne [79].

2.2.3. L'injecteur

L'injection de l'échantillon se fait avec deux manières :

- ✓ Manuelle : l'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile.
- ✓ Automatique : l'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne [80,81].

2.2.4. La colonne

La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC. Le choix d'une colonne HPLC est lié aux paramètres suivants :

- Type de la phase stationnaire
- Longueur
- Diamètre des particules (dp)
- Débit de la phase mobile supportable [82].

✓ **La phase stationnaire normale**

La phase normale est constituée d'un gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête [83].

✓ **La phase stationnaire inversée**

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire tels que l'acétonitrile, le méthanol et l'eau. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante [83].

L'augmentation du nombre de chaîne greffée par unité de surface fait diminuer le temps de rétention et augmenter la séparation des signaux ainsi que le facteur de la sélectivité. A des pH supérieur à 8, les greffons se trouvent instables. Pour les composés ionisés, il faut ajuster le pH pour que les composés gardent leur forme neutre nécessaire à leur rétention par la colonne [83,84].

Les gels de silice sont stables dans une grande gamme de pH mais ils ne supportent pas des pH trop extrêmes. Il y a des risques de dissolution pour des pH trop acides ou trop basiques, on se limite donc à la gamme de pH comprise entre 2 et 12 [85].

2.2.5. Le détecteur

Le détecteur est relié à la sortie de la colonne. Les solutés en sortie de la colonne chromatographique sont en solution très diluée dans une phase éluante dont la nature et la composition varient d'une analyse à l'autre, de ce fait un détecteur est nécessaire puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés [86]. Le choix d'un détecteur dépend à la fois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires. Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : absorption, fluorescence et indice de réfraction [87].

Le détecteur suit l'apparition des analytes. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Il existe différents types de détecteurs :

- ✓ Détecteur UV-visible
- ✓ Détecteurs spectrophotométriques
- ✓ Détecteur spectrofluorimétrique
- ✓ Détecteur réfractométrique
- ✓ Détecteur électrochimique [86].

2.2.5.1 Détecteurs par absorption dans l'Ultraviolet et le Visible

Les plus couramment utilisés en HPLC car ils sont peu sensibles aux fluctuations de débit et de température et un grand nombre de solvants ont une bonne transparence dans l'UV.

L'absorbance de la phase mobile est mesurée en permanence en sortie de la colonne à une ou plusieurs longueurs d'onde. Le signal donné par ces détecteurs est proportionnel à la concentration du soluté dans l'effluent de la colonne chromatographique. En effet, l'absorbance A est liée à la concentration par la relation de Beer Lambert [88] :

$$A = \epsilon_{\lambda} l c$$

Avec :

ϵ_{λ} : coefficient d'absorption molaire

l : trajet optique

C : concentration du soluté dans l'effluent

2.2.5.2 Détecteur spectrofluorimétrique

Ce mode de détection a une grande sélectivité et une grande sensibilité. Ces dispositifs permettent de détecter les composés fluorescents présents dans la phase mobile en faisant passer l'effluent de la colonne à travers une cellule irradiée avec de la lumière ultraviolette et en mesurant tout rayonnement fluorescent résultant. Ce mode de détection a une grande sélectivité et une grande sensibilité [89].

2.2.5.3 Détecteur réfractométrique

Ce type de détecteur comporte un réfractomètre différentiel qui a pour objet de mesurer en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne.

Pour cela un faisceau lumineux (mono- ou polychromatique) passe à travers une cellule comportant deux compartiments dont l'un est rempli avec la phase mobile seule et l'autre avec l'effluent en sortie de colonne. La différence d'indice entre les deux liquides, qui apparaît lorsqu'un composé est mélangé à l'éluant, se traduit par un déplacement angulaire du rayon réfracté. Dans la pratique, le signal correspond à la mesure en continu de la rétroaction qu'il faut fournir à un élément optique pour compenser la déviation du faisceau réfléchi [87].

2.2.5.4 Détecteur électrochimique

Le terme «détecteur électrochimique» en HPLC se réfère habituellement à des détecteurs ampérométriques ou coulométriques, qui mesurent le courant entre les électrodes polarisables et les électrodes de référence qui varie en conséquence de l'oxydation ou de la réduction des solutés [81,90].

Tableau XXXIV : Les principaux détecteurs de l'HPLC [91].

Détecteurs	Utilisation	LD	Linéarité
Réfractométrie	Universelle	100 ng - 1 mg	3000
Absorption UV-Visible	Sélective	1 – 10 pg	1000 à 10000
Fluorescence	Sélective	1 – 10 pg	1000 à 10000
Spectrométrie de masse	Sélective	1 pg – 1 ng	10 ⁴ à 10 ⁵
Electrochimie	Sélective	10 pg – 1 ng	Variable selon composé

2.2.6. L'enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport signal / bruit doit être au moins de trois.

Le bruit se traduit par des oscillations plus ou moins marquées autour de la ligne de base, ce bruit de fond aléatoire provient de diverses causes :

- ❖ La variation de température
- ❖ De la pression
- ❖ L'instabilité électronique

Par ailleurs on doit avoir une ligne de base aussi proche que possible de l'horizontale [92].

2.3. Les grandeurs caractérisant la qualité de séparation et la performance de la colonne

2.3.1. L'efficacité de la colonne

L'efficacité d'une colonne analytique d'une chaîne HPLC peut s'exprimer par le nombre N de plateaux théoriques.

Plus le nombre des plateaux théoriques N est élevé, plus la colonne est efficace. On définit également HEPT, la hauteur équivalente à un plateau théorique, et L, la longueur de la colonne. Plus la hauteur du plateau HEPT est faible, plus la colonne est efficace. Il existe une équation dite équation de Knox en chromatographie liquide à haute performance qui relie la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile. L'efficacité N traduit la finesse des pics.

$$\text{HEPT} = H = L / N$$

L'efficacité d'une colonne dépend de trois facteurs principaux :

- ✓ De sa géométrie : plus une colonne sera longue et plus elle sera efficace.
- ✓ De son garnissage : plus les particules de silice seront fines et plus la colonne sera efficace.
- ✓ Du débit de l'éluant : Il existe un débit optimal d'utilisation d'une colonne pour lequel son efficacité est la plus grande [93].

Dans le cas où les pics sont symétriques et gaussiens, le nombre de plateaux théoriques sera calculé selon la relation:

$$N = 16(\text{tr}/\omega)^2$$

Si les pics sont non symétriques:

$$N=5,54 (\text{tr}/ \omega 1/2)^2$$

Avec :

Tr : temps de rétention.

ω : largeur de pic à la base.

$\omega_{1/2}$: largeur de pic à mi-hauteur.

2.3.2 La résolution R_s

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. Elle est exprimée à partir des temps de rétention. La résolution est calculée à partir de la relation suivante :

$$R_s = 2 (tr_2 - tr_1) / (\omega_{1/2}(1) + \omega_{1/2}(2))$$

Avec :

Si $R_s < 1$: une mauvaise résolution.

Si $1 < R_s < 1,5$: une résolution acceptable.

Si $R_s \geq 1,6$: une bonne résolution.

Si $1,4 < R_s < 1,6$: une résolution optimale.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics:

- ❖ la distance séparant les sommets de deux pics mesurée par les temps de rétention tr_2 et tr_1 .
- ❖ la largeur des pics à la base $\omega_{1/2}$ (pic1) et $\omega_{1/2}$ (pic2) [94].

2.3.3. La Sélectivité α

On définit la sélectivité α d'une séparation par le rapport de facteur de distribution (k_1 et k_2) de deux solutés. Plus k est grand, plus le composé est adsorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement.

La valeur de k dépend de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des deux phases.

$$\alpha = k_2 / k_1$$

α est égale à 1 lorsque n'a pas une séparation entre les deux signaux consécutifs [94].

2.3.4. La perte de charge

La perte de charge est une caractéristique de la colonne, elle exprime sa résistance à l'écoulement de la phase mobile. Elle est appelé aussi pression de la colonne [95].

2.4. Les grandeurs de rétention

2.4.1. Temps de rétention

Le temps de rétention est une grandeur caractéristique d'un analyte dans des conditions opératoires données, c'est le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué, noté t_r et exprimé en minutes. On utilise ce paramètre pour identifier les composés dans un chromatogramme. Il varie en fonction du débit de la phase mobile et de leur composition, de la température d'élution et de la nature de colonne utilisée.

Le temps de rétention t_r d'un soluté est fonction de son affinité avec l'éluant d'une part et avec la phase stationnaire d'autre part. A un instant t , le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et à la concentration C_s dans la phase stationnaire, leur rapport est appelé coefficient de partage noté K .

$$K = C_s / C_m$$

Le coefficient de partage dépend de trois types d'affinités : la première celle entre le soluté et la phase mobile, la deuxième entre le soluté et la phase stationnaire, la troisième entre les deux phases. La surface ou la hauteur du pic chromatographique est proportionnelle à la masse ou à la concentration du produit injecté [96].

2.4.2. Temps mort

Le temps mort est le temps nécessaire pour qu'un composé non retenu traverse la colonne ; il est noté t_m ou t_o et exprimé en minutes.

$$t_m = t_o = L / V$$

Avec:

L : la longueur de la colonne.

V : la vitesse de la phase mobile [95].

2.4.3. Volume de rétention

C'est le volume de la phase mobile nécessaire pour éluer un composé d'un mélange à analyser. Ce volume est caractéristique d'un seul composé dans des conditions opératoires données. Il est lié au temps de rétention t_r d'un soluté et au débit d'écoulement de la phase mobile D . Le volume de rétention est noté V_r [95].

$$V_r = t_r \cdot D$$

2.4.4. Facteur de rétention k'

Le facteur de rétention k' représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire. C'est un paramètre important indépendant du débit de la phase mobile et des dimensions de la colonne. Si pour deux analyses identiques, dans les mêmes conditions opératoire, on obtient deux valeurs de temps de rétention identiques et deux valeurs de k' différentes, cela signifie qu'il y a une fuite de phase mobile avant la colonne. Et si on a deux valeurs de t_r et deux valeurs de k' différentes, ce qui indique qu'il y a des problèmes au niveau de la phase mobile ou phase stationnaire [96].

$$k' = (t_r - t_m) / t_m$$

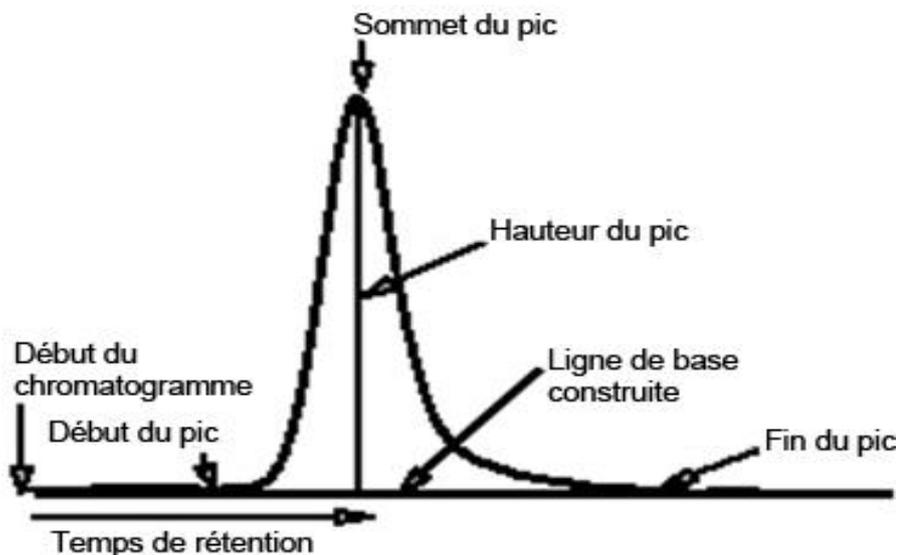


Figure 42 : Structure d'un pic chromatographique

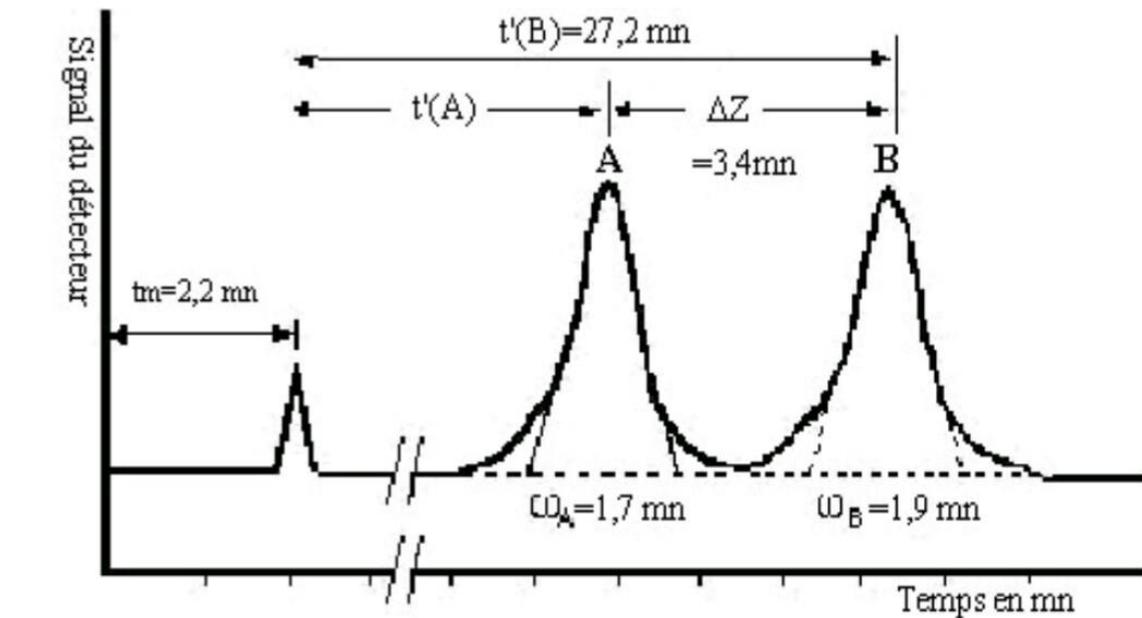


Figure 43 : Exemple d'un chromatogramme

2.5. Aperçu sur les paramètres chromatographiques de séparation

❖ la phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations:

- Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire, la chromatographie est dite dans ce cas en phase normale.
- Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire, c'est la chromatographie en phase inverse.

En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention des composés.

Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec la phase normale. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions, les hydrocarbures sont fortement retenus. On peut réaliser des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant. On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile.

La phase mobile est l'un des principaux facteurs influençant sur la séparation des solutés. Le Type de phase mobile utilisée peut avoir un grand effet sur la rétention. La principale exigence pour la phase mobile est qu'elle doit dissoudre les analytes à la concentration appropriée pour la détection ; les solvants qui compose la phase mobile doivent être miscibles [97].

❖ La polarité des solvants

Si la phase stationnaire est polaire, on utilise une phase mobile apolaire c'est la chromatographie en phase normale. Si la phase stationnaire est apolaire, on utilise une phase mobile polaire, on parle de la chromatographie en phase inversée. Les solvants utilisés pour HPLC sont classés suivant leur polarité et leur force éluante. La polarité de la phase mobile augmente par l'ajout d'un solvant organique tel que le méthanol ou l'acétonitrile qui sont principalement utilisés pour l'analyse par la HPLC [98].

