

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
DE TIZI OUZOU



جامعة مولود معمور
كلية الطب
تيزي وزو

ⵜⴰⵎⴰⵎⵔⴰⵢⵜ ⵜⴰⵎⴰⵎⵎⵓⵔⵉⵜ ⵜⴰⵖⵔⴰⵎⵜ ⵜⴰⵎⴰⵎⵎⵓⵔⵉⵜ

Département de Pharmacie
N° D'ORDRE :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie
Présenté et soutenu publiquement
Le 1^{er} JUILLET 2018
Thème

Stress oxydant et oligoéléments :
Validation d'une méthode de dosage du zinc par SAA selon
SFSTP2006

Réalisé par : HAMRAOUI Célia
BENKHEROUF Karima

Promoteur : Dr. BELAZOUGUI Ourdia
Co-promoteur: Dr. BOURSOUTI Mourad

Membres de jury :

Pr. MEKACHER L R.	MCB	Faculté de médecine	UMMTO	Président de jury
Dr. MAMOU M.	MAHU	Faculté de médecine	UMMTO	Examineur
Dr. KACI L.	Assistant	Faculté de médecine	UMMTO	Examinatrice

Année universitaire : 2017/2018

TABLE DES MATIERES**LISTE DES ABREVIATIONS****LISTE DES TABLEAUX****LISTE DES FIGURES**

Introduction.....	1
-------------------	---

PARTIE THEORIQUE**CHAPITRE I: STRESS OXYDANT**

1. Définitions.....	3
1.1. Pro-oxydant.....	3
1.2. Antioxydant.....	3
1.3. Stress oxydatif.....	3
2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	4
2.1. Définition des ERO et RL.....	4
2.2. Différents types d'ERO.....	5
2.2.1. ERO radicalaires.....	5
2.2.2. ERO non radicalaires.....	5
3. Rôle physiologique des ERO.....	5
4. Origine des ERO.....	6
4.1. Origine endogène.....	6
4.1.1. Mitochondrie.....	7
4.1.2. NADPH oxydase.....	7
4.1.3. Xanthine oxydase.....	7
4.2. Origine exogène.....	8
5. Les cibles du SO.....	8
5.1. Les acides nucléiques.....	8
5.2. Les lipides.....	9
5.3. Les protéines.....	10
5.4. Les glucides.....	11
6. Les défenses antioxydantes.....	12
6.1. Systèmes de défense enzymatiques.....	12
6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	12
6.1.2. Catalases.....	13
6.1.3. Glutathion peroxydases (GPxs).....	13
6.1.4. Système thiorédoxine.....	13
6.2. Systèmes de défense non enzymatiques	14

6.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols.....	14
6.2.2. Vitamine C.....	15
6.2.3. Vitamine E.....	15
6.2.4. Caroténoïdes.....	16
6.2.5. Coenzyme Q10.....	16
6.2.6. L'acide urique.....	16
6.2.7. La bilirubine.....	17
6.2.8. Les polyphénols.....	17
6.2.9. Les oligoéléments.....	17
7. Les conséquences du stress oxydatif.....	17
8. Évaluation du stress oxydant.....	17
CHAPITRE II: OLIGOELEMENTS	
1. Définition.....	24
2. Étude des principaux oligo-éléments.....	25
2.1. Zinc.....	25
2.1.1. Historique.....	25
2.1.2. Variétés et propriétés physiques.....	25
2.1.3. Propriétés chimiques.....	26
2.1.4. Rôle physiologique.....	26
2.1.5. Principales sources alimentaires.....	26
2.1.6. Besoins et apport en zinc.....	27
2.1.7. Carence en zinc.....	28
2.1.8. Toxicité du zinc.....	28
2.1.8.1. Toxicité aiguë.....	28
2.1.8.2. Toxicité chronique.....	28
2.2. Cuivre.....	29
2.2.1. Historique.....	29
2.2.2. Variétés et propriétés physiques.....	29
2.2.3. Propriétés chimiques.....	30
2.2.4. Rôle de cuivre dans l'organisme.....	31
2.2.5. Principales sources alimentaires.....	31
2.2.6. Besoins et apports alimentaires.....	32
2.2.7. Valeurs physiologiques.....	32
2.2.8. Carence en Cuivre.....	32
2.2.9. Toxicité du cuivre.....	33

2.3. Sélénium	33
2.3.1. Historique	33
2.3.2. Variétés et propriétés physiques du sélénium.....	34
2.3.4. Propriétés chimiques.....	35
2.3.5. Rôle physiologique.....	35
2.3.6. Principales sources alimentaires.....	36
2.3.7. Besoins et apports	36
2.3.8. Carence en Sélénium	37
2.3.9. Toxicité du Sélénium.....	37
3. L'activité antioxydante des oligoéléments	38
PARTIE PRATIQUE	
CHAPITRE I: VALIDATION ANALYTIQUE	
Généralité	39
1.Définition.....	39
2.Cycle de vie.....	39
3.Objectif.....	40
4.Critère de validation.....	41
5.Choix de protocole de validation.....	42
6.Etude de la validation.....	43
6.1.Fonction de réponse.....	43
6.2.Alignement des observations.....	44
6.3. Prédications inverses.....	45
6.4.Calcul de la justesse et de la fidélité.....	45
6.4.1.Modèle.....	45
6.4.2.Justesse.....	47
6.4.3.Fidélité.....	47
6.5.Calcul de l'exactitude.....	48
6.5.1.Calcul de l'intervalle de tolérance.....	48
6.5.2.Profil d'exactitude.....	48
6.6.Choix de la fonction de réponse.....	50
6.7.Limites de quantification	50
6.8.Linéarité.....	50
6.9.Outil de calcul.....	51

CHAPITRE II: PROTOCOLE DE VALIDATION

TABLE DES MATIERES

Matériels et méthodes.....	52
1. Appareillage.....	52
2. Matériels.....	53
3. Méthode.....	53
3.1. Méthode de la validation analytique.....	53
3.2. Choix des paramètres de validation.....	54
3.3. Mode opératoire.....	56
3.3.1. Préparation des solutions mères à 100mg/l.....	56
3.3.2. Préparation de la gamme de solutions filles.....	56
3.3.3. Préparation des solutions à analysées	56
3.3.4. Analyse des solutions.....	57
3.4. Développement d'une feuille de calcul adaptée à la validation des méthode d'analyse selon le Protocole proposé par SFSTP 2006.....	57

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

1. Spécificité et effet matrice.....	58
1.1. Spécificité de la SAA.....	58
1.2. Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreurs systématique.....	58
2. Fonction de réponse.....	61
3. Alignements des observations.....	66
4. Prédiction inverses.....	66
5. Justesse.....	67
6. Fidélité.....	68
7. Erreur total.....	68
8. Intervalle de tolérance.....	69
9. Profil d'exactitude.....	70
10. Linéarité de justesse.....	70

DISCUSSION

1. Spécificité et effet matrice.....	73
1.1. Spécificité de la SAA.....	73
1.2. Effet matrice et erreur systématique.....	73
2. Fonction de réponse.....	73
3. Critère de performance de la fonction de réponse choisie.....	74

TABLE DES MATIERES

3.1. Justesse.....	74
3.2. Fidélité.....	74
4. Critère de décision sur la validité de la méthode.....	74
4.1. Erreur total.....	74
4.2. Profil d'exactitude.....	74
4.3. Intervalle de validité et limites de quantification.....	75
4.4. Linéarité.....	75
CONCLUSION.....	76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

%	Pourcentage
$^1\text{O}_2$	Oxygène singlet
4-HNE	4-Hydroxynonéal
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides Gras Polyinsaturés
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CIRC	Classification Par Le Comité De Recherche Sur Le Cancer
ClO^-	Ion hypochlorite
Cu	Cuivre
Cu^{2+}	Ion cuivre
CuBr	Bromure de cuivre
CuCl	Chlorure de cuivre
EOA	Espèce l'Oxygène Activée
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
Fe^{2+}	Fer ferreux
GPxs	Glutathion Peroxydases
GSH	glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H^+	Ion d'hydrogène
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
$\text{HO}_2^\cdot$	Radical perhydroxyle
JC	Jésus- Christ
LDL	Low Density Lipoprotein
MDA	Malonyldialdehyde
mM	millimol/l
NADP^+	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite
NO	Oxyde d'azote
NO_2	Dioxyde d'azote
NO_3^-	Ion nitrate

LISTE DES ABREVIATIONS

Nox ₂	NADP oxydase 2
Nox ₄	NADP oxydase4
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OH [•]	Radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONOO ⁻	Peroxynitrite
ONOOH	Nitreperoxyde
PFG	Produits Finaux de Glycosylation
pH	potentiel Hydrogène
RL	Radicaux Libres
RLO	Radicaux Libres de l'Oxygène
RO [•]	Radical alkoxyde
ROO [•]	Radical peroxyde
ROO [*]	Radical peroxy
SAA	Spectrophotométrie d'Absorption Atomique
SFSTP	Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques
Se	Sélénium
SOD	Superoxyde dismutase
STP Pharma	Société Technique Pharmaceutique
UV	Ultra-violet
Zn	Zinc
α	Risque
λ	Limite d'acceptation
µg/j	Microgramme/ jour

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Exemple des espèces radicalaires de l'oxygène.....5
Tableau II	Exemple des espèces non radicalaires oxygénées.....5
Tableau III	Liens entre les maladies humaines et le stress oxydant.....18
Tableau IV	Antioxydants et marqueurs d'oxydation.....20
Tableau V	Propriétés physiques du cuivr.....30
Tableau VI	teneur des aliments en cuivre par ordre décroissant des plus riches aux plus pauvre.....31
Tableau VII	La carence en cuivre peut être d'origine génétique ou acquise.....32
Tableau VIII	Principaux critères de validation (SFSTP 2003).....41
Tableau IX	Choix du nombre de standard d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.....43
Tableau X	Exemples de fonction de réponses.....44
Tableau XI	Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses.....44
Tableau XII	Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse.....45
Tableau XIII	Niveaux de concentrations choisi.....55
Tableau XIV	Volume correspondant pour chaque niveau de concentration.....56
Tableau XV	Résultats de la gamme de standard d'étalonnage.....58
Tableau XVI	Résultat de la gamme de standard de validation.....59
Tableau XVII	Données de droite de standard d'étalonnage.....60
Tableau XVIII	Données de la droite de Standard de validation.....60
Tableau XIX	Résultat de comparaison des pentes par le teste de STUDENT....61
Tableau XX	Résultat de test de STUDENT pour l'erreur systématique.....61
Tableau XXI	Standard d'étalonnage ($y = ax + b$).....62
Tableau XXII	Standard de validation ($y = ax + b$).....62
Tableau XXII	Standard d'étalonnage ($y = ax$).....63
Tableau XXIV	Standard de validation ($y = ax$).....63
Tableau XXV	Standard d'étalonnage ($\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$).....64
Tableau XXVI	Standard de validation ($\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$).....64
Tableau XXVII	Critères de choix de la fonction de réponse.....65
Tableau XXVIII	Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation.....66
Tableau XXIX	Prédictions inverses obtenus à partir des standards de validations.....67
TableauXXX	Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentration des standard de validation.....67
Tableau XXXI	Calcul de fidélité pour chaque niveau de concentrations des