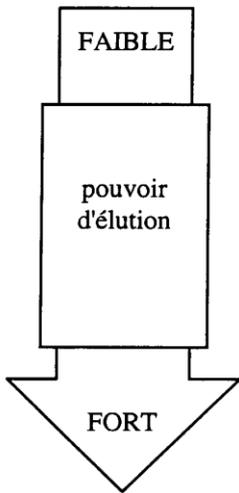
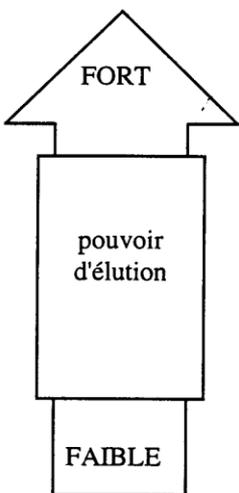
phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

Figure 44 : Sens d'évolution de la polarité des solvants [98].

❖ Teneur en solvant organique dans la phase mobile

On fait varier la polarité et la tension superficielle de la phase mobile avec la teneur en solvant organique. On joue à la fois sur les temps de rétention t_r et sur les facteurs de rétention k' donc sur la qualité de la séparation.

Il existe souvent une corrélation linéaire dite équation d'Everett entre les logarithmes des facteurs de rétention et le logarithme de la teneur en solvant organique. L'augmentation de la teneur en solvant organique x permet généralement de raccourcir les temps de rétention et donc de diminuer la durée d'analyse. Si les valeurs de k' sont proches, les composés sont alors moins bien séparés [98].

$$\text{Log } k' = a \log x + b$$

Avec :

X : la teneur en solvant organique exprimée en pourcentage volumique.

➤ **Le pH de la phase mobile**

Il est important de contrôler le pH de la phase mobile. En effet, en chromatographie liquide à haute performance de phase inversée, la rétention augmente avec l'hydrophobicité des produits. Les composés ionisables sont donc plus retenus sous leur forme neutre que sous leur forme ionique. L'ionisation étant un phénomène dépendant du pH, il est donc important de tester l'influence de ce facteur sur la rétention [99].

➤ **Débit de la phase mobile**

Le temps de rétention des solutés dépendent du débit d'écoulement de la phase mobile. Plus le débit est élevé, plus les temps de rétention seront réduits et par conséquent la durée de l'analyse de l'échantillon sera diminuée. Pour accélérer l'analyse, on peut augmenter le débit, mais pas trop car cela provoque des inconvénients telles que [99] :

- ✓ Une augmentation élevée du débit de la phase mobile entraîne une augmentation de la pression. Il ne faut pas élever le débit pour que l'efficacité de la colonne reste correcte.
- ✓ Une augmentation du débit provoque une grande consommation rapide de l'éluant.

❖ **Mise au point d'une séparation par la chaîne HPLC**

Après avoir préparé l'échantillon et choisi le type de chromatographie (partage, phase inversée, exclusion, diffusion...), la mise au point d'une méthode de séparation chromatographique se fait par étape:

- ❖ Obtenir un débit d'écoulement de la phase mobile correspond à une séparation dans un délai de temps acceptable.

- ✓ Ajuster la sélectivité en agissant sur la composition de la phase mobile et sur son pH.
- ✓ Optimiser la méthode en influant sur le débit d'écoulement de l'éluant, le pH, la phase stationnaire et des autres paramètres.

La méthode analytique finale optimisée donne ainsi des pics de bonne résolution supérieure à l'unité.

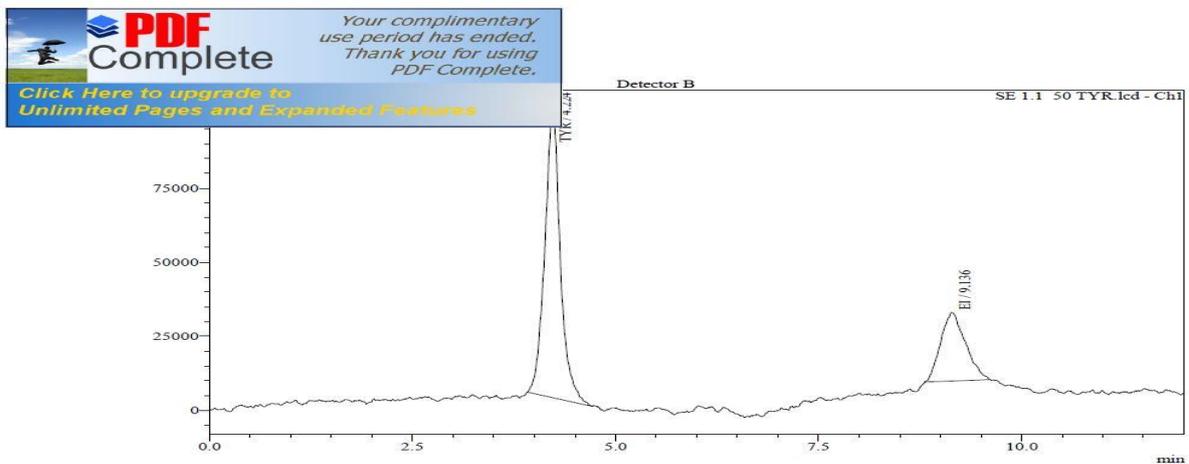
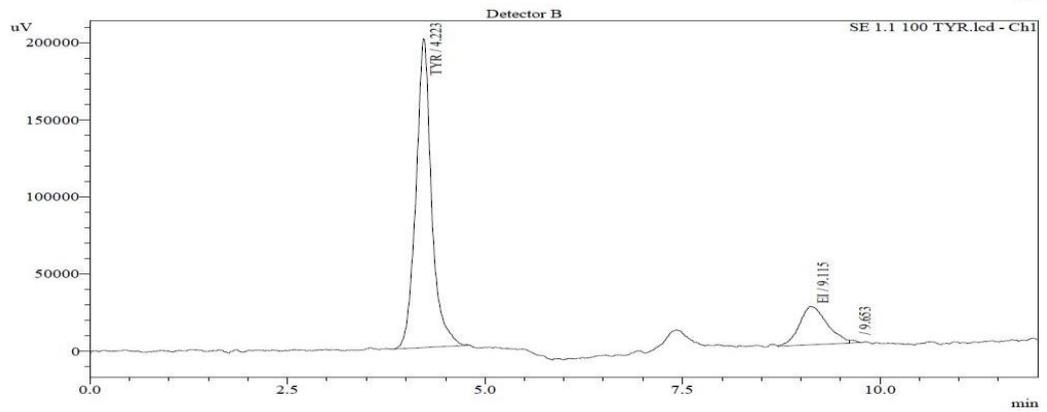
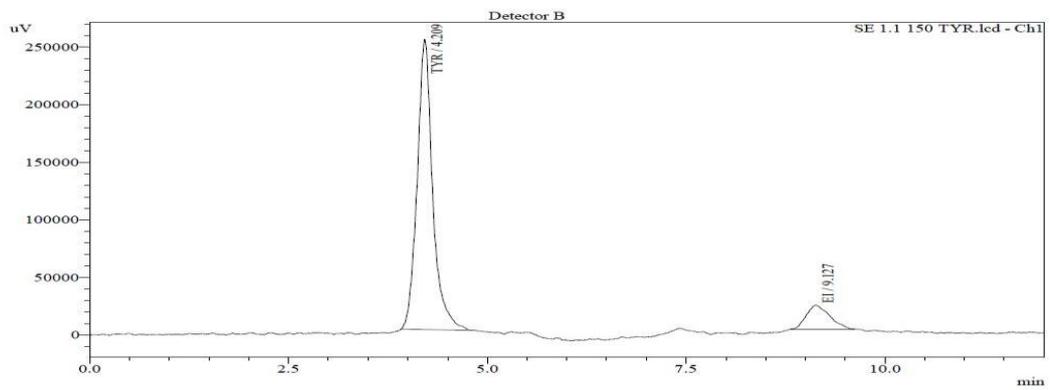
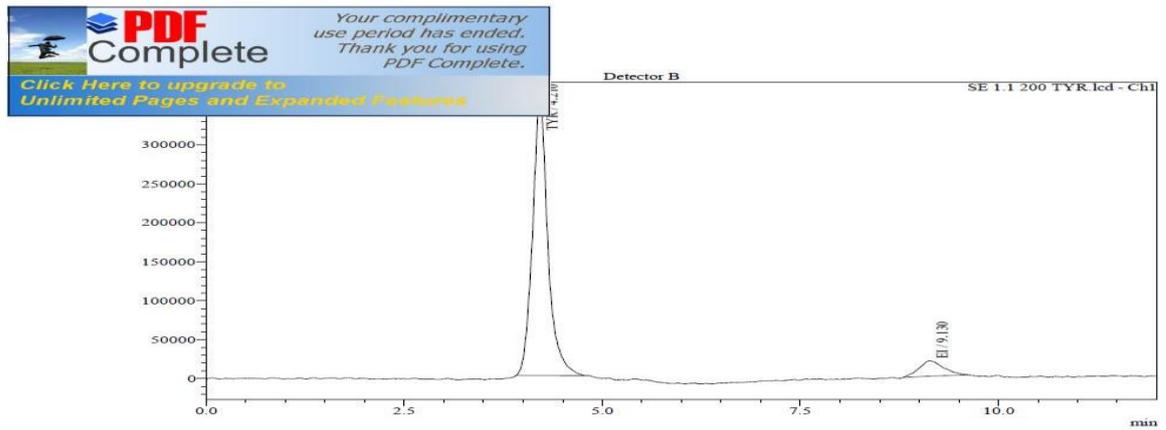
Pour mettre au point une méthode chromatographique pour analyser les produits pharmaceutiques, il est conseillé d'utiliser la chromatographie liquide à haute performance en phase de polarité inversée en utilisant généralement des colonnes C18 ou C8 à température ambiante, avec un débit variant entre 1 et 2 mL /min compatible avec la pression en tête de la colonne. Une large plage de composition de la phase mobile à base de méthanol ou d'acétonitrile peut convenir. Pour atteindre une séparation convenable le plus vite possible, il vaut mieux débiter avec une force éluante importante. Lorsque la phase mobile contient 100% de méthanol ou d'acétonitrile. Si on utilise le modificateur organique entre 80% et 90%, la force éluante est souvent encore trop importante et par conséquent tous les composés sortent proche du front de solvant (temps mort) et tous ne sont pas bien séparés

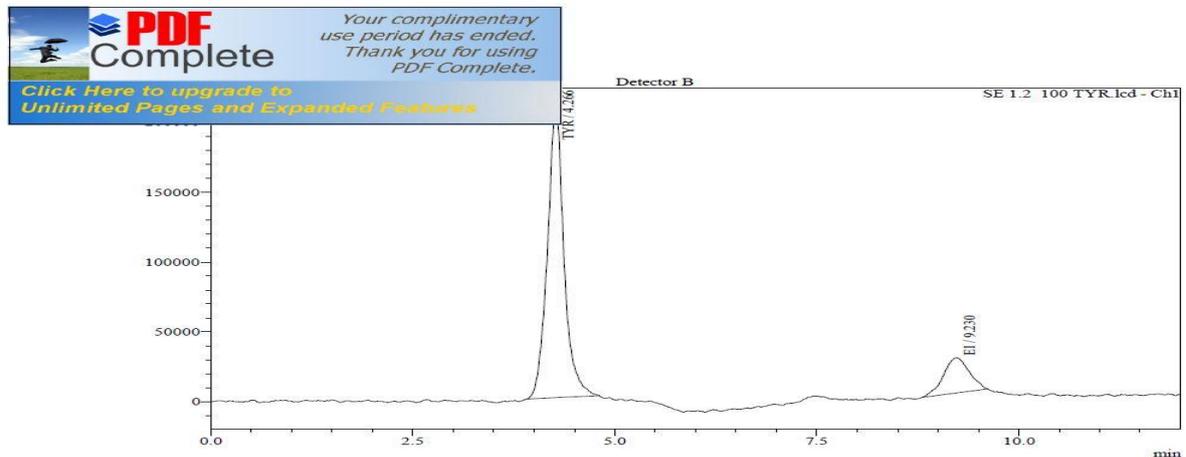
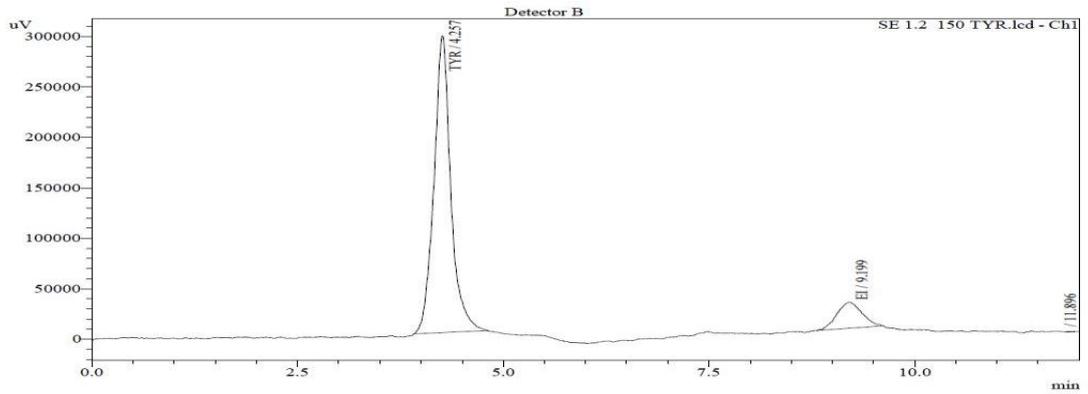
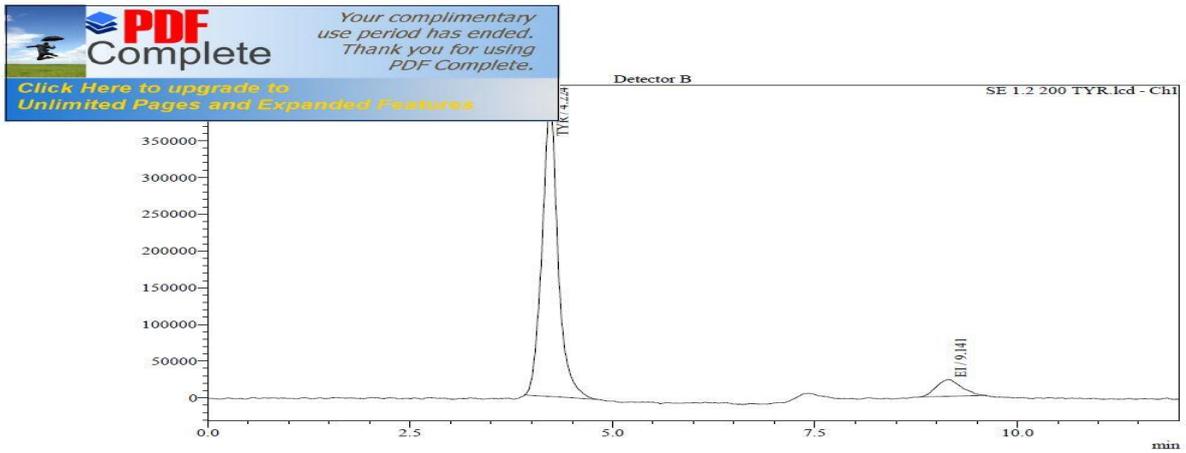
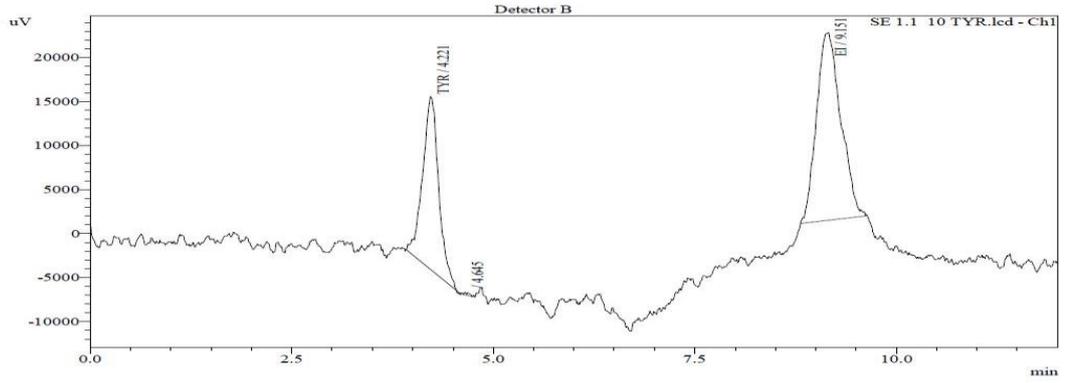
Une bonne méthode consiste à diminuer la teneur en solvant organique. Pour cette raison, on doit ainsi balayer rapidement la plage de la force éluant de la phase mobile [100].

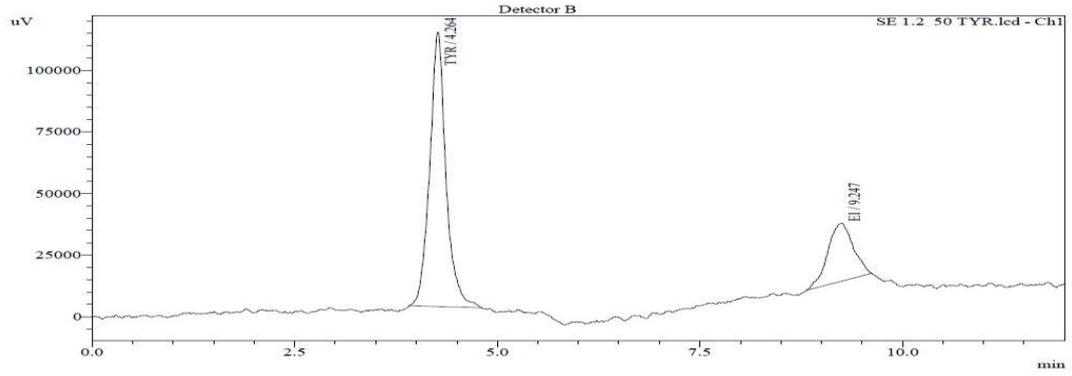
An orange scroll graphic with a white background and a thin orange border. The scroll is unrolled in the center, with the top and bottom edges curving upwards and downwards respectively. The text is centered on the white background.

ANNEXE II
DONNEES BRUTES DE LA
VALIDATION ANALYTIQUE

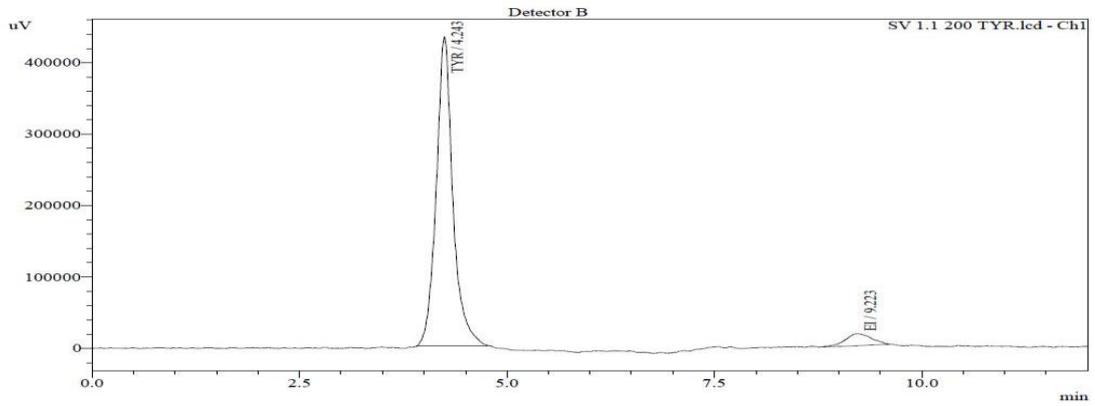
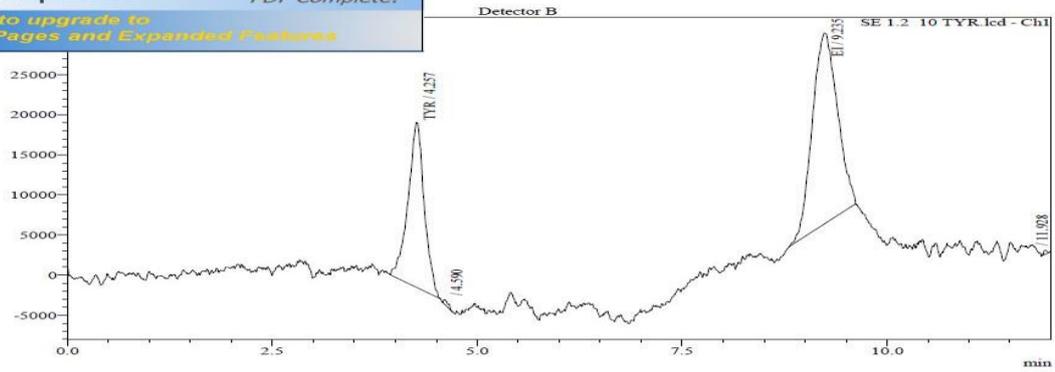
JOUR I (SERIE I)



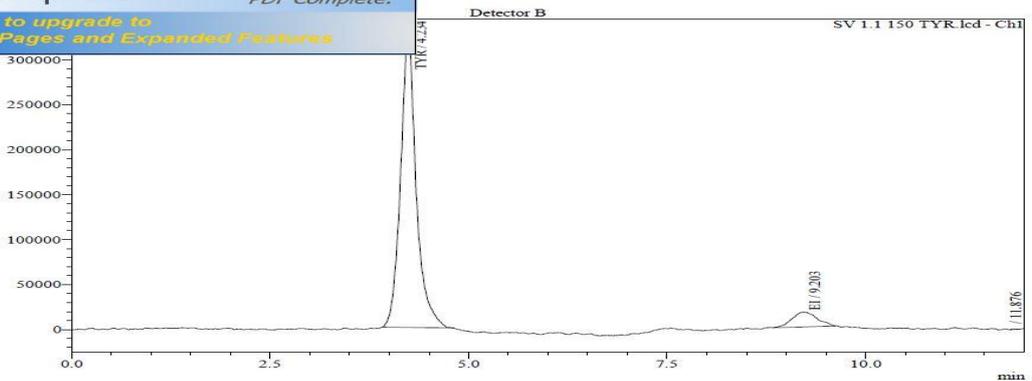


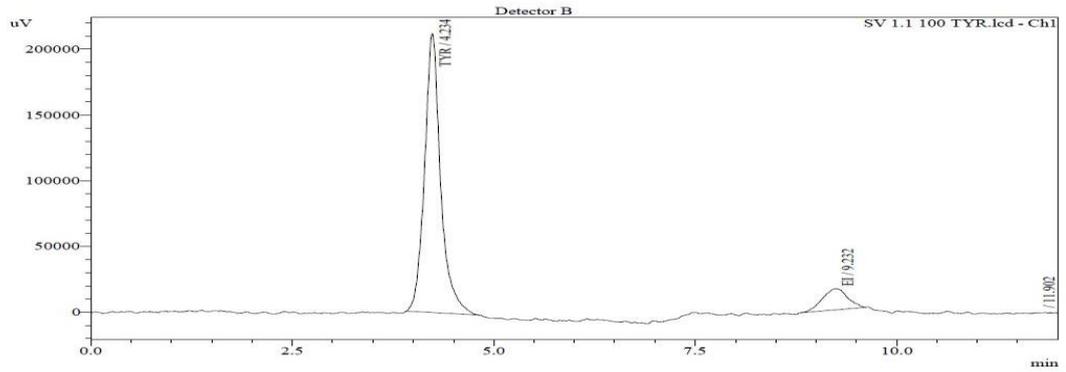


PDF Complete
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

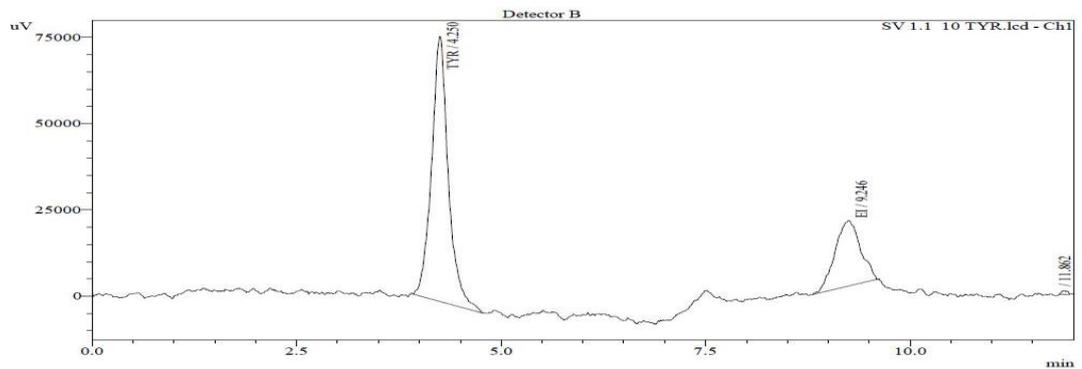
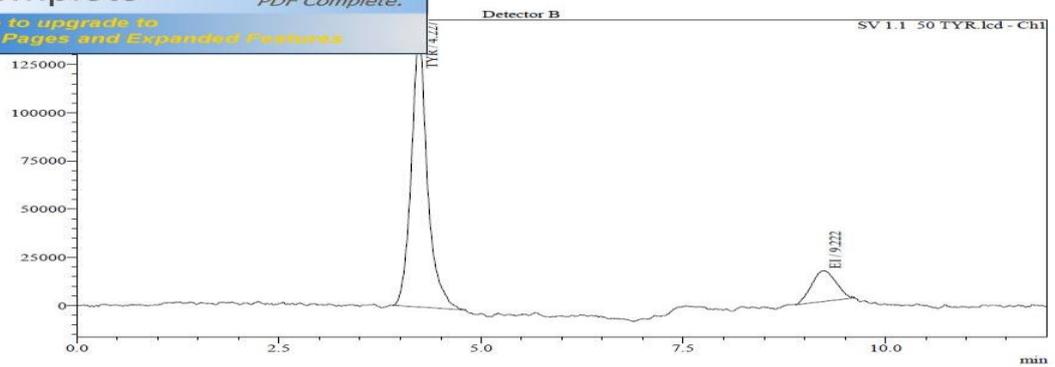


PDF Complete
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

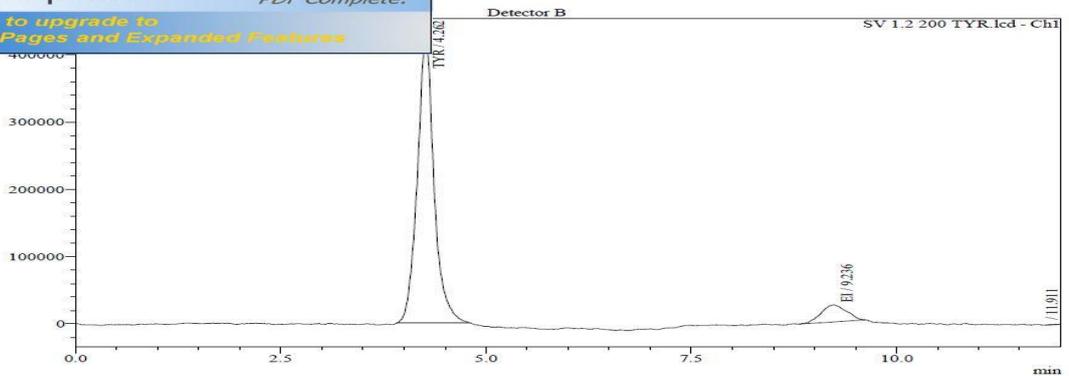


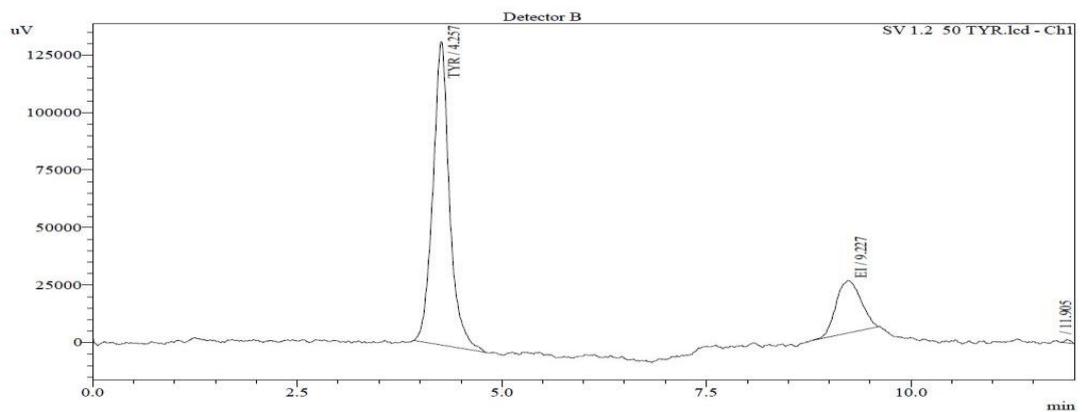
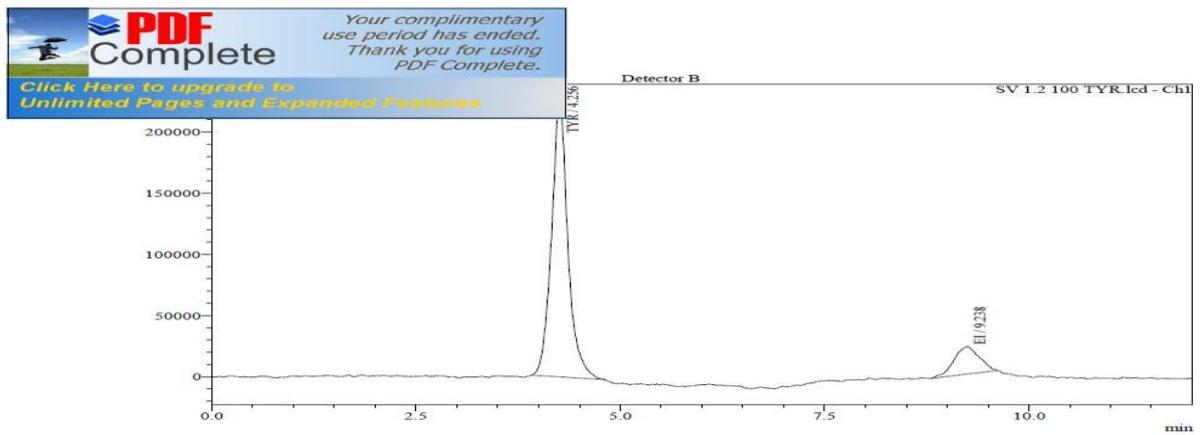
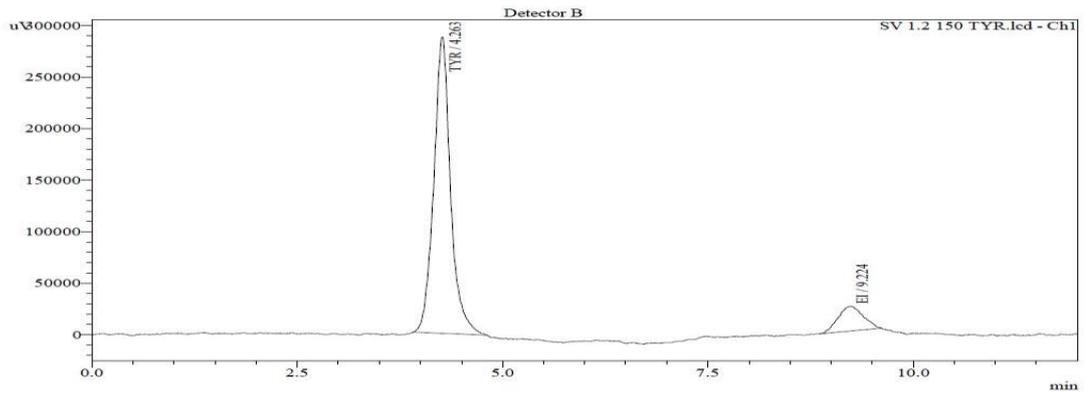