LISTE DES TABLEAUX

	standards de validation.....68
Tableau XXXII	Calcul de l'erreur totale absolu pour chaque niveau de concentration des standards de validations.....69
Tableau XXXIII	Calcul de l'erreur totale relative pour chaque niveau de concentration des standards de validations.....69
Tableau XXXIV	Calcul des limites de l'intervalle de tolérances pour chaque niveau de concentration.....70
Tableau XXXV	vérification de la linéarité de la méthode.....71
Tableau XXXVI	Données de la droite du standard de validation.....72
Tableau XXXVII	Comparaison de la pente à 1 avec le test de STUDENT.....72
Tableau XXXVIII	Comparaison de l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de STUDE.....72
Tableau XXXIX	Effet matrice et erreurs systématiques.....73

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure1	Mécanisme montrant un stress oxydant au sein d'une cellule.....	4
Figure 2	La chaîne respiratoire mitochondriale.....	6
Figure 3	Mécanisme de réduction de l'hypoxanthine en acide uréique.....	7
Figure 4	Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales.....	12
Figure 5	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants.....	14
Figure 6	Régénération d' α -tocophérol par l'acide ascorbique.....	16
Figure 7	Principales fonctions des éléments-trace.....	20
Figure 8	Configuration électronique du zinc.....	22
Figure 9	Image des deux allotropes de sélénium gris et rouge.....	31
figure 10	Cycle de vie d'une procédure analytique.....	37
Figure 11	logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	39
Figure 12	Spectrophotomètre d'absorption atomique de laboratoire de toxicologie.....	49
Figure 13	Courbe de standard d'étalonnage.....	55
Figure 14	Courbe de standard de validation.....	56
Figure 15	Superposition du courbe étalonnage et de validation.....	57
Figure 16	Profil d'exactitude	68
Figure 17	Droite de régression linéaire entre les concentrations prédites et les concentrations introduites.....	69

Remerciements

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

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

Au Docteur BELAZOUGUI O.

Maitre-assistante hospitalo-universitaire en Toxicologie

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 BOURSOUTI M.

Résident en chimie analytique

Nous tenons à vous remercier pour votre collaboration, pour votre large contribution à la réalisation de ce modeste travail.

Au Professeur MEKACHER LR.

Maitre de conférences en Toxicologie au département de pharmacie

Nous vous témoignons 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 de présider la soutenance de cette thèse.

Au Docteur MAMOU M.

Maitre assistant hospitalo-universitaire en Chimie Analytique

nous vous remercions Monsieur pour l'honneur que vous nous faites en acceptant d'être membre de jury et d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de nos plus vifs remerciements.

Au Docteur KACI L.

Assistante en Toxicologie

Nous vous remercions Madame pour l'honneur que vous nous faites en acceptant d'être membre de jury et d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de nos plus vifs remerciements.

Au personnel de laboratoire de Toxicologie

Nous tenons à remercier spécialement nos familles pour votre présence et votre soutien très utiles afin de progresser et d'atteindre nos objectifs. Le succès de ce travail est aussi le vôtre.

Nos profonde reconnaissance sont destinées à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études.

BENKHEROUF Karima

HAMRAOUI Célia

Dédicace

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce
modeste travail à*

*Mes très chères parents AHMED et OURDIA, à qui je dois tout dans la
vie, ceux qui m'ont élevé et inculqué en moi les bonnes valeurs de la vie, ceux
que tous les mots ne suffisent pour leur exprimer mon amour et ma gratitude,
je leur souhaite longue vie, santé, tranquillité, et bonheur inshallah. J'espère
que jamais je ne la décevrais et que dieu m'aide à leur rendre au moins un
peu de ce qu'ils m'ont donné.*

A ma très chère grand-mère que dieu la garde pour nous.

*Je dédie aussi mon travail à mon très chère frère OMAR et sa femme et mes
chères sœurs SOURAYA, DJALIYA et NACERA et leurs maries que
dieu puisse exaucer tous leurs vœux dans la vie.*

*Sans oublier mes petits neveux : MAD ADAM AYOUNBOSSAM et la
princesse MYLIA que Dieu les garde et les bénisse.*

A toute la famille BENKHEROUF et GHEZALI.

*A ma chère copine CELIA avec qui j'ai partagé ce travail, je l'a souhaite
beaucoup de réussite dans sa vie et tous le bonheur du monde*

*Je ne peux clôturer la page des dédicaces sans évoquer mes amis avec qui j'ai
partagé mon cursus en particulier NOUARA, NASMINE MERIEM,*

*LIZA NESRINE et NESRINE à qui je souhaite leurs réussite dans
leurs vies professionnelle.*

KARIMA

Dédicace

*Je dédie ce mémoire
À Mes chers parents*

*Ma mère pour sa patience, son soutien, son amour et toute son
assistance durant tant d'années,*

*Mon père qui m'a donné toute sa confiance, pour ses sacrifices,
pour tout ce qu'il a fait pour que je puisse arriver à ce stade ;*

*À mes chères sœurs Souhila Lamia Karim Kahina et Amina
qui ont toujours été à mes côtés ;*

O mon chère frère Smail ;

À toute ma famille sans exception ;

À Mes très chères amies, Liza, Meriem, Yasmine,

NESRINE ET NESRINE

À tous ceux et celles qui se reconnaîtront en ce mot « ami(e) » ;

*À mon amie Karima avec qui j'ai eu l'honneur de partager ce
travail ainsi que toute sa famille.*

Celia HAMRAOUI

Introduction

Radicaux libres, espèces réactives de l'oxygène (ERO), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives au stress oxydant et aux antioxydants.

Le stress oxydant représente l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives de l'oxygène, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense antioxydante. Les antioxydants peuvent agir par plusieurs manières, leurs mécanisme d'action peut être direct ou indirect, en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydants, comme dans le cas des oligoéléments (zinc, cuivre et sélénium).

Dans un souci de prévention, il conviendra donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant chez un individu afin d'apporter les corrections nécessaires et optimiser les défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs.

C'est dans ce cadre que s'inscrit le travail réalisé au cours de ce mémoire de fin d'études ; en vue de la mise au point et la validation d'une méthode de dosage d'un de ces oligoéléments en l'occurrence le zinc dans le plasma par spectrophotométrie d'absorption atomique selon le protocole proposé par la Société Française des Sciences Techniques Et Pharmaceutiques (SFSTP 2006).

En effet ce travail est scindé en deux parties : une est une revue de la littérature comportant deux chapitres : Stress oxydant et oligoéléments. L'autre partie concerne la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du zinc dans le plasma par SAA/flamme.

Objectif

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Toxicologie du département de Pharmacie de la faculté de médecine de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

L'objectif étant la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du zinc, dans le plasma humain par spectrophotométrie d'absorption atomique/flamme, en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision, approche harmonisée décrite dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

1. Définitions

1.1. Pro-oxydant

Un pro-oxydant est une substance qui déclenche un stress oxydatif par l'augmentation des radicaux libres, des molécules réactives connues pour endommager les cellules [1].

1.2. Antioxydant

Les antioxydants sont définis comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine[2].

1.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants/antioxydants » en faveur des oxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants[3].

Au cours du temps, la notion de stress oxydant a évolué notamment avec l'avènement de la biologie moléculaire qui a montré que les EOA ont aussi un rôle physiologique important. En effet, les EOA produites en permanence dans l'organisme sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (prolifération cellulaire normale, métabolisme normal, état redox normal pour l'expression de gènes). Dans cette perspective, les antioxydants sont alors des régulateurs de la production des EOA, dont ils préviennent les effets délétères potentiels. La vraisemblable nécessité d'un stress oxydant «physiologique» régulateur explique sans doute en partie les échecs relatifs d'études interventionnelles basées sur des supplémentations en antioxydants[4].

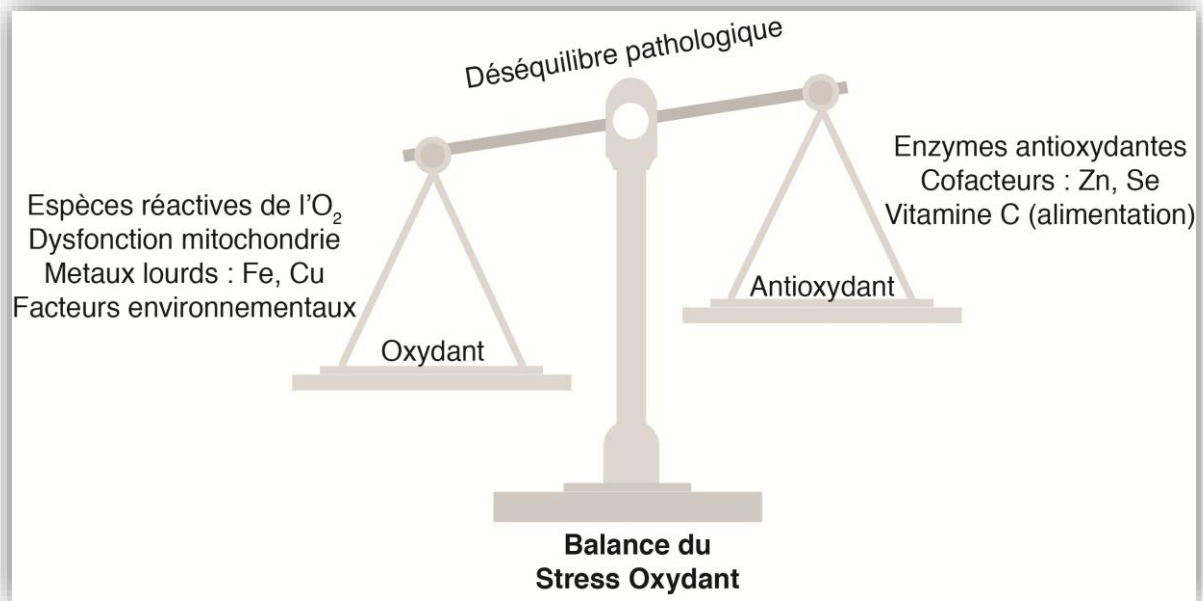


Figure1: Mécanisme montrant un stress oxydant au sein d'une cellule [5].

2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

2.1. Définition des ERO et RL

Les ERO sont souvent associées aux radicaux libres. On définit par le terme de radicaux libres, tout atome, groupe d'atomes ou molécules qui possède(nt) sur son orbital externe un électron célibataire non apparié. Les radicaux libres sont des substances chimiques très instables, de durée de vie très courte (10^{-9} à 10^{-6} s) et très réactives par rapport à leur électron célibataire qui va chercher à se ré-apparier. Un radical libre va, en effet, chercher à se stabiliser au détriment des structures environnantes. L'exemple le plus simple de radical libre est l'hydrogène qui possède un seul électron non apparié sur sa couche orbitale externe. Ainsi, les radicaux libres ne sont pas forcément associés à des espèces dérivant de l'oxygène, la notion de réactivité n'est pas forcément relative aux radicaux.

Les ERO désignent à la fois des espèces radicalaires de l'oxygène et des espèces non radicalaires. Ainsi, tous les radicaux oxygénés sont des ERO, mais tous les ERO ne sont pas des radicaux [5].

2.2. Different types d'ERO

2.2.1. ERO radicalaires

Les espèces radicalaires ou radicaux libres de l'oxygène (RLO) possèdent un électron non apparié. Il existe aussi des espèces radicalaires dérivant de l'azote mais appartenant à la classe des espèces réactives oxygénées (Tableau 1)[6].

Tableau I : Exemples des espèces radicalaires de l'oxygène.

Dénomination	Formule chimique
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	$HO^{\cdot}$
radical perhydroxyle	$HO_2^{\cdot}$
Radical peroxyde	$ROO^{\cdot}$
Radical alkoxyde	$RO^{\cdot}$

2.2.2. ERO non radicalaires

Les dérivés non radicalaires ne possèdent pas d'électron célibataire, ce sont des espèces activées dérivant de l'oxygène ou de l'azote ou chlore. Ils réagissent avec des métaux (tableauII)[6].

Tableau II : Exemples des espèces non radicalaires oxygénées.

Dénomination	Formule chimique
Oxygène singulet	1O_2
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Nitreperoxyde	$ONOOH$
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Ion hypochlorite	ClO^-

3. Rôle physiologique des ERO

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la phagocytose, ont été découvertes récemment.

Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes[7].

4. Origine des ERO

4.1. Origine endogène

4.1.1. Mitochondrie

La mitochondrie est le principal organe producteur d'énergie sous forme d'ATP. Elle est aussi considérée comme la plus grande source de production des ERO (de l'ordre de 0,2 à 0,4 % de l'oxygène consommé[8]). Il a été démontré que les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont responsables de la production d'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, qui est ensuite rapidement converti en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD)[9,10].

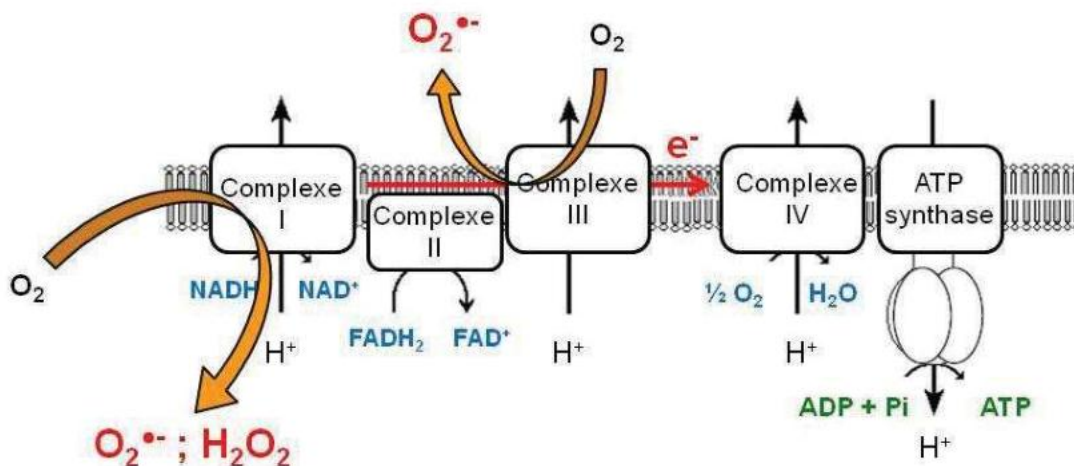


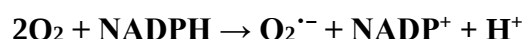
Figure 2: La chaîne respiratoire mitochondriale: La chaîne respiratoire, au niveau de la membrane interne, est constituée de 4 complexes (I-II-III-IV) contenant les transporteurs d'électrons et permettant la réduction de l' O_2 en H_2O . Lors de la réduction il se crée un gradient de protons au niveau de l'espace inter-membranaire ainsi qu'une production d'ERO dans la matrice au niveau des complexes I et III. La force du pompage des protons vers la matrice permet la synthèse d'ATP via le complexe V (ATP synthase)[11].

Si la mitochondrie est la source principale de la production des ERO, elle est aussi une de leurs cibles. Ainsi, l'anion superoxyde peut réagir avec de l'oxyde d'azote et former du peroxynitrite. Le peroxynitrite peut endommager les composants de la chaîne respiratoire mais aussi l'ADN mitochondrial, ce qui va augmenter la production des ERO. On va ainsi avoir une modification de la morphologie et de la fonction des mitochondries entraînant une génération des ERO plus importante[12].

4.1.2. NADPH oxydase

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique membranaire. D'abord considérée comme des enzymes exprimées uniquement dans les cellules immunitaires (macrophages et monocytes), il a ensuite été découvert qu'il existait 7 isoformes de NADPH oxydase exprimées dans divers tissus et impliquées dans divers processus biologiques [13].

Les NADPH oxydases catalysent la réaction d'oxydation du NADPH par l'oxygène (O_2), ce qui produit du $NADP^+$, du H^+ et de $O_2^{\cdot-}$. Ces deux derniers composés réagissent entre eux pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction [14] :



Ce complexe enzymatique entraîne ainsi la synthèse des ERO. L'activité de la NADPH est sensible à des facteurs métaboliques tel que l'hyperglycémie[13,15]. Au niveau cardiaque, il s'agit de la première source de production des ERO. Plus particulièrement, ce sont les isoformes Nox₂ et Nox₄ qui sont le plus impliquées dans la production des ERO au niveau des cardiomyocytes [16,17].

4.1.3. Xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme cytosolique qui génère des ERO en réduisant l'hypoxanthine en xanthine ainsi que la xanthine en acide urique selon la figure:

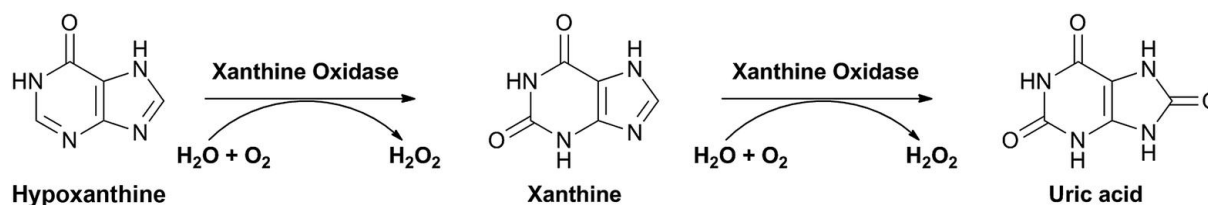


Figure 3: Mécanisme de réduction de l'hypoxanthine en acide uréique[18]

Cette enzyme est surtout présente dans le foie mais peut se retrouver dans la circulation en cas d'atteinte hépatique. La production des ERO par la xanthine oxydase est faible en condition physiologique mais jouerait un rôle important lors de l'ischémie-reperfusion. Dans le cas de l'ischémie, la grande consommation de l'ATP conduit à une accumulation d'hypoxanthine et de xanthine et donc une production des ERO plus importante[18].

4.2. Origine exogène

Les radicaux libres exogènes proviennent d'un apport extérieur, c'est-à-dire lors d'une exposition à un environnement toxique. Les xénobiotiques, les pesticides, les insecticides sont seulement quelques exemples pouvant pénétrer au corps humain et induire la formation de radicaux libres.

Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres du type $O_2^{\cdot -}$, $HO^{\cdot}$, 1O_2 et des molécules génératrices de radicaux libres tel que H_2O_2 , par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants. Par ailleurs les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène [19].

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d' $O_2^{\cdot -}$. D'autre part l'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase et du cytochrome P450[20].

Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres ; ils peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux libres[21].

5. Les cibles du SO

Les ERO réagissent avec les premières molécules qu'elles rencontrent. Elles ont comme cible les lipides, les protéines, les glucides et les acides nucléiques[7].

5.1. Les acides nucléiques

Les ADN nucléaires et mitochondriaux constituent une cible cellulaire importante. Les bases qui composent l'ADN sont sensibles à l'oxydation. Ces attaques sont essentiellement causées par le $^{\cdot}OH$. Elles sont de différents types[22] :

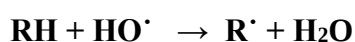
- ✓ Modification de base azotée, en particulier la guanine qui peut être transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) ou encore la thymine en thymine glycol. Cela entraîne un non-appariement des bases, ou un mauvais appariement, ou encore un blocage de la réplication de l'ADN ;
- ✓ Destruction de la liaison entre la base et le désoxyribose, à l'origine d'un site dépourvu de base ou « abasique », qui s'avère être non fonctionnel ;

Ainsi nous constatons que ces dommages peuvent participer à une mutagénèse, à un arrêt des divisions cellulaires par blocage des mécanismes de réplication, à un arrêt de la synthèse protéique par blocage des mécanismes de transcription/traduction, et enfin à une mort cellulaire. les ERO pourraient même être impliquées dans l'initiation et la progression d'un cancer stress oxydant induit[23].

5.2. Les lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les cibles privilégiées des ERO radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être un peroxyde, c'est-à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique. Le mécanisme radicalaire comporte trois étapes successives : l'initiation, la propagation et la terminaison[7].

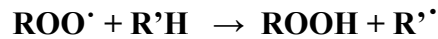
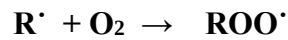
La phase d'initiation débute par une cassure homolytique d'une liaison sous l'arrachement d'un hydrogène (création d'un radical d'acide gras $R^\bullet$) à partir d'un acide gras (RH). Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que le $HO^\bullet$ et le $HOO^\bullet$



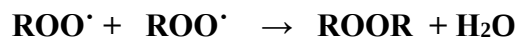
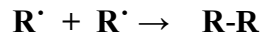
Le radical lipidique $R^\bullet$ subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable.