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

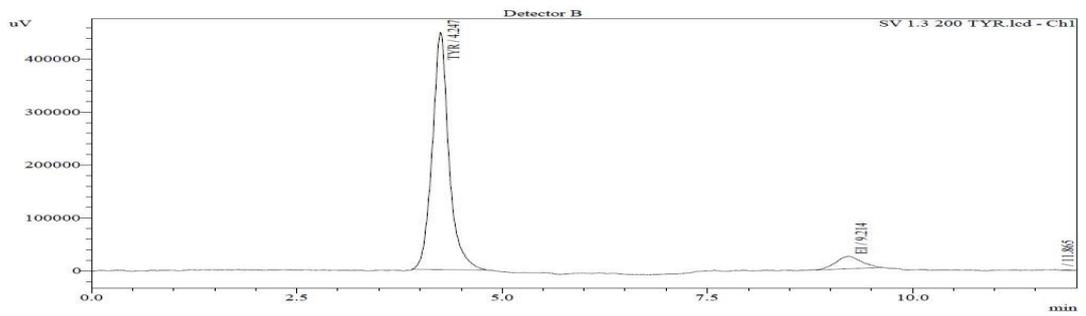
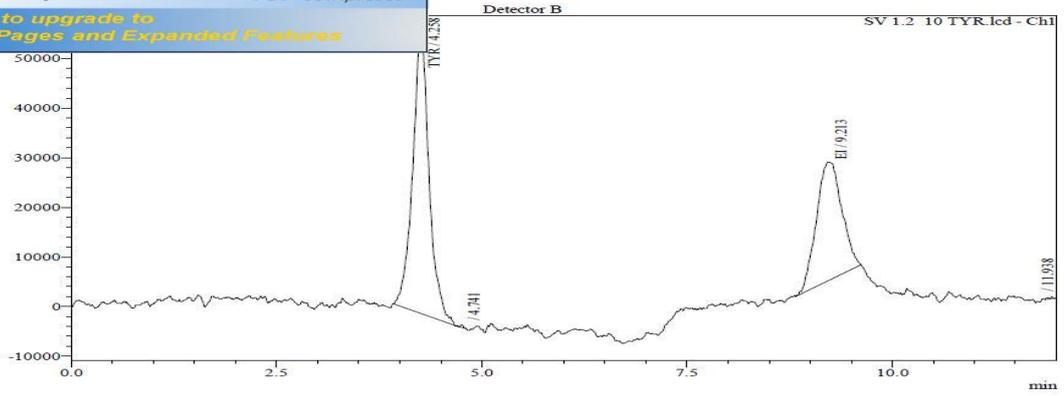


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

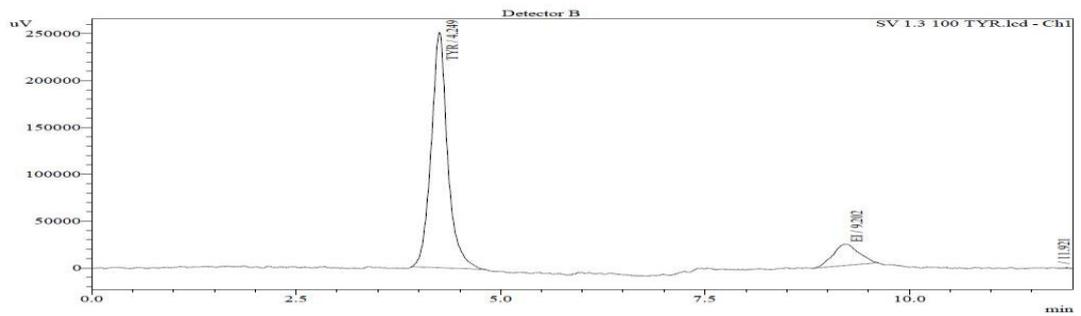
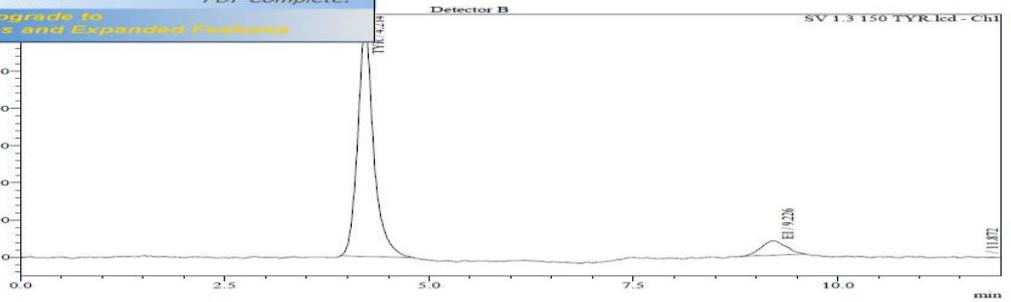


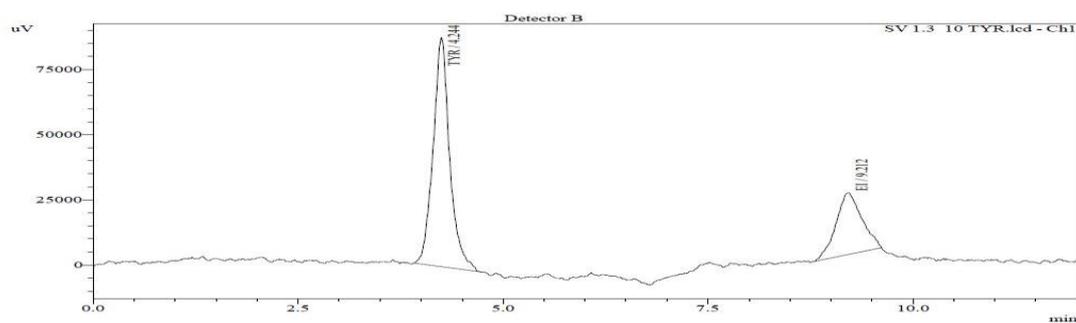
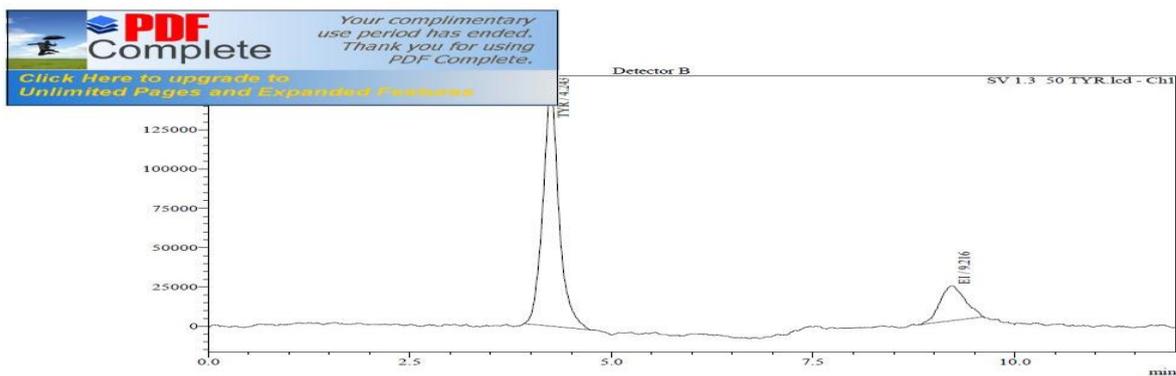


PDF Complete
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

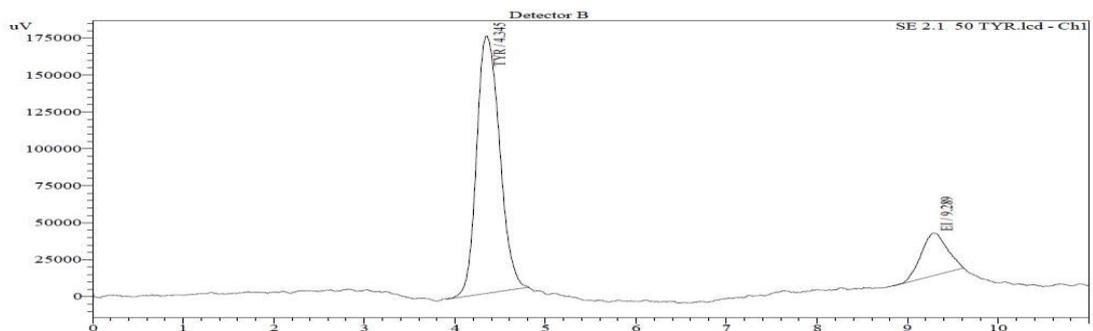
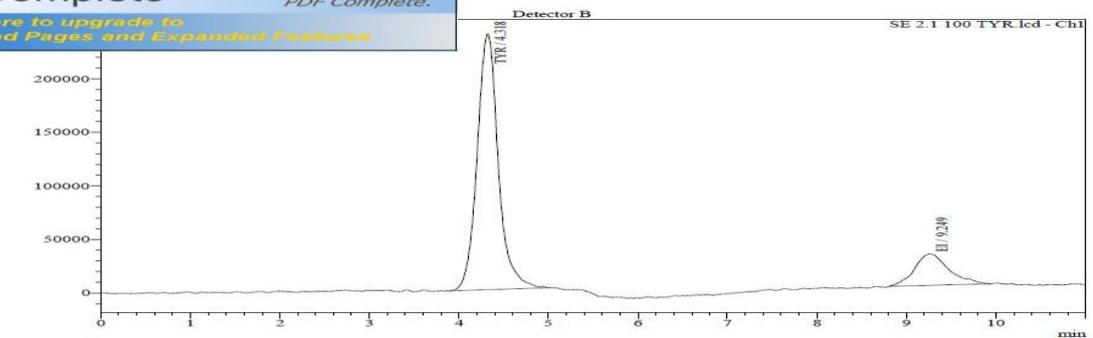
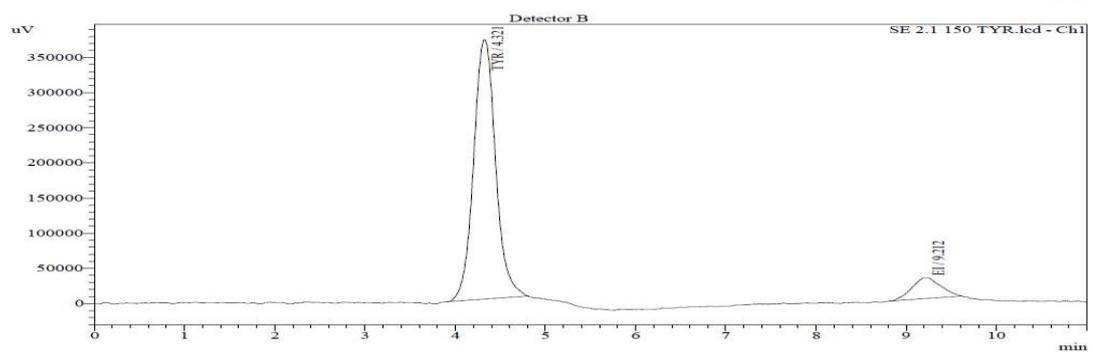
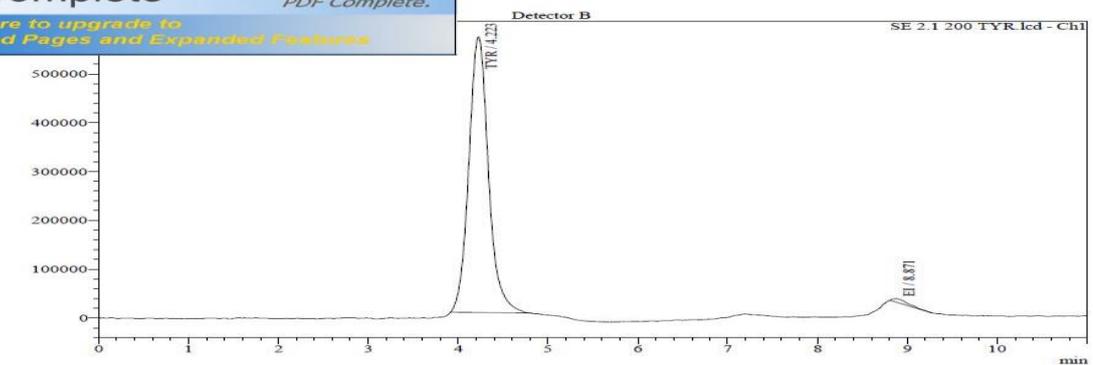


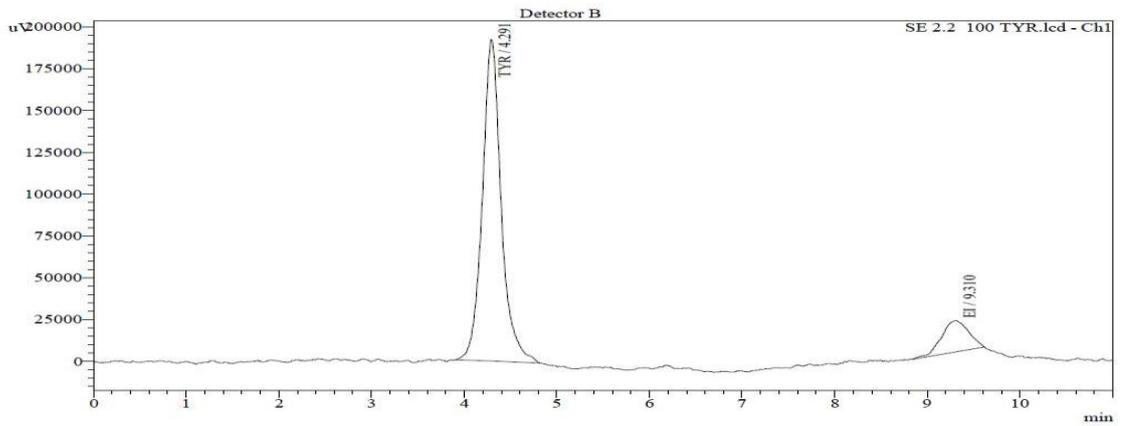
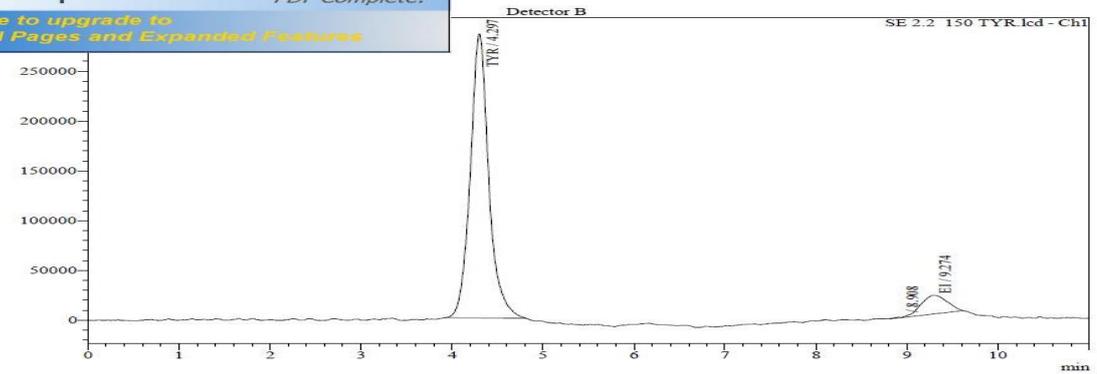
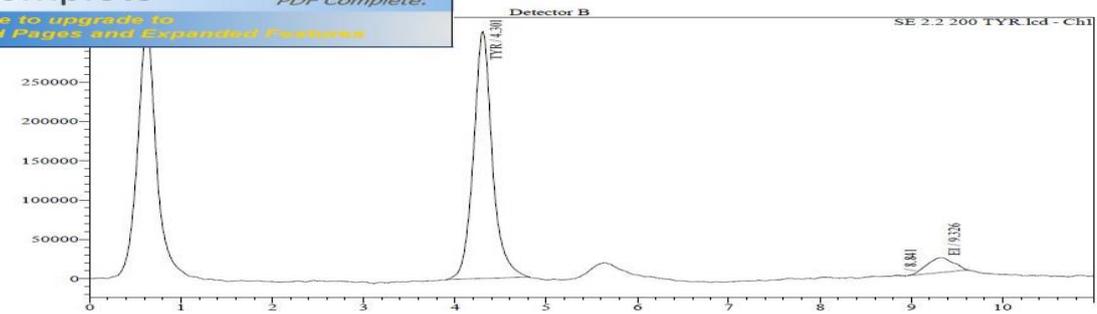
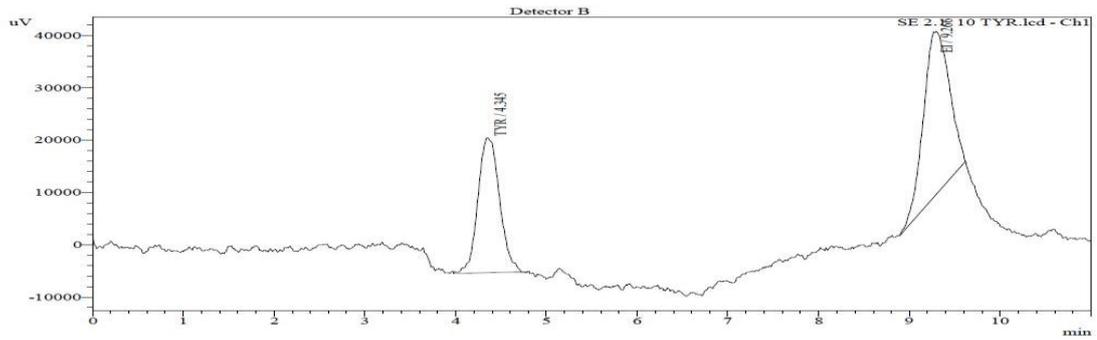
PDF Complete
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



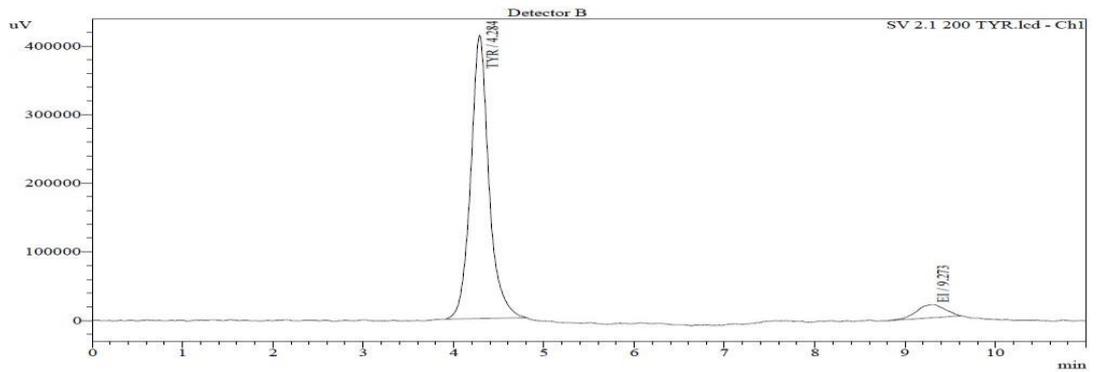
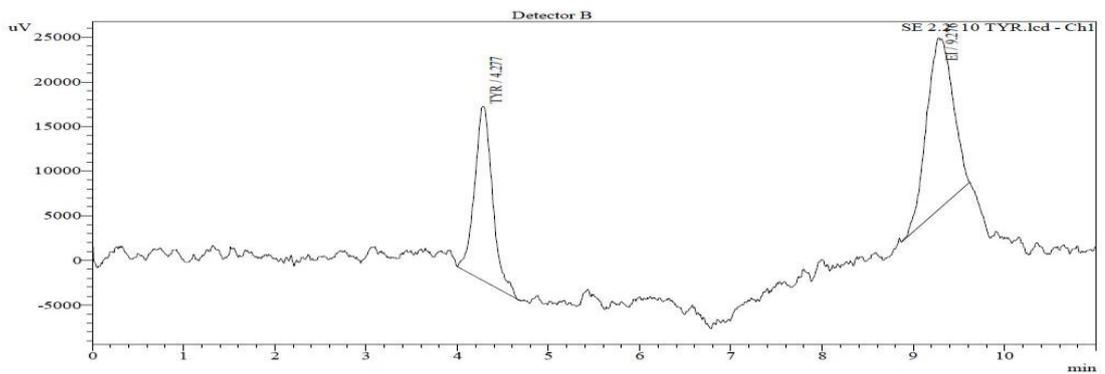
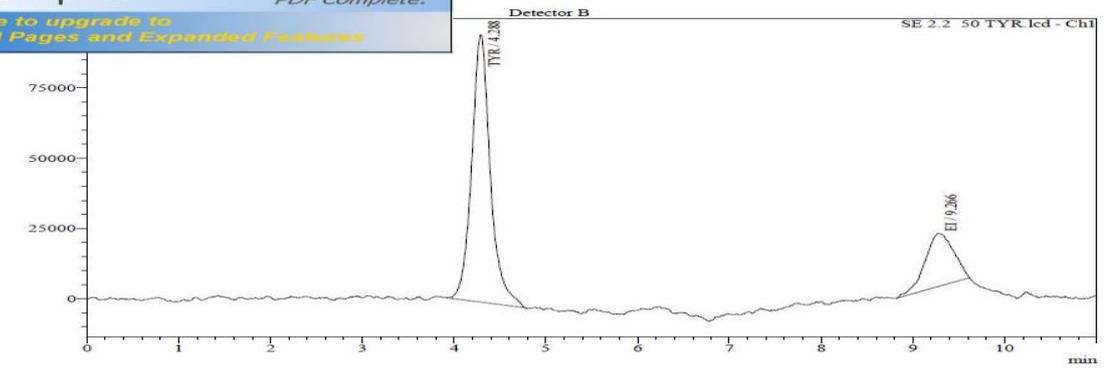


JOUR II (SERIE II)

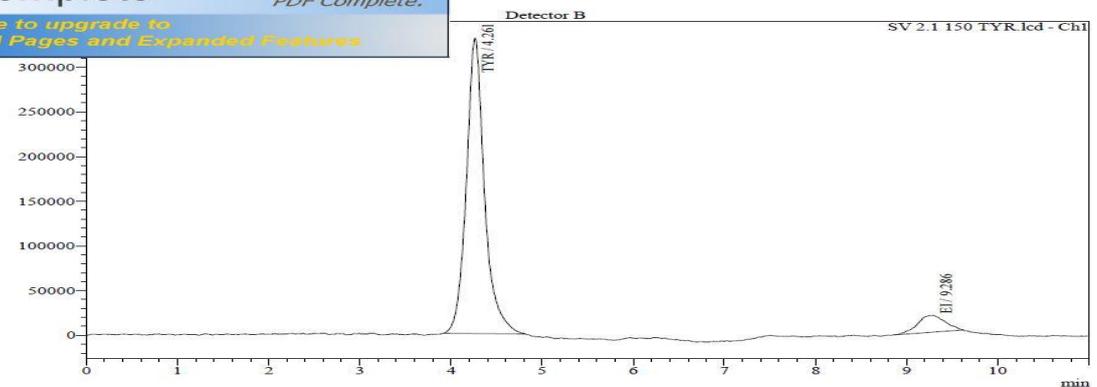


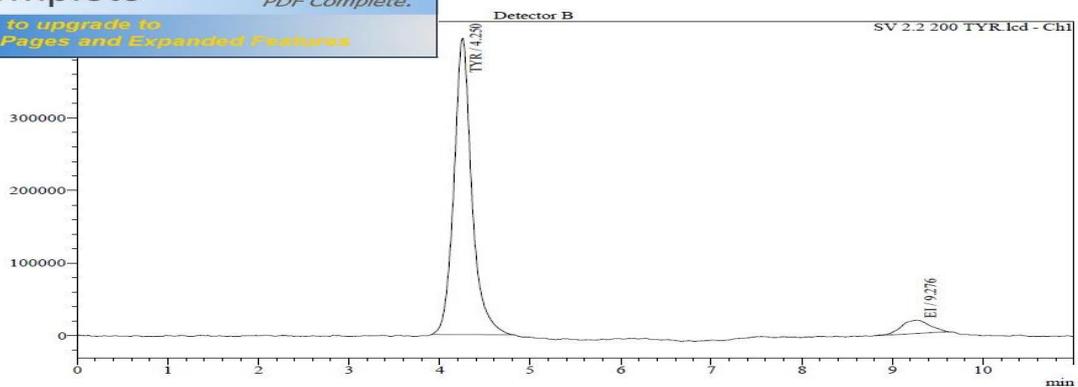
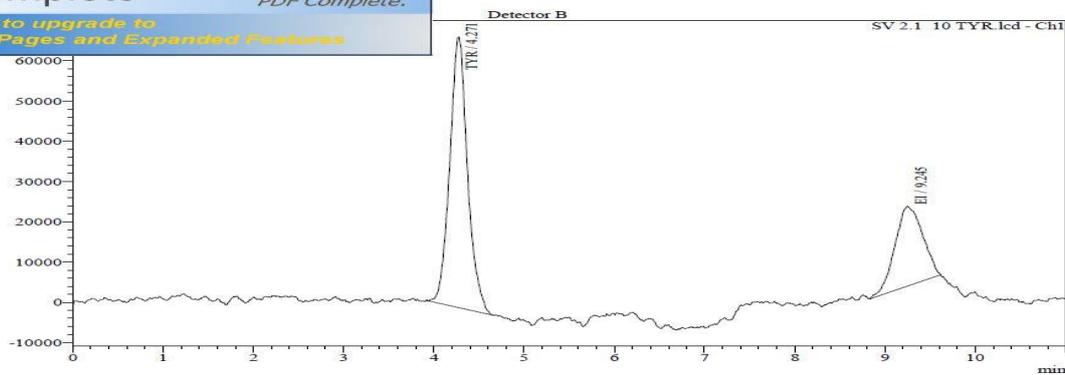
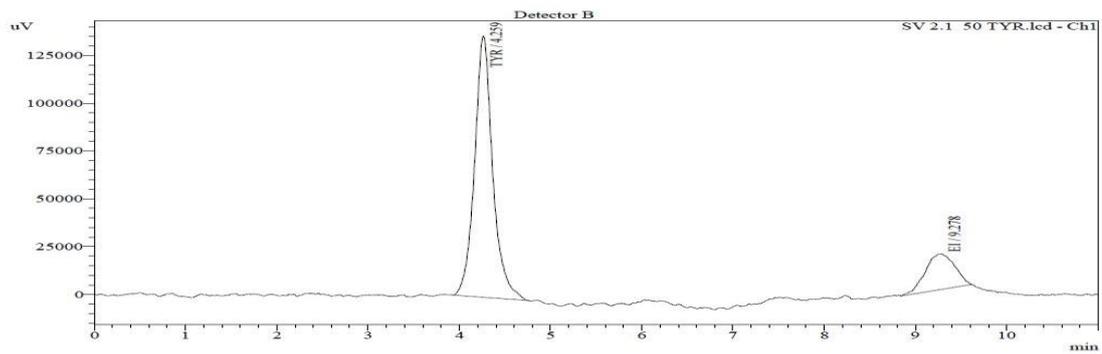
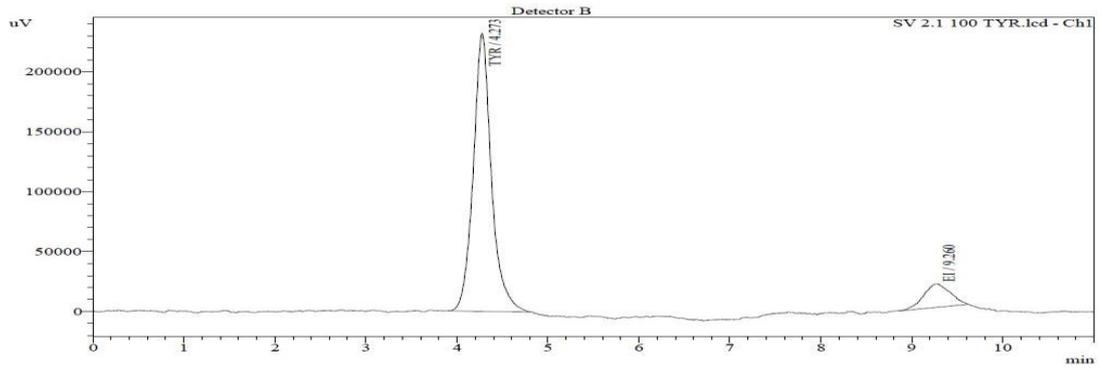