La propagation est réalisée par la fixation d'une molécule d' O_2 et formation d'un radical peroxy ($ROO^\bullet$). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un hydrogène à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. L'hydroperoxyde lipidique ($ROOH$) formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents Fe^{2+} ou Cu^{2+} et entraîner la formation d'alcalanes et d'aldéhydes toxiques :



La réaction en chaîne peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante [24].



L'attaque des lipides concerne les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Dans le premier cas, l'oxydation des lipides ou des lipoprotéines circulants aboutit à la formation des LDL oxydés qui peuvent être captés par les macrophages et former des dépôts lipidiques de la plaque d'athérome. Dans le second cas, l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et perturbe le fonctionnement des récepteurs et des transporteurs se trouvant à leur surface [25].

La peroxydation lipidique fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE) ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique [26].

5.3. Les protéines:

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO. Ils altèrent l'extrémité des chaînes protéiques de façon réversible ou irréversible provoquant une dégradation de l'activité protéique pouvant aller jusqu'à une perte complète de fonction ou une agrégation protéique. Les dysfonctionnements sont nombreux[27] :

- ✓ Récepteurs cellulaires ;
- ✓ Anticorps ;
- ✓ Signaux de transduction ;
- ✓ Fonctions de régulation ;

- ✓ Transport protéique ;
- ✓ Activité enzymatique.

Lors de l'altération des protéines fixées à des transporteurs contenant des métaux de transition, ceux-ci sont libérés ce qui renforce les effets néfastes du radical hydroxyle $\text{HO}^\cdot$.

Les protéines altérées peuvent être, par exemple, à l'origine de réactions auto-immunes ou s'accumuler entre les cellules et s'agréger avec les lipides pour former des dépôts de lipofuscine. Ces dépôts sont caractéristiques des tissus âgés.

L'oxydation des protéines se fait notamment par l'addition de groupes carbonyles qui peuvent réagir avec des fonctions amines pour former des liaisons imines ($-\text{HC}=\text{N}-$). Lorsque deux tyrosines proches sont oxydées, il peut se former une liaison di-tyrosine. Ces deux processus participent au phénomène d'agrégation protéique observé [28].

5.4. Les glucides

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation », elle se fait en deux mécanismes possibles[2] :

- ✓ Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de «Produits Finaux de Glycosylation (PFG)».
- ✓ Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements amines libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ERO telles que $\text{HO}^\cdot$ ou NO_3^- pour former des Produits Finaux de Glycosilation (PFG).

Ces PFG sont d'une importance capitale, car en présence de métaux de transition ils favorisent la libération d' O_2^- .

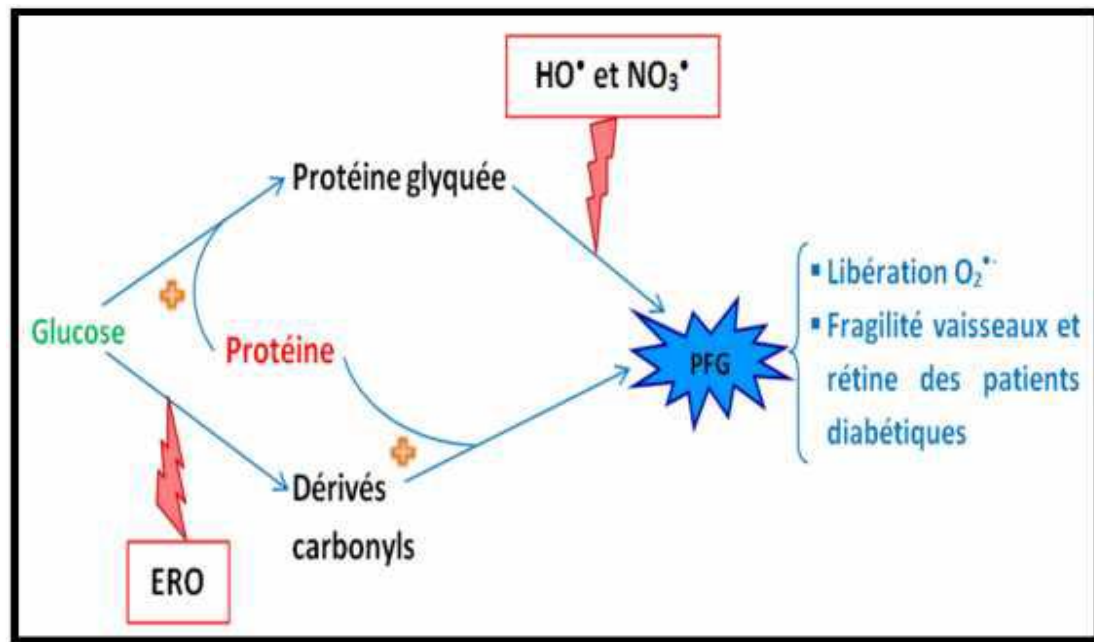


Figure 4 : Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales : glycosylation non enzymatique des protéines en haut, et oxydation au sens strict du glucose en bas. PFG : produits finaux de glycosylation [2].

6. Les défenses antioxydantes

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes.

On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydants[29].

6.1 Systèmes de défense enzymatiques

6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

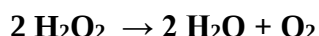
La Superoxyde dismutase (SOD) est une métallo-enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde O_2^- en espèces moins réactives le H_2O_2 et en O_2 à une vitesse extrêmement impotente (environ $2 \cdot 10^9 L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$)[30].



Quoique cette enzyme ait été isolée très tôt en 1939, c'est qu'en 1969 que McCord et Fridovich ont prouvé leur activité antioxydante. Il existe trois isoformes (types) des (SOD) : cytosolique Cu, Zn-SOD, Mitochondriale Mn-SOD et extracellulaire EC-SOD le rôle de chacune est la dismutation de radicaux superoxyde en H_2O_2 et en O_2 pour le premier type; alors que le Mn-SOD a une activité anti-tumorale très efficace, par ailleurs la EC-SOD a un rôle fondamental dans la protection antioxydante des surfaces cellulaires et des protéines de la matrice extra cellulaire[32].

6.1.2. Catalases

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes elle permet de convertir deux molécules de H_2O_2 en H_2O et O_2 [33].



Une molécule de Catalase peut convertir Six million de molécules d'hydrogène peroxyde en eau et en oxygène chaque minute[34].

6.1.3. Glutathion peroxydases (GPxs)

La GPx est une sélénoprotéine qui existe sous cinq isoformes, elle réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence. Toutefois, pour un apport adéquat en Sélénium, les teneurs en GPx atteignent un plateau. Le dosage en GPx ne peut donc être utilisé comme marqueur d'une intoxication en sélénium. Cependant, sa synthèse étant rénale et hépatique, d'autres facteurs tels que l'insuffisance rénale ou la cytolyse peuvent modifier sa concentration [35].

6.1.4. Système thiorédoxine

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site

actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique [35].

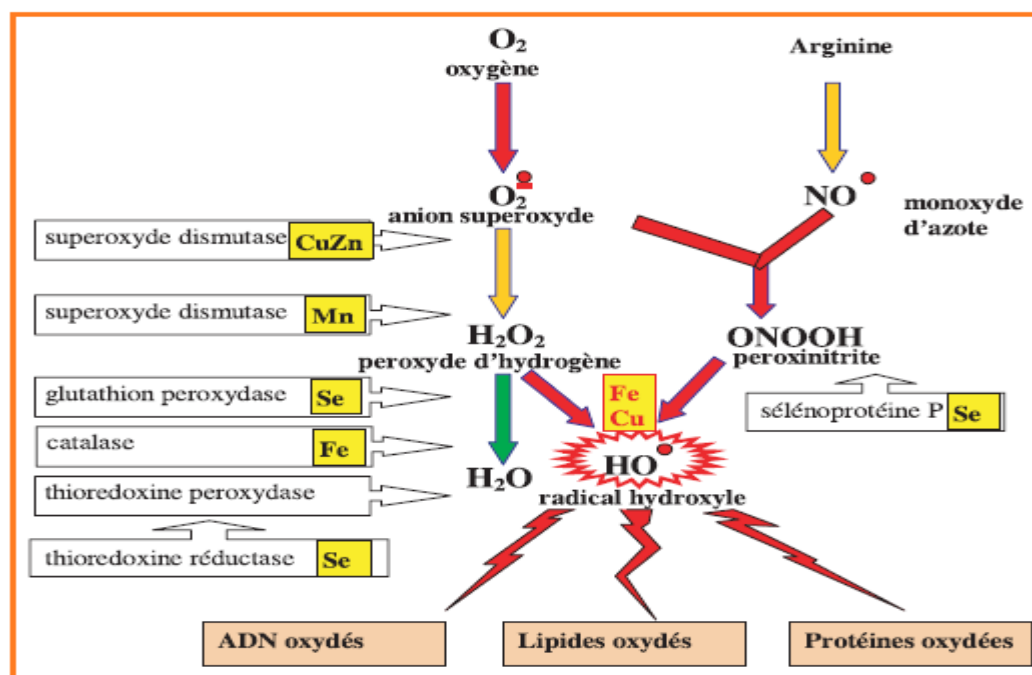


Figure 5: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants[25].

6.2. Systèmes de défense non enzymatiques

6.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols:

Le glutathion est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyglycine) ubiquitaire produit dans différents tissus où il est présent à des concentrations de l'ordre de 1 à 10 mM chez les mammifères[36].

Il est présent dans de nombreux compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries) soit sous sa forme réduite (GSH) à une concentration intracellulaire de 0,1 à 1 mM, soit sous sa forme oxydée (GSSG) à des concentrations dix fois moins importantes. Un rapport GSH/GSSG élevé est essentiel pour assurer une protection contre le stress oxydant[11].

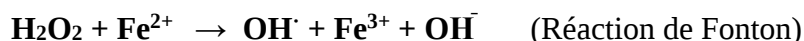
Le groupement thiol permet au glutathion d'intervenir dans de nombreuses réactions de réduction. Il participe également aux réactions de détoxification des ERO, notamment H_2O_2 et aussi lors de la détoxification des xénobiotiques électrophiles[36].

Le glutathion agit comme un antioxydant notamment au niveau mitochondrial ; en présence de GPx dépendante du sélénium, il réduit le peroxyde d'hydrogène prévenant tout effet délétère tel que la peroxydation lipidique. Le glutathion sert ainsi de cofacteur à la GPx, comme c'est le cas pour la glutathion-S-transférase (GST). Il permet aussi la régénération de différents antioxydants dont les vitamines C et E. Le glutathion est également impliqué dans les processus d'apoptose et de division cellulaire[36].

6.2.2. Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est hydrosoluble et considérée comme étant l'antioxydant naturel le plus puissant[37]. La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits[35].