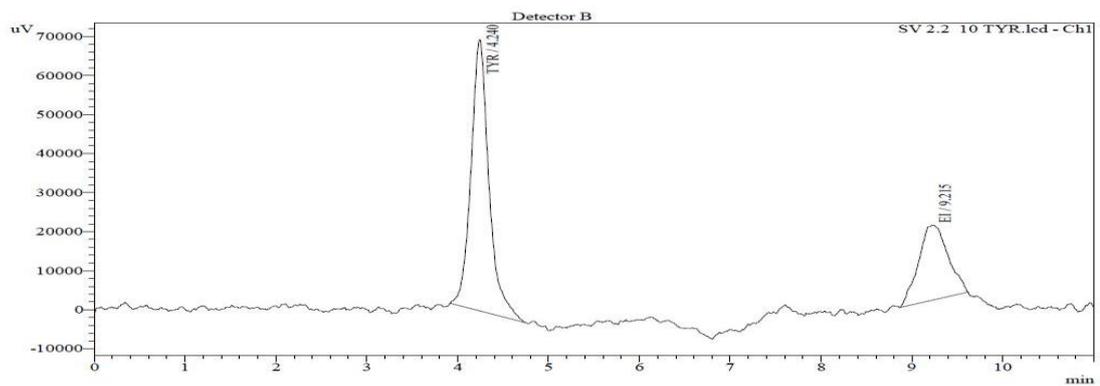
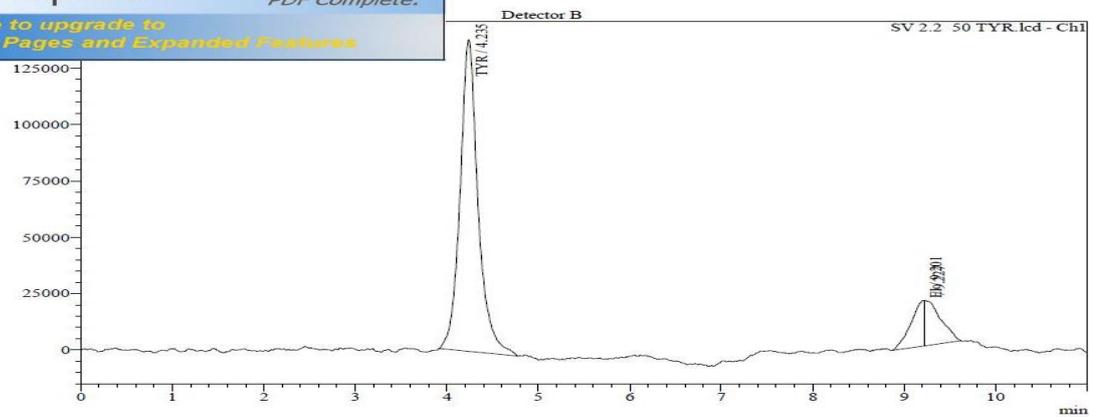
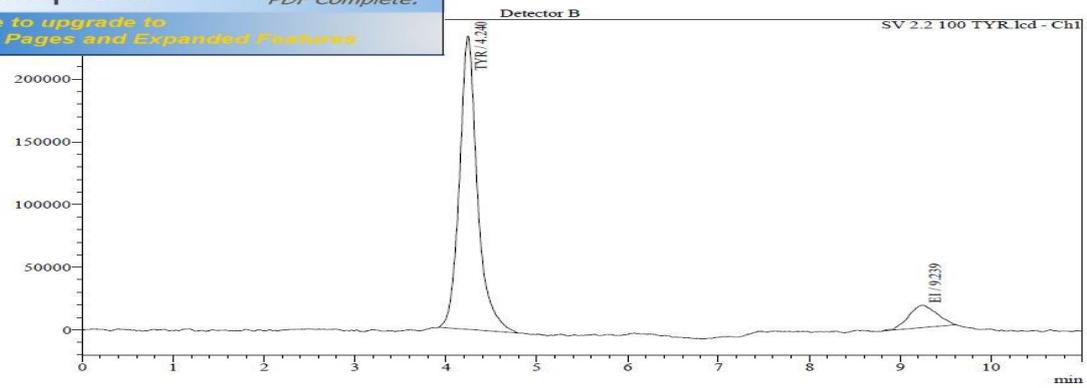
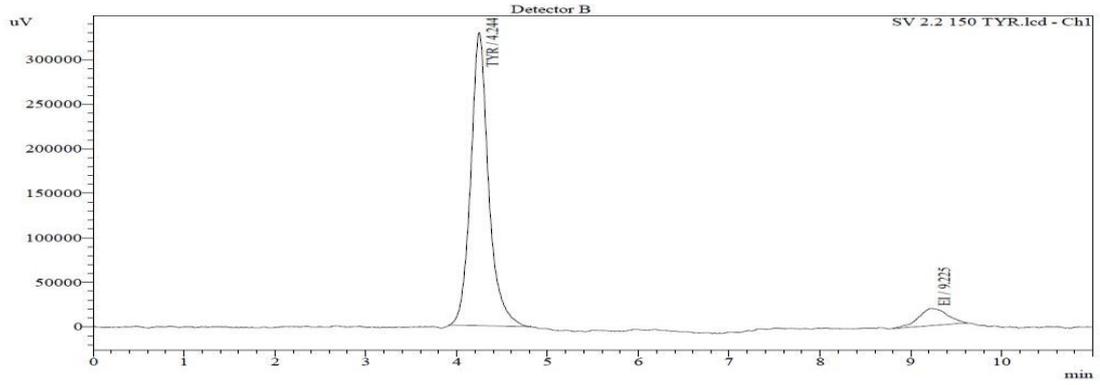
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

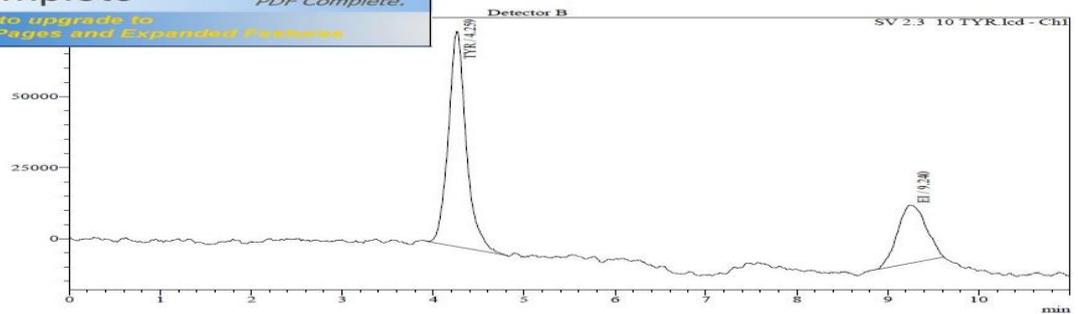
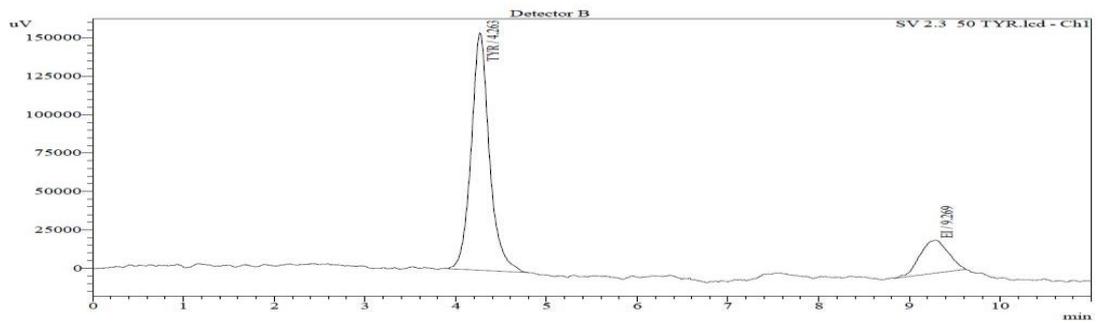
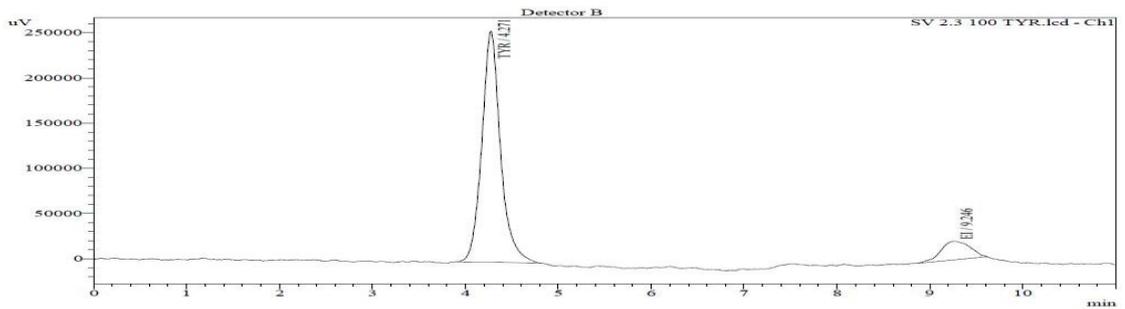
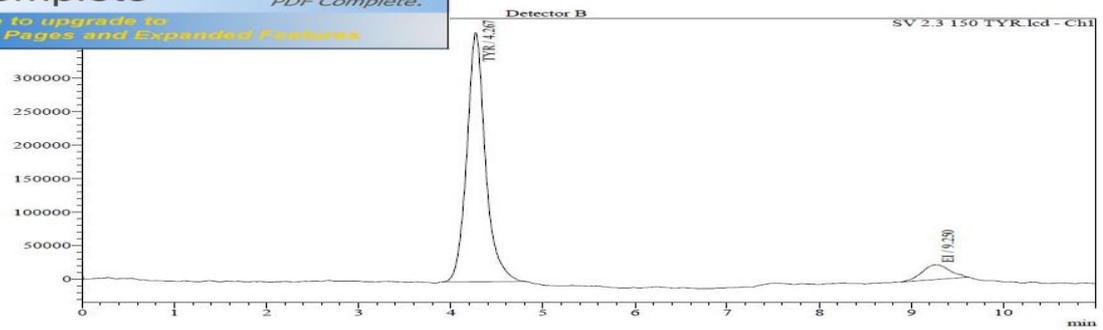
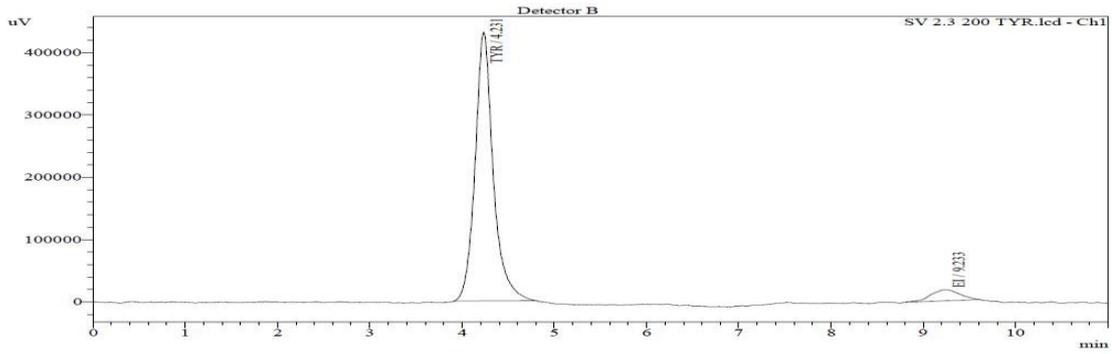


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

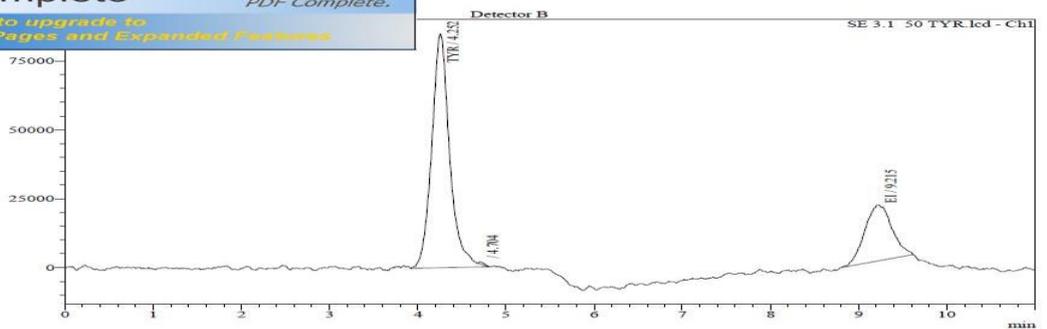
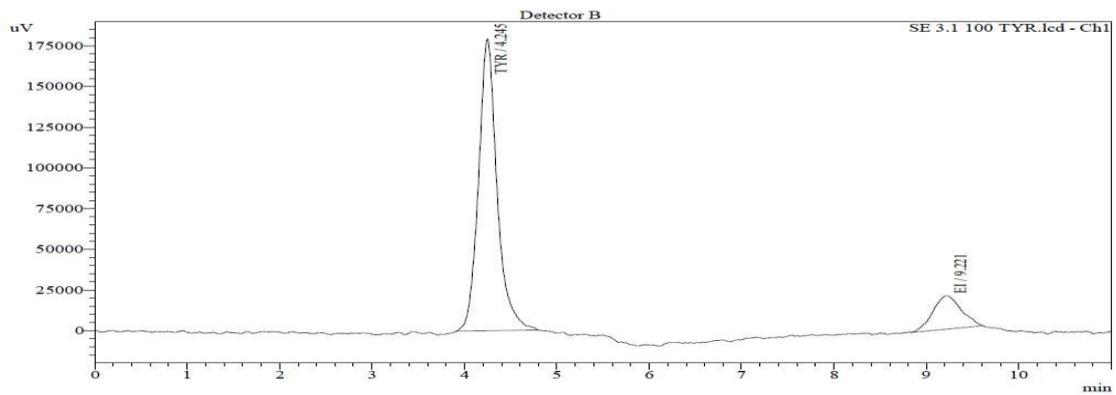
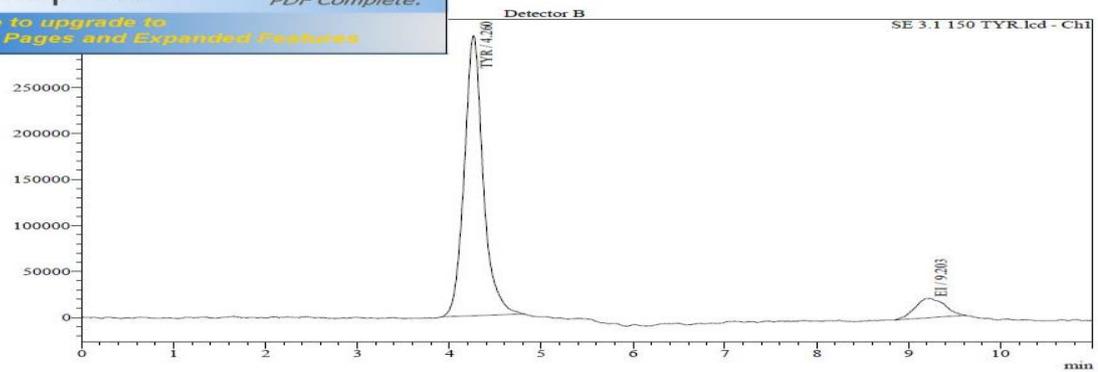
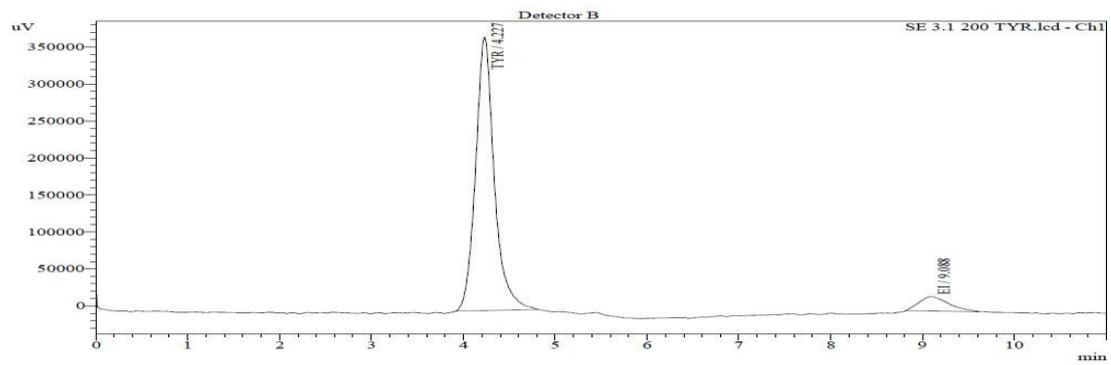