Présente sous sa forme ascorbate, elle piège les radicaux pyroxyles en phase aqueuse avant qu'ils initient la réaction de peroxydation lipidique protégeant ainsi les membranes et les lipoprotéines. La vitamine C peut avoir un effet pro-oxydant et ainsi se lier avec des ions métalliques dont Fe^{3+} pour le réduire en Fe^{2+} qui pourra ensuite catalyser différentes réactions dont celle de Fenton générant ainsi de nouvelles ERO[37] :



Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer[35].

6.2.3. Vitamine E

Le terme vitamine E comprend deux classes : les tocophérols et les tocotriénols. Le composé principal est l' α -tocophérol qui est synthétisé par les plantes[37]. D'un point de vue biologique, deux isomères sont particulièrement intéressants, l' α - et le γ -tocophérol. Leur caractère hydrophobe leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux pyroxyles ($\text{ROO}^\bullet$) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique. Si l' α -tocophérol est le plus abondant, il semble que le γ -tocophérol soit le plus efficace à ce niveau. Les apports journaliers d' α -tocophérol sont de l'ordre de 10

mg : il se retrouve en quantité variable dans les huiles (soja, maïs, olive) et dans les noix et noisettes. Le γ -tocophérol est présent essentiellement dans l'huile de sésame [35].

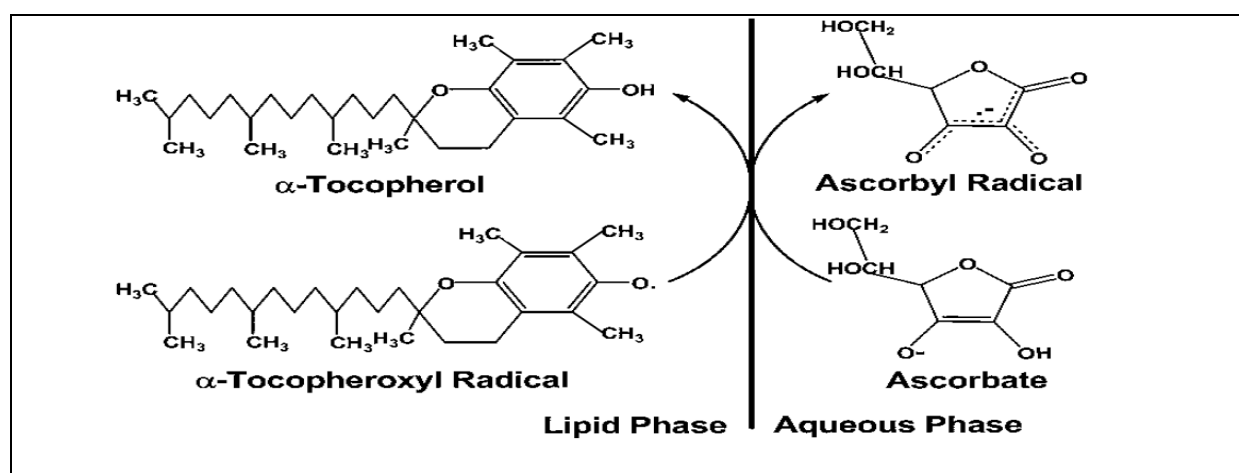


Figure 6: Régénération d' α -tocophérol par l'acide ascorbique[38].

6.2.4. Caroténoïdes

Ce terme regroupe les rétinoïdes et les provitamines A aussi appelés caroténoïdes. Ces derniers sont majoritairement connus comme étant des précurseurs de la vitamine A tels que le β -carotène. Les caroténoïdes sont de puissants agents anti-radicalaires qui neutralisent tant des espèces électroniquement que chimiquement actives. Ils ont également un rôle de protection vis-à-vis des réactions de photosensibilisation. En fonction de la concentration en caroténoïdes, leurs effets sont différents : à faible concentration, ils ont une action antioxydante alors qu'à plus forte concentration, ils se comportent comme des agents pro-oxydants[11].

6.2.5. Coenzyme Q₁₀

Le coenzyme Q₁₀, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines. Il appartient à la chaîne respiratoire mitochondriale et permet le transport d'électrons des complexes I et II vers le complexe III (figure 2). Le Coenzyme Q₁₀ est un puissant inhibiteur de la peroxydation lipidique en synergie avec la vitamine E [39].

Il est également impliqué dans la régénération de la vitamine E, ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ER. Son effet antioxydant s'exerce aussi au niveau de l'ADN et des protéines, étant donné qu'il est un antioxydant liposoluble endogène[40].

6.2.6. L'acide urique

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux libres. Les propriétés antioxydantes de l'urate *in vivo* peuvent être appréciées indirectement par le fait qu'un produit de réaction de l'urate avec les EROs, est présent à des taux élevés lors d'un stress oxydant [35].

6.2.7. La bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticulo-endothéliales. Composé non hydrosoluble, elle se lie à l'albumine dans un rapport stœchiométrique 1/1, ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine est capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singlet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires [35,41].

6.2.8. Les polyphénols

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre [35].

6.2.9. Les oligoéléments

Les oligoéléments (zinc, cuivre et sélénium) ne sont pas des antioxydants en tant que tels, car ils ne peuvent pas piéger les radicaux libres, mais ils jouent un rôle primordial comme cofacteur de nombreuses enzymes. Le zinc et le cuivre sont des cofacteurs de la SOD alors que le sélénium est un cofacteur de la GPx[35]. (voire chapitre II)

7. Les conséquences du stress oxydatif

Les conséquences biologiques du stress oxydatif seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion ; des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire,

entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydatif : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, et immunosuppression.

Dans plusieurs maladies graves, notamment celles liées au vieillissement, le stress oxydatif est le facteur déclenchant originel. C'est le cas des cancers, des pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire), des maladies neurodégénératives (ataxies, sclérose latérale, maladie d'Alzheimer). La sclérose latérale amyotrophique familiale est l'exemple le plus démonstratif, puisque cette maladie génétique est due à un défaut sur le gène de l'enzyme antioxydant superoxyde dismutase. Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydatif est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida ou le choc septique, le diabète, la maladie de Parkinson ou l'insuffisance rénale[25].

Tableau III : Liens entre les maladies humaines et le stress oxydant[42].

Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres	Maladies où le stress oxydant est la cause primordial	Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs	Maladies entraînant un stress oxydant secondaire
✓ Agranulomatose septique ✓ Psoriasis	✓ Cancer ✓ Auto-immunité ✓ Cataracte ✓ Dégénérescence maculaire ✓ Sclérose latérale amyotrophique ✓ Photo-vieillissement cutané ✓ Photosensibilisation ✓ Irradiation ✓ Intoxication : CCl₄, Fe, Cd, alcool ✓ Hémochromatose	✓ Maladie d'Alzheimer ✓ Stérilité masculine ✓ Maladies virales : EBV, HBV ✓ Rhumatismes ✓ Athérome ✓ Asthme ✓ Insuffisance respiratoire	✓ Diabète ✓ Insuffisance rénale ✓ Mucoviscidose ✓ Sida ✓ Choc septique ✓ Infarctus de myocarde ✓ Parkinson ✓ Ischémies/reperfusion ✓ Brûlures ✓ thalassémie ✓ Greffe d'organes

8. Évaluation du stress oxydant

Un grand nombre de techniques actuellement utilisables pour évaluer le stress oxydant ont fait l'objet d'ouvrages ou de revues. Toutefois, ce domaine de la biologie n'a pas encore été étudié avec la rigueur et le souci de standardisation et d'optimisation des méthodes, habituels en biologie clinique. Une grande disparité de techniques et de résultats complique donc

l'interprétation des résultats et alimente polémiques et désarroi de celui qui est désireux d'aborder ces techniques. Par ailleurs, il existe des difficultés inhérentes à cette exploration, liées à la rapide fugacité des espèces radicalaires, à l'oxydabilité des paramètres redox, ainsi qu'à la localisation de ce stress dans un type donné et d'un nombre réduit de cellules dans un tissu sain(21).

L'exploration du statut radicalaire peut se faire selon quatre axes[35] :

1. la détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques;
- 2. le dosage des oligo-éléments;**
3. la mesure des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l'ADN et des protéines;
4. l'identification de sources génératrices de stress oxydant (inflammation, hyperglycémie, hyperhomocystéinémie).

Tableau IV : Antioxydants et marqueurs d'oxydation[35].

Marqueurs	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de référence
ANTIOXYDANTS		
vitamine C	piégeur de radicaux libres marqueur de la consommation de fruits valeur plasmatique basse associée avec l'apparition de diverses pathologies	H : 8,6 à 18,83 µg / ml F : 6,21 à 15,18 µg / ml
α- tocophérol	inhibiteur de la peroxydation lipidique action de synergie avec la vitamine C (rapport idéal de concentration)	8 à 15 mg / litre
γ- tocophérol	valeur plasmatique basse plus prédictive que l'α- tocophérol dans survenue de pathologies cardiovasculaires et de cancer de la prostate	la 0,28 à 2,42 mg / litre
vitamine A	piégeur de radicaux libres implication dans la vision	1200 à 3700 UI / litre
β- carotène	marqueur de la consommation de légumes piégeur de l'oxygène singulet, inhibition à forte concentration de mécanismes physiologiques de défense	0,05 à 0,68 mg / litre
glutathion réduit	glutathion réduit marqueur de la présence d'un stress oxydant	717 à 1110 µMol/litre
glutathion oxydé	action de synergie avec la vitamine C	1,17 à 5,32 µMol/litre
ubiquinone	inhibiteur de la peroxydation lipidique implication dans la chaîne respiratoire mitochondriale	0,3 à 1,39 mg / litre
acide urique	antioxydant possédant la plus forte réactivité avec les radicaux libres reflet de la présence de phénomènes d'ischémie - reperfusion	H < 70 mg / litre F < 60 mg / litre
vitamines B6, B9 et B12	régulatrices de la concentration plasmatique en homocystéine implication dans la synthèse de l'ubiquinone	B9 : 2,2 à 17,5 ng / ml B12 > 200 pg / ml
superoxyde dismutase (SOD)	élimination de l'anion superoxyde	785 à 1570 UI / g Hb
785 à 1570 UI/g Hb	élimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques reflet d'une adaptation au stress oxydant facteur de risque cardiovasculaire	H : 20-56 UI / g Hb F : 26-58 UI / g Hb
OLIGOÉLÉMENTS		
sélénium	co - facteur des différentes GPx rôle dans l'immunité	94-130 µg / litre
cuivre	co - facteur de la SOD facteur prooxydant à forte concentration	F : 0,8-1,55 mg / litre H : 0,7-1,40 mg / litre
zinc	co - facteur de la SOD inhibe les réactions d'oxydation induites par le cuivre-rôle dans l'immunité	0,8-1,20 mg / litre
rapport Cu/Zn	marqueur de la présence d'un stress oxydant corrélation positive avec le taux plasmatique de peroxydes lipidiques	1 - 1,17