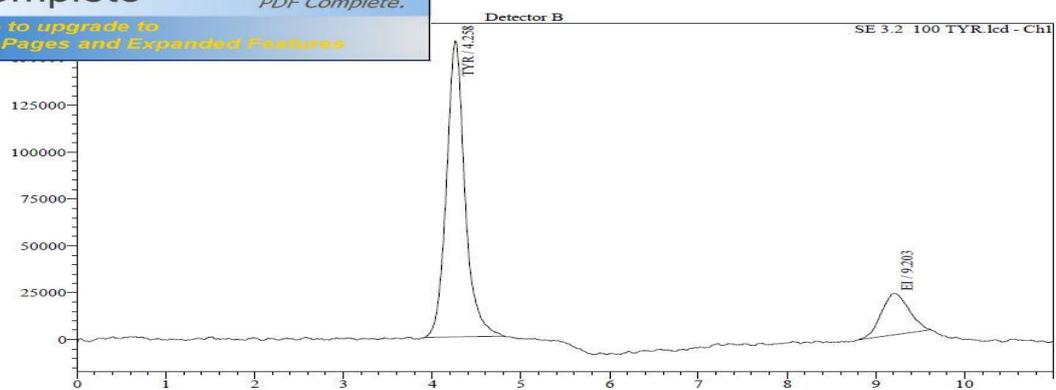
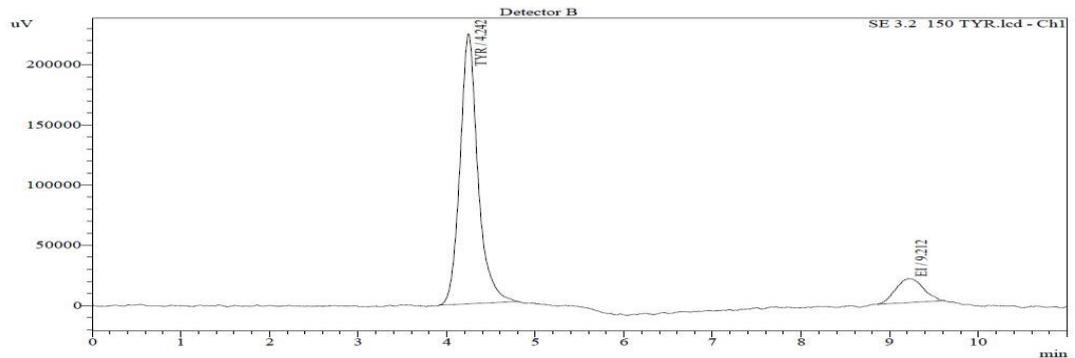
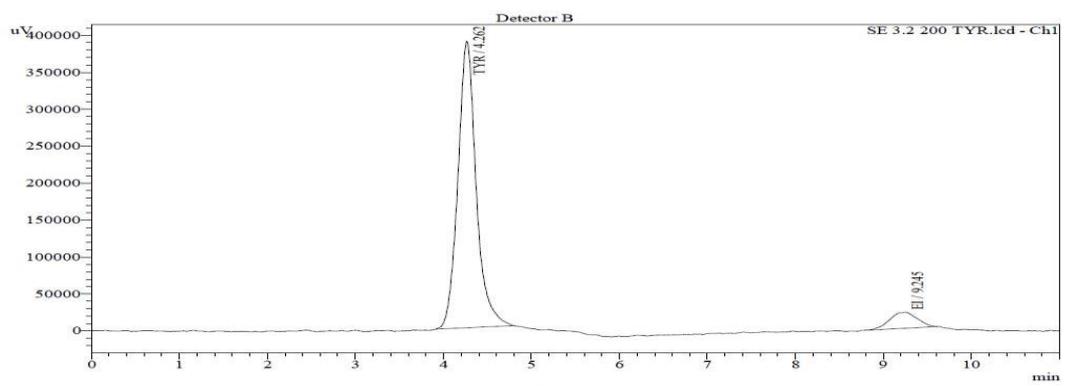
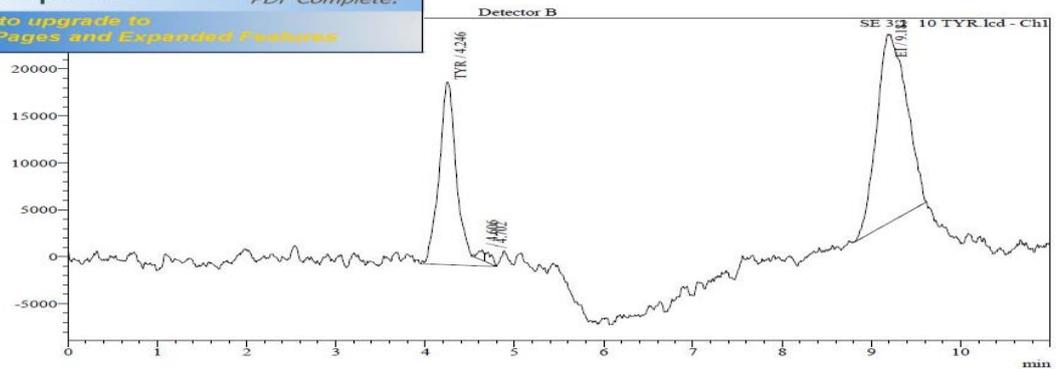


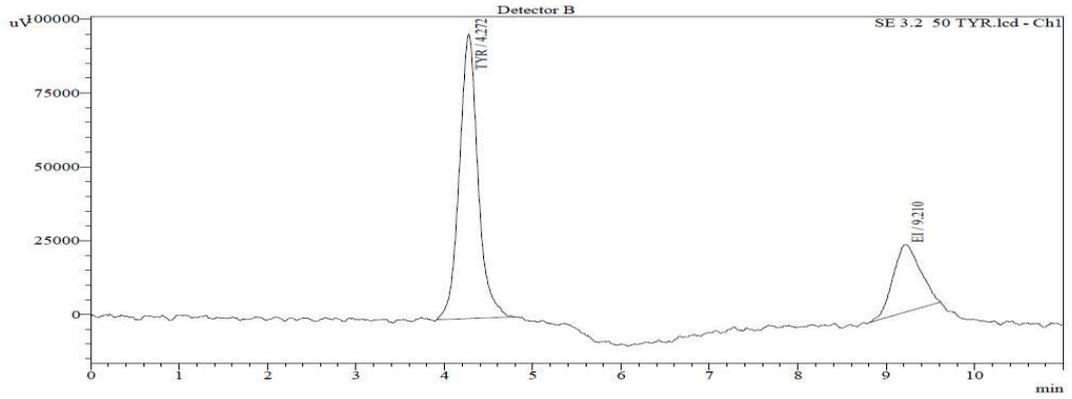




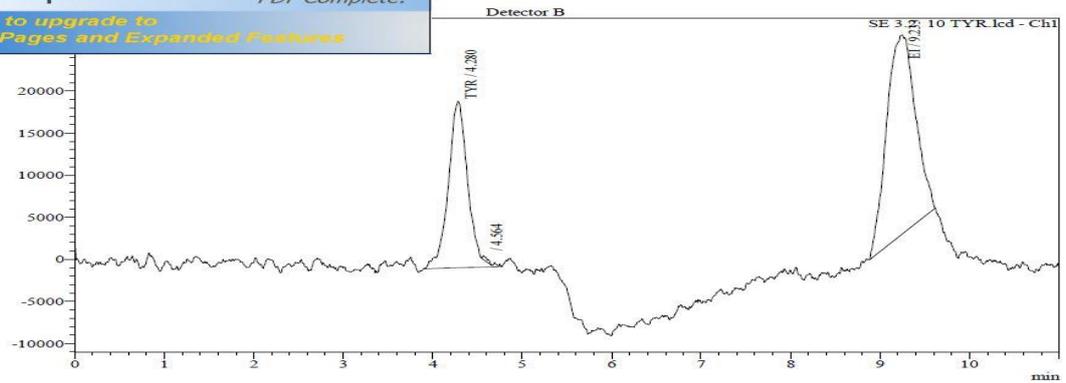
JOUR III (SERIE III)



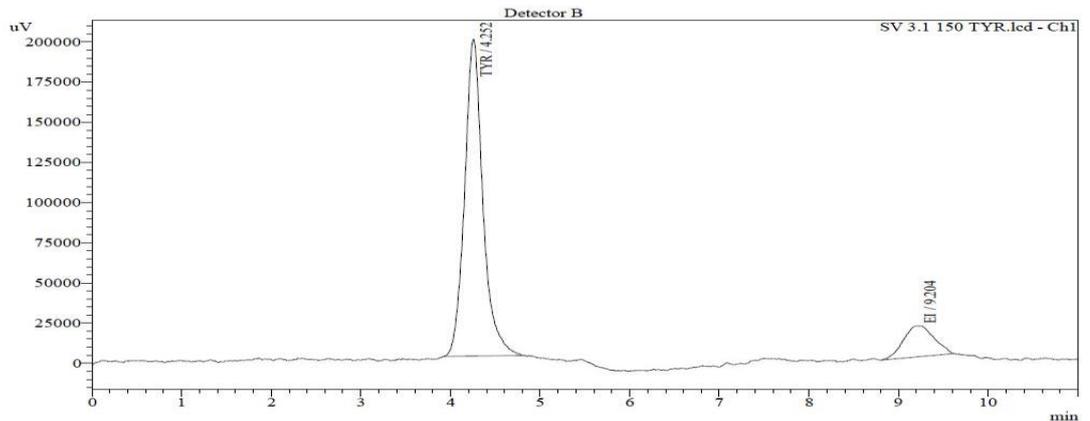
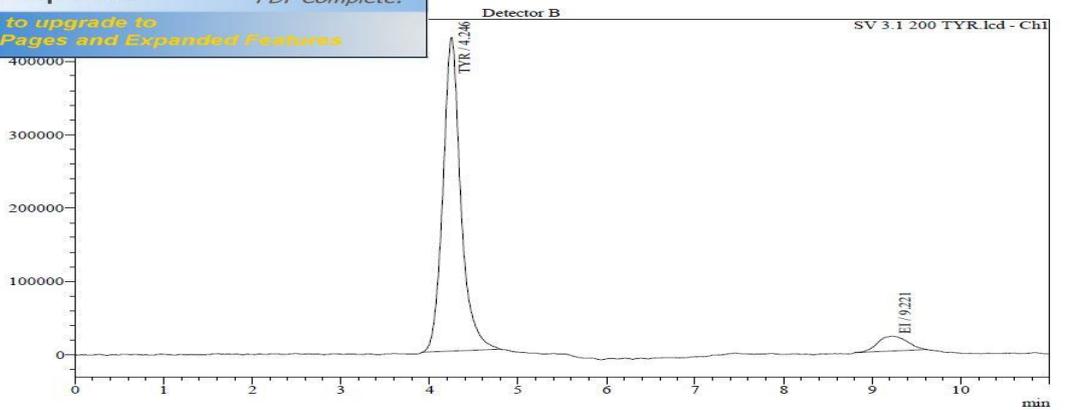




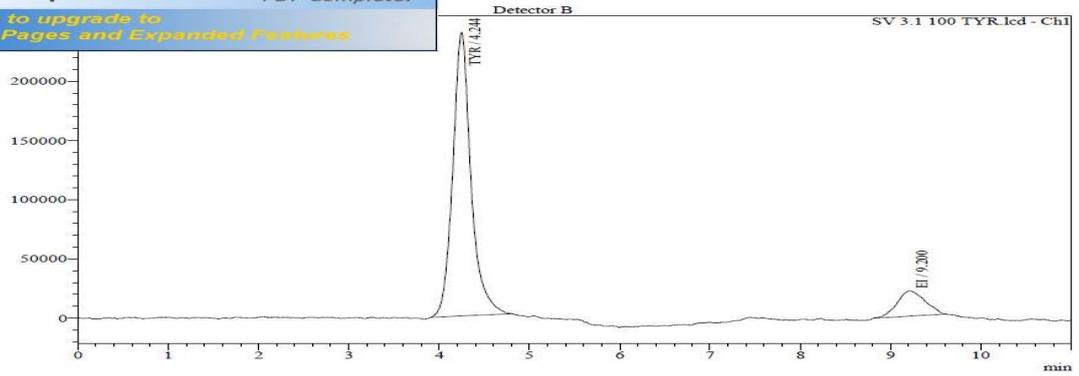
PDF Complete
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



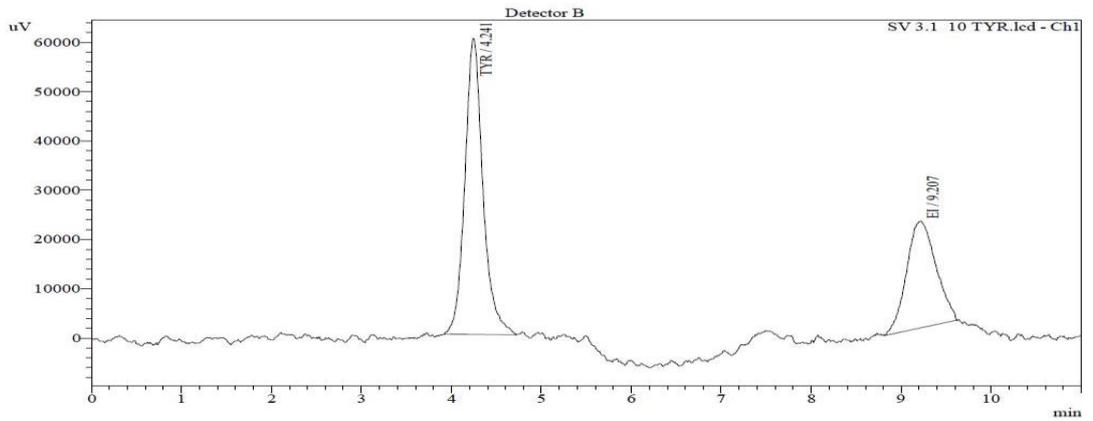
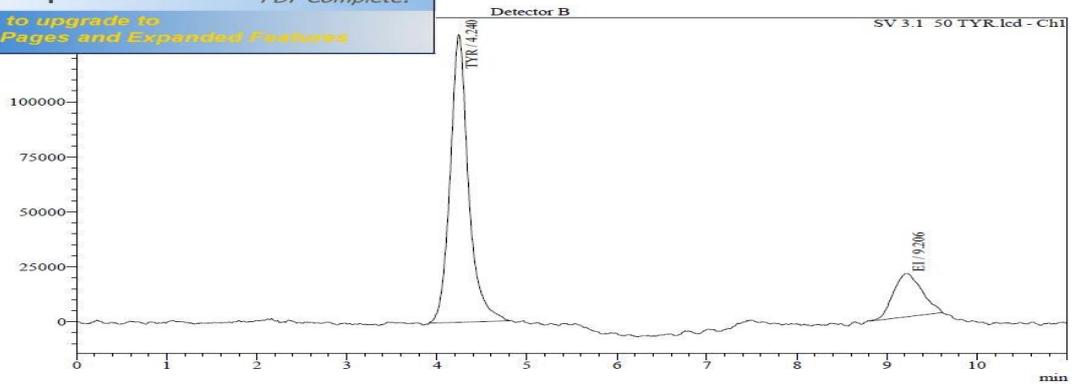
PDF Complete
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



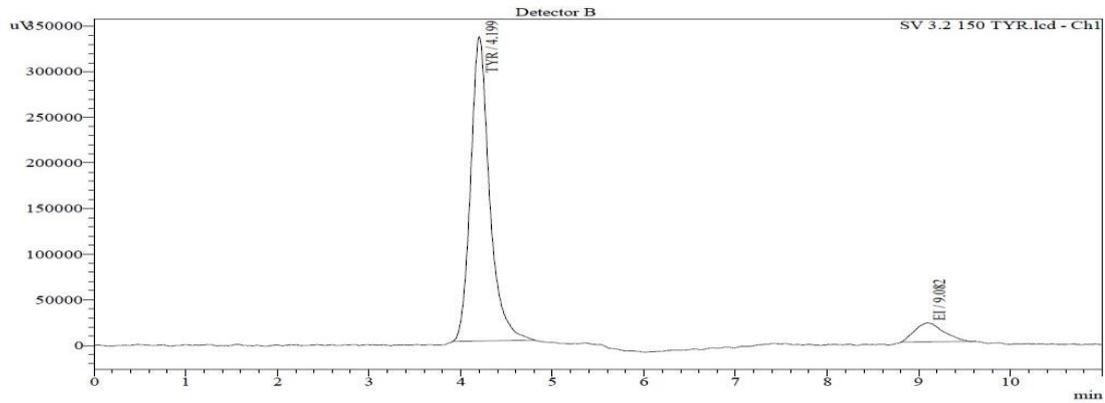
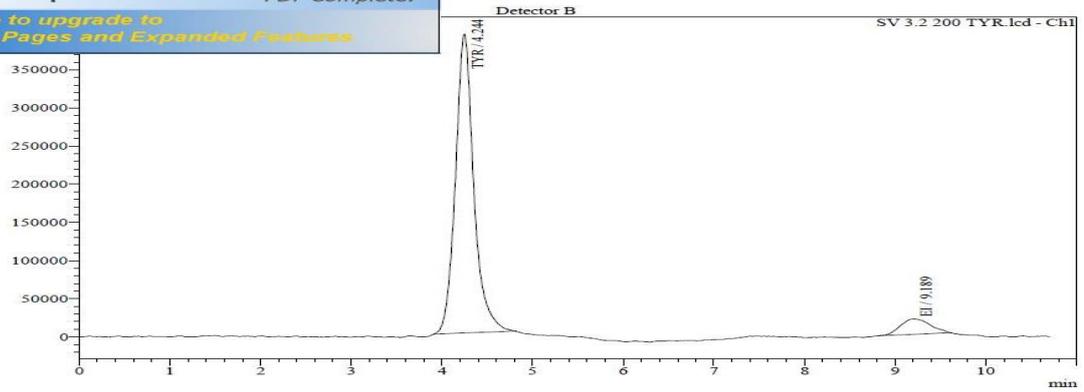
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



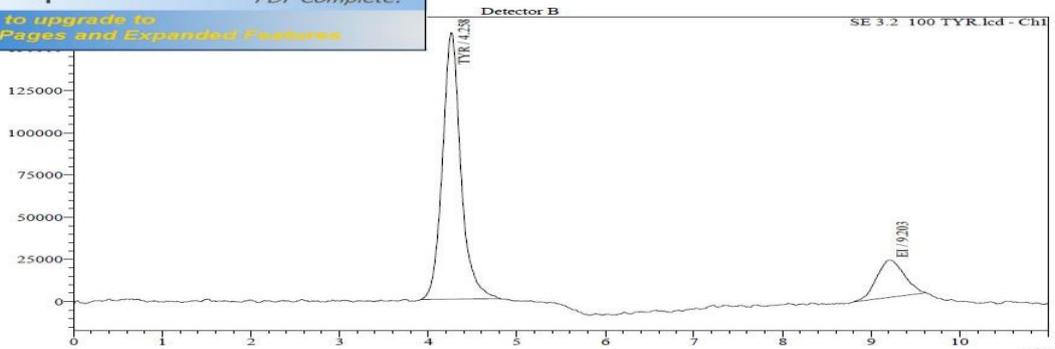
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

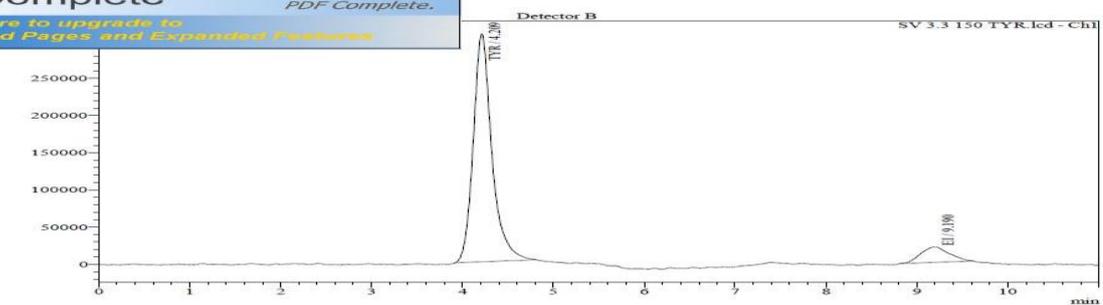
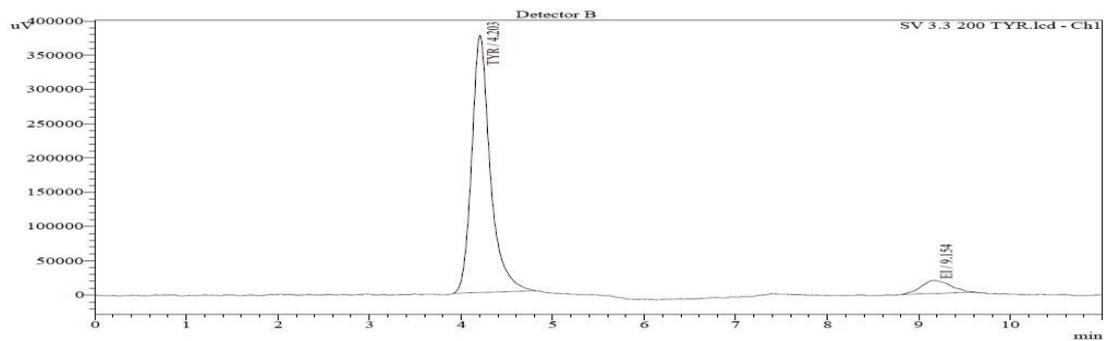
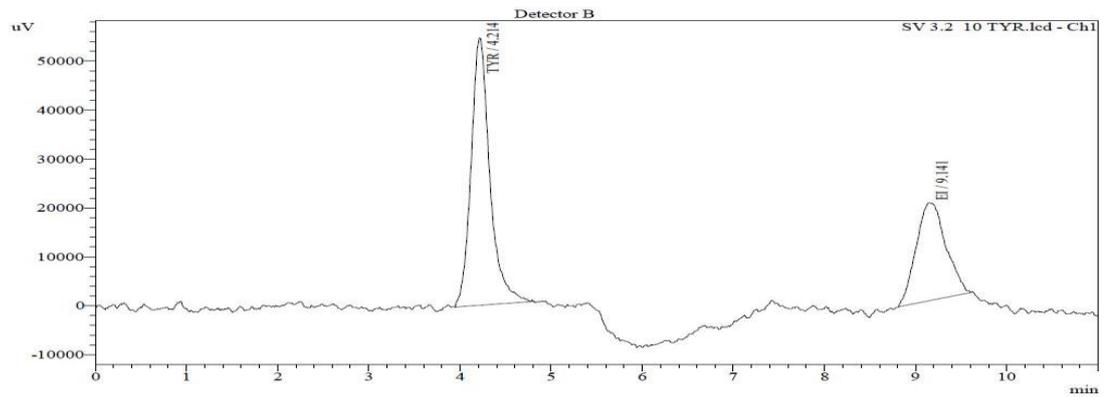
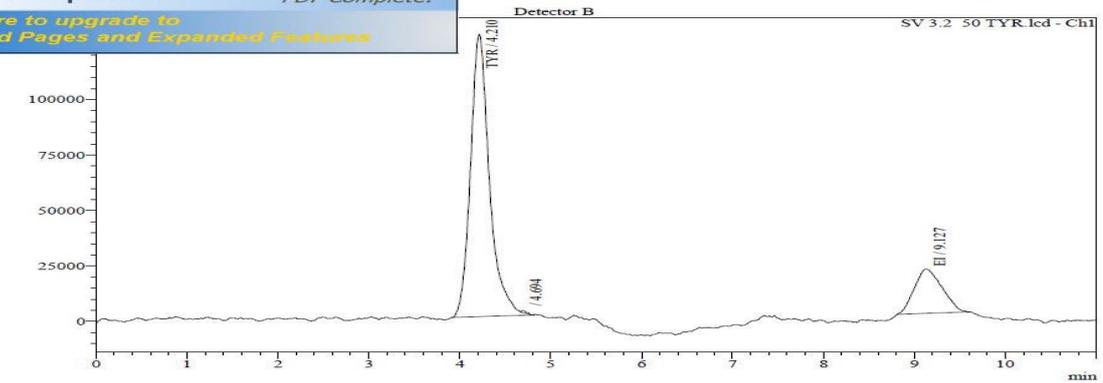


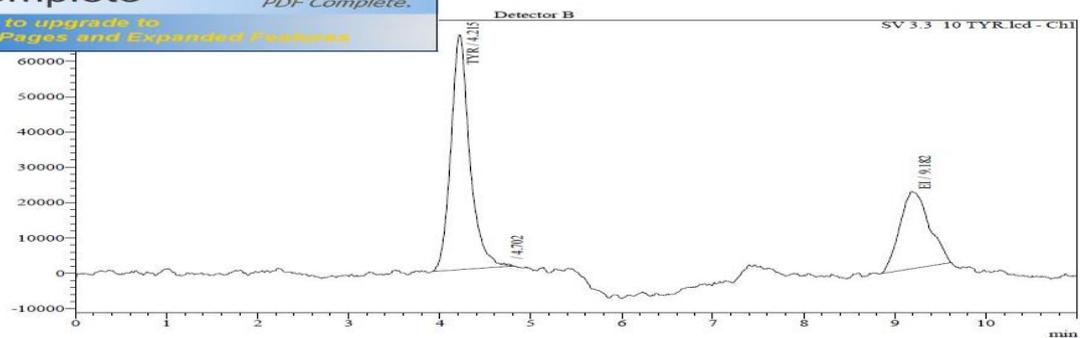
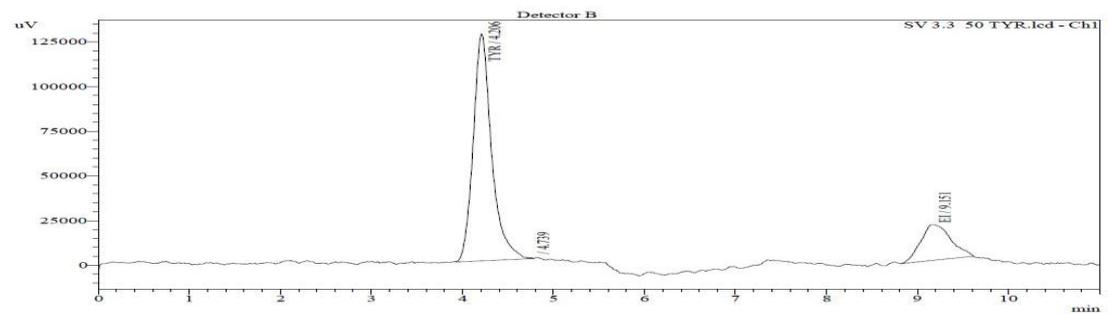
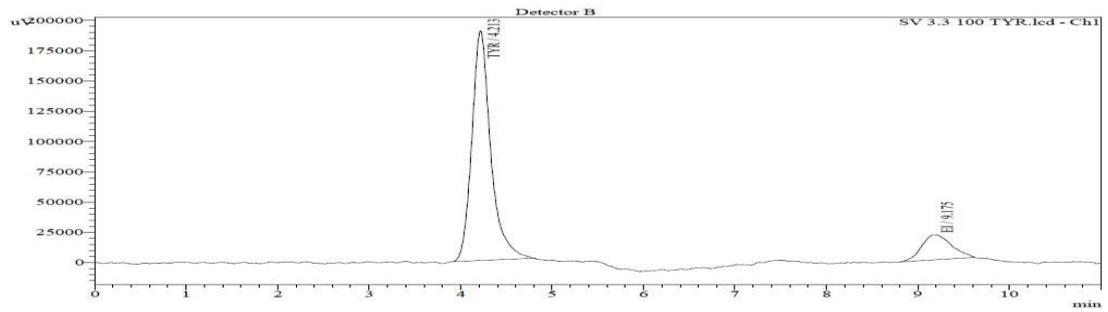
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



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







RESUME

La tyrosinémie héréditaire est une aminoacidopathie qui affecte principalement le nouveau-né et l'enfant. Elle est sévère et souvent fatale. Son diagnostic requiert le dosage des acides aminés impliqués ou de leurs métabolites. L'objectif de notre travail est d'optimiser et de valider une méthode de dosage de la tyrosine dans le sérum humain par chromatographie liquide à haute performance HPLC couplée à un détecteur spectrofluorimétrique selon les directives de la commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) publiée dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006 qui repose sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

Notre travail a été effectué sur une période de 6 mois (de novembre 2017 à mai 2018) au niveau du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de Tizi Ouzou.

Le protocole de validation a été appliqué sur des standards d'étalonnage sans matrice et des standards de validation avec une matrice constituée d'un sérum biologique, nous avons procédé à une déprotéinisation par l'acide trichloracétique (TCA), une solution de dihydrogénophosphate (KH_2PO_4) est utilisée comme phase mobile pour la séparation par HPLC en phase inverse (C8). La tyrosine est détectée et quantifiée en utilisant sa propriété de fluorescence naturelle générée par une excitation à une longueur d'onde de 210 nm et une émission à 302 nm.

La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, et exacte dans l'intervalle [10.29 ; 200] $\mu\text{mol/l}$ avec un risque d'avoir au maximum 15% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-15% ; +15%], Ce qui atteste la validité de la méthode proposée dans le présent travail. La validation de cette technique de dosage par HPLC permettra d'avoir une méthode de dosage qui permet le dépistage et le suivi des patients tyrosinémiques avec toute l'exactitude, la spécificité, la précision, et la sensibilité analytique requise ; en plus qu'elle est facile, rapide et économique.

Mots clés : Tyrosinémie, HPLC, validation analytique, profil d'exactitude, C8.

ABSTRACT

Hereditary tyrosinemia is an aminoacidopathy that mainly affects the newborn and the child. It is severe and often fatal. Its diagnosis requires the determination of the amino acids involved or their metabolites. The aim of our work is to optimize and validate a method of determination of tyrosine in human serum by HPLC high performance liquid chromatography coupled to a spectrofluorometric detector according to the guidelines of the commission of the French Society of Science and Technology Pharmaceuticals (SFSTP) published in the journal STP Pharma practice in January 2006 which relies on the profile of accuracy as a decision tool. Our work was carried out over a period of 6 months (from November 2017 to May 2018) at the analytical chemistry laboratory of Tizi Ouzou pharmacy department.

The validation protocol was applied to matrix-free calibration standards and validation standards with a matrix of biological serum, we proceeded to a deproteinization with trichloroacetic acid (TCA), a solution of dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) is used as the mobile phase for reverse phase HPLC separation (C8). Tyrosine is detected and quantified using its natural fluorescence property generated by excitation at a wavelength of 210 nm and emission at 302 nm.

The developed technique was found to be specific, linear, and accurate in the range [10.29; 200] $\mu\text{mol/l}$ with a risk of having a maximum of 15% of the measurements outside the limits of acceptances set at [-15%; + 15%], which attests the validity of the method proposed in this work.

Validation of this HPLC assay technique will provide a method of assay that allows screening and monitoring of tyrosine patients with all the accuracy, specificity, precision, and analytical sensitivity required; besides that it is easy, fast and economical.

Key words: Tyrosinemia, HPLC, analytical validation, accuracy profile, C8.