Parmi tous ces paramètres, pointons quelques analyses intéressantes :

- Le rapport vitamine C / α -tocophérol : ces deux antioxydants agissent en synergie et la valeur optimale du rapport doit être supérieure à 1,3. Des valeurs inférieures sont clairement associées avec un risque accru de développer des maladies cardio-vasculaires.
- Le rapport glutathion réduit (GSH) / glutathion oxydé (GSSG) est un excellent marqueur du stress oxydant et de son importance. En effet, le GSH réagit très rapidement avec les EOA pour former le GSSG ; plus la valeur de ce rapport est basse, plus le stress oxydant est élevé.
- Le rapport Cu/Zn : à concentration élevée, le cuivre devient pro-oxydant et favorise la formation des EOA. A l'opposé, le zinc inhibe les réactions radicalaires induites par le cuivre. La mesure du rapport plasmatique Cu/Zn est donc un excellent marqueur du stress oxydant. De plus, il existe une corrélation positive étroite entre la valeur de ce rapport et le taux circulant de peroxydes lipidiques.
- Les isoprostanes : ils résultent spécifiquement de l'attaque des radicaux libres oxygénés sur l'acide arachidonique et ils sont des marqueurs terminaux stables de la peroxydation lipidique («gold standard technique»). Ils sont stables *in vivo* et *in vitro* ; ils peuvent être dosés à des concentrations picomolaires (GC/MS), mais il faut une extraction et un appareillage spécifiques; ils ne sont pas affectés par l'alimentation. Par ailleurs, leur formation *in vivo* est corrélée à l'importance du stress. L'étude CARDIA, réalisée chez 2.850 jeunes adultes, a montré la présence de calcifications des artères coronaires chez 10% des sujets (21). Les taux plasmatiques de F2-isoprostanes étaient corrélés à la présence de calcifications des artères coronaires, confirmant ainsi que la peroxydation lipidique pourrait avoir un rôle initiateur dans le développement précoce de la plaque d'athérome (22). Il est à noter que ce marqueur est de loin beaucoup plus spécifique de la peroxydation lipidique que le classique dosage (et malheureusement toujours utilisé) de la malondialdéhyde par la méthode des TBARS.
- Les LDL oxydées et les anticorps anti-LDL oxydées : il existe une relation étroite entre l'élévation des taux plasmatiques de ces marqueurs et la progression de l'athérosclérose (23). Des études ont montré que les taux plasmatiques de LDL oxydées sont élevés chez les patients présentant un syndrome métabolique ou des troubles cardio-vasculaires (angor instable, infarctus du myocarde) . De même, l'instabilité de la plaque d'athérome est liée à l'accumulation intrinsèque de LDL oxydées .

- La 8-OH-2-désoxyguanosine (8-OH-dG) : ce métabolite résulte de l'action d'EOA sur la guanine et son dosage urinaire correspond à une évaluation globale des dommages oxydatifs du DNA.
- Les A.O.P.P. ou «Advanced Oxidised Protein Products» : les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines sont la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés. Des taux élevés de protéines oxydées ont été observés dans le liquide synovial et le plasma de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde.
- La myéloperoxydase ou MPO : c'est un marqueur de l'activation des granulocytes et il joue un rôle fondamental dans les processus de défense de l'organisme, via la production d'acide hypochloreux (HOCl). Des études récentes ont montré que la MPO serait un marqueur potentiel de l'athérosclérose. Les individus déficitaires en MPO présenteraient moins de maladies cardio-vasculaires alors qu'une élévation des taux de MPO serait associée avec un risque plus élevé de maladie coronarienne. Une MPO > 350 µg/litre permettrait d'identifier les personnes à risque d'infarctus du myocarde dans une période de 1 à 6 mois avant l'attaque.
- La C-Réactive Protéine ou CRP : c'est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation, synthétisée dans le foie et régulée par des cytokines, principalement l'IL-6 et le TNF-alpha. L'inflammation participe à la pathogénie de l'athérosclérose dès les stades les plus précoces et pourrait influencer la survenue de syndromes coronaires aigus.
- Le statut en fer de l'organisme : le fer est indispensable à la vie, il joue un rôle important dans le transport de l'oxygène, le transfert des électrons et la catalyse enzymatique. A l'état libre, ce Fe²⁺ est un puissant donneur d'électrons, réagissant notamment avec l'eau oxygénée, pour générer des radicaux hydroxyles hautement réactifs (réaction de Fenton).

Dans les conditions physiologiques, la transferrine possède une capacité importante de fixation du fer puisqu'elle est saturée à 30% environ. En situations pathologiques, le fer peut être libéré de ses protéines de transport (ferritine, lactoferrine) sous l'action des EOA et se retrouver dans le sang sous forme libre, capable d'initier des réactions radicalaires.

Le dosage du fer, de la transferrine et de sa saturation donnera une indication sur l'état de stress oxydant du patient.

- L'homocystéine : son élévation est un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant. L'hyperhomocystéinémie altère le phénotype antithrombotique physiologique des cellules endothéliales, démasque leur potentiel pro-coagulant et perturbe les mécanismes de

production de NO• endothélial. L'auto-oxydation de l'homocystéine produit des EOA qui stimulent la peroxydation lipidique et la production d'AOPP et de dérivés AGE, athérogènes .

- La capacité antioxydante totale du plasma : il s'agit d'une méthode de mesure globale qui consiste à évaluer l'effet inhibiteur des antioxydants plasmatiques sur une réaction radicalaire induite *in vitro*. De très nombreux tests ont été proposés, mais la vérité oblige à dire qu'ils sont relativement peu spécifiques. Une méthode émergente semble être le test ORAC («Oxygen Radical Antioxidant Capacity»), mais il est absolument impératif de corrélérer sa mesure avec celle des protéines totales et de l'acide urique pour interpréter correctement les données. Ceci est vrai pour toutes les autres méthodes proposées dans ce domaine [35].

1. Définition

La définition d'oligoélément fût donnée par Gabriel Bertrand, pharmacien et docteur en sciences, au début du XXème siècle. Quatorze éléments ont été identifiés comme essentiels pour le fonctionnement de l'organisme (Zn, Cu, Fe, Mg...). Parmi ces éléments traces, 3 oligoéléments jouent un rôle primordial dans l'activité antioxydante : Zn, Cu et Sn.

Les oligoéléments (du grec oliogos qui signifie peu) sont présents en faible quantité dans l'organisme, à l'état de trace, ils sont indispensables à de nombreuses fonctions biologiques et physiologiques de l'organisme (figure 6)[43], ils ont la particularité de se fixer sur des protéines (les métalloprotéines) en modifiant leurs propriétés. L'essentialité des oligoéléments répond aux critères fixés par Cotzias en 1967, à savoir être présent dans les tissus vivants à une concentration relativement constante, et provoquer par leur retrait de l'organisme, des anomalies structurales et physiologiques voisines dans plusieurs espèces[44].

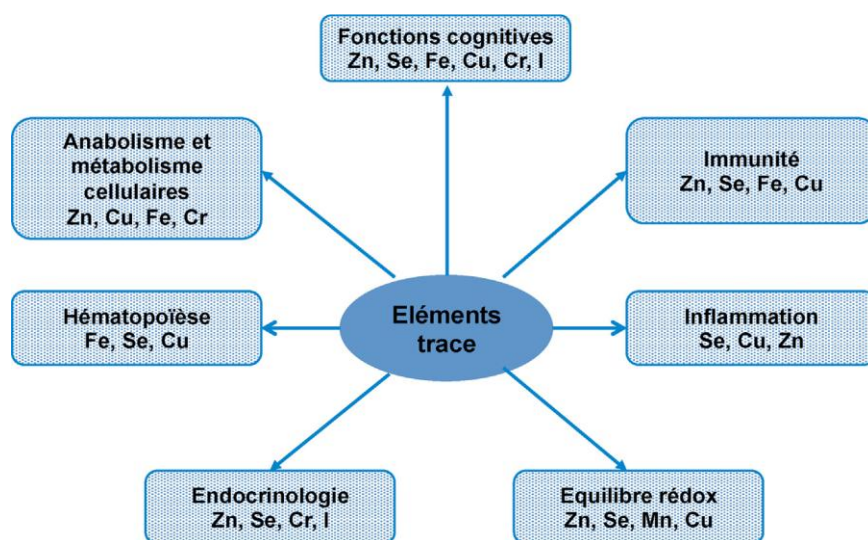


Figure 7: Principales fonctions des éléments-trace[43]

2. Étude des principaux oligo-éléments

2.1. Zinc

2.1.1. Historique

Le zinc est un élément chimique relativement abondant. Il représente 0,004 % de la croûte terrestre. C'est un oligo-élément essentiel intervenant notamment dans le développement cellulaire et présent dans près de 200 enzymes[45].

En biologie, Raulin (1869) découvre qu'*Aspergillus niger* contient du zinc. Quelques années plus tard, Lechartier et Bellamy (1877) constatent sa présence dans divers organismes végétaux et animaux; la même année, Raoult et Breton révèlent sa présence dans le foie humain. Dans les années qui suivent, le zinc a été mis en évidence dans la plupart des plantes et des animaux à des concentrations un peu moins élevées que le fer, mais plus importantes que celles du manganèse et du cuivre. En 1934, la diminution des performances de croissance des rats et des souris, induite par la réduction de l'apport alimentaire du zinc a révélé le caractère essentiel de cet élément. Cette observation a été rapportée presque simultanément en Europe et en Amérique.

En 1940, le zinc fut identifié dans l'enzyme anhydrase carbonique isolée et purifiée [46].

2.1.2. Variétés et propriétés physiques

Le zinc (Zn) est un métal de transition, de numéro atomique 30 et de masse atomique 65,38. Il appartient au groupe 12, de période IV et de bloc d de la classification périodique.[47]. C'est l'élément le plus abondant après le fer, présent très souvent à l'état de traces dans les sulfures naturels où il se substitue au soufre. Il est présent dans la nature sous forme de cinq isotopes: ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn et ^{70}Zn [48].



Figure 8: Configuration électronique du zinc[49]

2.1.3. Propriétés chimiques

Chauffé à des températures élevées, le zinc brûle dans l'air avec émission de fumées bleu-verdâtre d'oxyde de zinc, la poudre de zinc peut s'enflammer spontanément en présence d'humidité.

A températures ordinaire et en atmosphère parfaitement sèche, le zinc pur est stable. L'oxydation ne commence d'une manière sensible que vers 225⁰ C.

- ✓ Il peut être attaqué lentement par l'acide sulfurique et l'acide chlorhydrique dilués avec dégagement d'hydrogène: la réaction est favorisée par la présence d'impuretés dans le métal tel que le cuivre, le fer, le nickel...
- ✓ Le zinc réagit lentement avec l'ammoniaque et l'acide acétique, plus rapidement avec l'acide nitrique (avec formation d'oxyde d'azote et parfois d'azote).
- ✓ Il est sensible à la plus part des substances organiques, à conditions que celles-ci soient exemptes d'acidité et d'humidité.
- ✓ La poudre de zinc peut réagir de manière explosive avec divers produits: soufres, chlorates, chlorures, fluorures, nitrates de potassium...[50].

2.1.4. Rôle physiologique

Le zinc intervient dans les grandes voies métaboliques, grâce à son rôle dans les systèmes enzymatiques: soit en faisant partie intégrante du site actif de nombreuses enzymes, soit comme cofacteur régulant l'activité des enzymes dites enzymes dépendantes, soit en ayant un rôle structural propre.

Le zinc influence ainsi l'activité de plus de 70 enzymes, dont l'anhydrase carbonique, la superoxyde dismutase (SOD), la phosphatase alcaline, les glutamate et lactate déshydrogénases, ADN et ARN polymérase... Il joue également un rôle dans l'activité de certaines hormones: hormones de croissance, prostaglandines, insuline, prolactine, testostérone, thymuline. La participation du zinc à l'activité de ces enzymes et hormones explique l'importance de ce métal dans tous les métabolismes (lipides, protéines et glucides) et toutes les fonctions de l'organisme (l'immunité, croissance, fertilité cicatrisation, goût et vision...), la prostate est la glande de l'organisme qui concentre et contient le plus de zinc [48].

2.1.5. Principales sources alimentaires

Le zinc est certainement le micronutriment dont la biodisponibilité est la plus sensible aux déficits, en raison des nombreux facteurs alimentaires qui peuvent interférer avec cet élément. Certaines interactions sont bien décrites, notamment avec le fer, le calcium et les phytates qui diminuent son absorption, ou avec le thé, les fructo-oligosaccharides qui la favorisent. Le zinc est principalement apporté par la viande (43 %), les œufs (24 %), les produits laitiers (24 %), les céréales, les racines et les légumes secs (23 %). La biodisponibilité du zinc varie selon les situations physiologiques. Ainsi, avec l'âge, la capacité d'absorption diminue alors qu'elle augmente au cours du dernier trimestre de la grossesse et en cas d'allaitement. La biodisponibilité du zinc, dans le cadre d'une alimentation variée, est estimée à 20-30 %, mais elle peut s'élever à 50-55 % dans une alimentation à base de produits d'origine animale, et jusqu'à 60 % lorsque le zinc est ingéré seul [51].

2.1.6. Besoins et apport en zinc

Le corps humain contient 2 à 3g de zinc, et est ainsi le deuxième oligoélément le plus abondant après le fer. On retrouve le zinc partout dans le corps, mais avec toute fois des concentrations plus élevées dans les muscles (60%), le squelette (30%), le foie, les reins et la prostate.

La dose journalière de zinc recommandée est de 12mg/jour pour une femme adulte et de 15mg/jour pour un homme adulte. L'OMS conseille des fourchettes de 12,8 à 54,5 mg/jour. Cette dose quotidienne dépend non seulement de la nourriture mais également du sexe, de l'âge et de l'état de santé générale de la personne. Les nourrissons en période de croissance, les enfants, les adolescents, les femmes enceintes (besoin étant doublés), pendant la lactation (besoins étant

quintuplés) et les personnes âgées ont une demande accrue en zinc et présentent des risques de carence en zinc plus important [52].

2.1.7. Carence en zinc

Si les carences profondes d'origine nutritionnelle ont disparu dans les pays industrialisés, des études menées dans de nombreux pays européens ou nord-américains ont montré que la fréquence des subdéficits y était encore non négligeable [51]. Les carences en zinc se traduisent par un certain nombre de signes cliniques, en fonction de la gravité de la maladie. Les carences sont d'origines variables, elles peuvent être dues à un apport insuffisant de zinc dans l'alimentation, à une malabsorption de cet oligoélément, à une augmentation des besoins (croissance, grossesse) ou à des différents états pathologiques (diarrhée, alcoolisme, diabète, infection).

Les symptômes carenciels varient selon leurs gravité : retard de croissance, altérations de la peau et des muqueuses (dermite séborrhéique, inflammation de la commissure des lèvres, éruption semblable à l'eczéma ou au psoriasis), chute des cheveux, perte du goût, diminution de l'appétit, problèmes de cicatrisation, troubles de l'immunité et de la maturation sexuelle (atrophie des gonades : testicules, ovaires), diminution de la spermatogenèse et, chez la femme enceinte, risque de malformations et d'hypotrophie fœtales[53].

2.1.8. Toxicité du zinc

2.1.8.1. Toxicité aiguë

Le zinc, sous sa forme métallique, présente une faible toxicité par inhalation et par voie orale. Par contre, certains composés du zinc sont responsables d'effet délétères chez l'homme et l'animal. La plupart des cas sont la conséquence d'un empoisonnement alimentaire ou d'un environnement industriel pollué. DL50 du zinc poudre est 2 g Zn/kg par voie orale [54, 55].

.

2.1.8.2. Toxicité chronique

➤ Effets systémiques

On connaît peu de choses sur la toxicité à long terme du zinc par inhalation. Il a été rapporté que des travailleurs dans la métallurgie présentaient une fréquence plus élevée de problèmes gastro-intestinaux. Toutefois, ces individus avaient pu être exposés à d'autres composés chimiques.

Par contre, des travailleurs ayant été exposés entre 2 à 35 ans à des concentrations inférieures à 130 mg Zn/ m³, ne présentaient qu'un léger dérangement abdominal occasionnel[55].

➤ **Effets cancérigènes**

Le zinc et ses dérivés n'ont pas fait l'objet d'une classification par le comité de recherche sur le cancer (CIRC). Des études réalisées en milieu professionnel n'ont pas montré d'augmentation significative de l'indice des cancers en relation avec l'exposition au zinc[54].

2.2. Cuivre

2.2.1. Historique

Le cuivre est le métal le plus anciennement utilisé par l'homme, car on pouvait le trouver dans le sol à l'état presque pur (état natif). Il ne nécessitait donc pas de gros travail d'affinage.

Le cuivre fut utilisé avant le bronze (alliage étain-cuivre utilisé à partir de 3500 avant JC), et le fer (à partir de 1800 avant JC).

L'origine du nom cuivre (lat. : Aes Cyprium) vient de l'île de Chypre qui produisait du cuivre d'une qualité supérieure aux autres.

Les boussoles, balances, pièces métalliques à bord des navires étaient en cuivre ou en laiton (alliage de cuivre et de zinc), en raison de leur résistance à la corrosion[56].

2.2.2. Variétés et propriétés physiques

La plupart des composés de cuivre présentent deux états d'oxydation : cuivre(I) et cuivre (II) qui sont nommés cuivreux pour cuivre(I), et cuivrique pour le cuivre (II).

❖ **Cuivre (I)**

Le cuivre (I) est la principale forme que l'on rencontre.les halogénures cuivreux sont bien connus, sauf le fluorure : CuCl, CuBr, CuI.

❖ **Cuivre (II)**

Le cuivre (II) se rencontre très couramment.

Le sulfate de cuivre (II) est constitué d'un penta-hydrate bleu cristallin qui est le composé de cuivre le plus commun au laboratoire. On s'en sert de fongicide, sous le nom de bouillie bordelaise.

Le carbonate de cuivre (II) constitue le dépôt vert qui donne l'aspect spécifique des toits ou coupoles recouverts de cuivre des anciens bâtiments.

Tableau V : Propriétés physiques du cuivre[57].

Poids atomique	63,54g/mol
Structure électronique	1s ² , 2s ² , 2p ⁶ , 3s ² , 3p ⁶ , 3d ¹⁰ , 4s ¹
Isotopes	Cu 63 (69,2%) ; Cu 65 (30,8%)
Densité	8,92 (selon une autre source 8,86 à 15°C et 8,36 à 1100°C)
Température de fusion	1084°C
Température d'ébullition	2305°C

Le cuivre est de la même famille que l'argent et l'or, car chacun possède une orbitale S occupée par un seul électron sur des sous-couches totalement remplies, ce qui permet la formation de liaisons métalliques.

Il se travaille facilement, étant ductile et malléable, ainsi que son excellente conductivité électrique le rendent très utile en électricité[58].

Le cuivre liquide apparaît verdâtre, une caractéristique qu'il partage avec l'or lorsque la luminosité est faible [59].

2.2.3. Propriétés chimiques

- La plupart des éléments sont solubles dans le cuivre, et peuvent constituer avec lui des alliages dont certains ont des applications d'un intérêt considérable. Le domaine d'application des alliages de cuivre et en particulier du laiton est immense.
- Le cuivre et ses alliages ne sont pas attaqués par l'eau ni par un grand nombre de produits chimiques. On met cette propriété à profit pour faire des tuyaux en cuivre ou des récipients et conteneurs pour de nombreuses industries. La robinetterie est en laiton ou en bronze. Les toitures en cuivre défient le temps.

- Le cuivre ne réagit pas avec l'eau, mais réagit lentement avec l'oxygène de l'air en formant une couche d'oxyde de cuivre brin-noir. Contrairement à l'oxydation de fer par une atmosphère humide, cette couche d'oxyde de cuivre empêche toute corrosion en masse [60].

2.2.4. Rôle de cuivre dans l'organisme

A très faible dose, le cuivre est un élément essentiel chez l'homme et l'animal, impliqué dans de nombreuses voies métaboliques. Reconnus dès 1973 par l'OMS comme oligoélément essentiel, le cuivre est un micronutriment faisant partie des douze métaux lourds indispensables aux fonctions biologiques normales.[61]

Le cuivre est essentiel à l'action de nombreuses enzymes. A ce titre, il intervient dans le métabolisme de plusieurs nutriments : glucides, lipides et fer.

Il contribue à la formation des globules rouges, aux défenses immunitaires, à la minéralisation osseuse, à la régulation des neurotransmetteurs, à la production de mélanine .

- ✓ Le cuivre a aussi un rôle antioxydant, c'est un cofacteur de la superoxyde dismutase (SOD).

2.2.5. Principales sources alimentaires

La teneur en cuivre est importante dans les abats, les crustacés, les escargots, les légumes et les fruits secs (noix et cacahuètes), les champignons et le chocolat.

Tableau VI : teneur des aliments en cuivre par ordre décroissant des plus riches aux plus pauvres[62].

Aliments	Valeurs moyennes en mg/kg de poids sec
Flocons d'avoine	8,8
Pain de seigle	3,5
Viande de poulet	3,4
Œuf de poule	2,5
Pomme de terre	2,2
Bananes	1,3
Viande de bœuf	0,9
Pommes et poires	0,9
Lait de vache	0,4

2.2.6. Besoins et apports alimentaires

Les besoins optimaux en cuivre sont classiquement estimés à 2-3 mg/j pour l'adulte, 80µg/kg/j pour le nouveau-né et de 100µg/kg/j pour le prématuré [63,64].

Il est admis que l'apport quotidien en cuivre par la nourriture est chez l'adulte de l'ordre de 2mg/jour/kg de matières sèches, dont environ 50% sera absorbé au niveau intestinal, le reste étant éliminé tel quel par les fèces [65].

2.2.7. Valeurs physiologiques

Chez l'Homme, l'intervalle des valeurs physiologiques de cuivre dans le sérum est en moyenne de 800 à 1200µg/l (OMS 1996).

Ces valeurs sont plus élevées de 10% chez la femme, soit 1320µg/l [65].

A faible dose, c'est un oligoélément essentiel, tandis qu'en excès, c'est un redoutable toxique.

2.2.8. Carence en Cuivre

Les carences en cuivre sont très rares, mais si elles existent, elles se traduisent par une diminution de la concentration plasmatique en céruléoplasmine et donc par une mauvaise utilisation du fer et des enzymes à cuivre.

On peut alors noter l'apparition d'anémie résistante au traitement par le fer, d'arthrite, de cancers, de maladies cardiovasculaires, d'épilepsie, de syndrome métabolique, d'une diminution des fonctions immunes, des maladies inflammatoires, d'ostéoporose...

Un apport alimentaire faible, une absence des protéines de transport et de stockage, un traitement corticoïde au long cours (augmentation de l'excrétion en cuivre) sont des facteurs responsables d'une carence en cuivre [65].

Tableau VII : La carence en cuivre peut être d'origine génétique ou acquise [64].

Carences génétiques	Carences acquises
maladie de menkès	Malabsorption
maladie des cornes occipitales	Pertes excessives
Neuropathies motrice distale liée à l'X	Origine médicamenteuse

2.2.9. Toxicité du cuivre

Le cuivre et les composés cupriques peuvent causer une action toxique par inhalation, ingestion, voies cutanées et oculaires. Les sels de cuivre sont des agents particulièrement irritants.

Les principales formes toxiques chez l'homme sont les formes solubles de cuivre c'est-à-dire les sels de cuivre II (acétate, carbonate, chlorure, hydroxyle, nitrate, oxyde, oxychlorure de sulfate).

➤ **Par inhalation**

Chez les salariés exposés à des poussières ou des fumées de cuivre, des syndromes de « fièvre des fumées de métaux » (fièvre, céphalée, sécheresse buccale, sueurs froides et douleurs musculaires) ont été observés notamment pour des concentrations de 0,075 à 0,12 mg de cuivre/m³.

➤ **Par voie orale**

Généralement dus à des contaminations de boissons ou à des ingestions accidentelles ou volontaires (suicides) de grandes quantités (de 0,4 à 100g de cuivre) de sels de cuivre II et notamment de sulfate de cuivre.

Les cas d'intoxication par l'eau de boissons correspondent également à des doses élevées, de 35 à 200mg/L de cuivre.

➤ **Par voie cutanée**

Par voie cutanée, le cuivre et ses sels induisent une dermatite de contact allergique prurigineuse. Le niveau de sensibilisation correspond à un contact de 24 à 48 heures avec 0,5 à 5% de sulfate de cuivre présent dans l'eau ou de l'huile de vaseline [66].

2.3. Sélénium

2.3.1. Historique

Le sélénium (Se) est un des éléments les plus rares avec une abondance dans la croûte terrestre le situant à la 70^{ème} place ; l'origine de son nom est sélène déesse de la lune chez les grecs. Il fut connu depuis longtemps pour sa toxicité. Les premiers effets furent décrits et rapportés par Marco Polo au 13^{ème} siècle (1295) [67].

En 1817 le chimiste suédois Jakob Jöns Berzelius a identifié le sélénium dans un résidu de préparation de l'acide sulfurique [68]. La relation sélénium-intoxication animale fut établie par Japha en 1842. Alors que son rôle essentiel ne fut décelé qu'en 1957 par Swarz et Foltz qui démontrèrent son effet préventif de la nécrose du foie chez les rats nourris aux levures de *torula*[69]. Grâce aux travaux de Rotruck le mode d'action de la vitamine E fut séparé de celui du sélénium en découvrant la présence du sélénium dans le site actif de l'enzyme de la glutathion peroxydase (GPx). Ainsi le rapport fondamental entre le sélénium et la GPx a été établi. En dépit de l'importance de ce processus métabolique, de nombreux chercheurs se sont intéressés aux propriétés biologiques du sélénium et de son devenir chez l'animal et l'homme [70].

2.3.2. Variétés et propriétés physiques du sélénium

De la famille des chalcogènes, le sélénium est un métalloïde du groupe de l'oxygène de symbole **Se**, de numéro atomique 34 et de masse atomique 78,96. Il appartient au groupe 16 (ou VIa) de la classification périodique. C'est un élément rare, présent très souvent à l'état de traces dans les sulfures naturels où il se substitue au soufre. Il est présent dans la nature sous forme de six isotopes stables: **Se74**, **Se76**, **Se77**, **Se78**, **Se80** et **Se82** et au moins 7 isotopes non stables. Parmi eux **Se75** et **Se81** [71,72].

Le sélénium se trouve dans la nature sous plusieurs formes allotropiques à savoir :

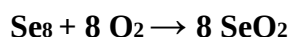
- ✓ Le sélénium rouge amorphe, poudre rouge-brique (Figure 7).
- ✓ Le sélénium vitreux, masse amorphe, vitreuse et brunâtre qui se forme par refroidissement brutal du sélénium liquide.
- ✓ Le sélénium gris, parfois improprement appelé sélénium métallique, cristallisé dans le système trigonal et considéré comme la forme la plus stable (Figure 7) [73].



Figure 9 : Image des deux allotropes de sélénium gris et rouge [73].

2.3.4. Propriétés chimiques

Le sélénium est un produit solide, stable, insoluble dans l'eau et les solvants organiques usuels et qui ne s'oxyde pas à température ordinaire. Fortement chauffé, il s'enflamme et brûle avec une flamme bleue et forme le dioxyde de sélénium en répandant une odeur caractéristique désagréable.



Le sélénium a des propriétés analogues avec le soufre et le tellure, ce qui explique la similitude rencontrée entre leurs composés et ceux du sélénium

Les degrés d'oxydation du sélénium sont nombreuses (-2, 0, +2, +4, +6). Il peut former des sels oxygénés ou réaliser des liaisons covalentes. Ainsi il peut être présent sous sa forme métallique libre mais aussi sous formes minérales et organiques liées à d'autres éléments tel que le plomb et le cadmium, les aminoacides et les protéines [74,75].

2.3.5. Rôle physiologique

Le sélénium est le constituant des sélénoprotéines, qui sont au nombre de 35 mais pour un grand nombre d'entre elles, leur rôle n'a pas été élucidé. (10) La glutathion peroxydase connue pour réduire le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes en eau ou en alcool possède quatre atomes de sélénium dans ses quatre sous unités.

En plus de son rôle antioxydant, le sélénium joue un rôle important dans l'immunité et l'inflammation. Ainsi, le sélénium est impliqué dans la régulation du système immunitaire, et des études ont montré que chez l'animal, un apport supplémentaire améliore l'immunité retardée, stimule la réactivité des lymphocytes et favorise le rejet de greffe. Le sélénium montre également à certaines doses une activité anti-tumorale qui permet de prévenir le cancer. Le sélénium permet en effet aux cellules de conserver leur potentiel immunocompétent [76].

2.3.6. Principales sources alimentaires

Ce sont les aliments protéiques (viandes, poissons, crustacés, abats, oeufs, céréales) qui sont les plus riches en sélénium, mais leur biodisponibilité varie de 20 % à 50 % pour les produits de la mer et atteint plus de 80 % pour les céréales et la levure de bière. La sélénométhionine semble être le composé majeur des aliments solides, alors que le sélénium inorganique (sélénite et sélénate) est présent dans les eaux de boisson. Les groupes thiols et la vitamine C favorisent la biodisponibilité du sélénium, alors que les fibres et les métaux lourds la diminuent.[51]

2.3.7. Besoins et apports

L'apport optimal est difficile à définir, mais la dose de 1 µg/kg de poids corporel est une dose qui semble adéquate pour maintenir pertes et apports en équilibre. De tels niveaux d'apports conduisent à une saturation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase, mais d'autres sélénoprotéines optimisent néanmoins leurs activités pour des apports moindres en sélénium.

Certaines régions apparaissent particulièrement dépourvues de sélénium (Chine, Nouvelle-Zélande et certains pays européens, etc.), alors que d'autres ont des apports plus élevés (États-Unis, Canada, Japon). Ces variations inter-pays très marquées sont à prendre en compte lorsque se pose la question de l'utilisation de suppléments formulés à l'échelle internationale. Les apports en Europe atteignent rarement les apports recommandés. En effet, des apports journaliers aussi bas que 30 µg/j dans les pays de l'Est et 30 à 40 µg/j en France ont été rapportés. En Angleterre, la diminution sensible des apports de 60 à 30 µg/j a provoqué un débat quant à la nécessité d'augmenter les apports sélénisés. Pour le moment, seule la Finlande a choisi via les engrais un enrichissement du blé en sélénium pour lutter contre les déficits d'apports [51].

2.3.8. Carence en Sélénium

Le sélénium plasmatique et la glutathion peroxydase érythrocytaires restent les marqueurs les plus utilisés en biologie clinique. Les carences profondes se rencontrent dans les régions dont les sols sont séléniprives (Chine). Deux maladies sont dues à une carence endémique sévère en sélénium : la cardiomyopathie de Keshan et la chondrodystrophie de Kaschin-Beck. Les carences marginales dues à des subdéficits d'apports sont plus fréquentes. Sur le plan biologique, on observe alors une baisse du sélénium plasmatique et de l'activité des GPx érythrocytaire et plaquettaire, une augmentation des peroxydes, des troubles de l'immunité et des concentrations élevées de T4. Les signes cliniques de carences marginales sont discrets, voire inexistantes : fatigue, infections accrues, dépigmentation des phanères, arthrose. En France, les déficits biologiques sélénisés (taux plasmatique de sélénium inférieur à 0,74 $\mu\text{mol/l}$) touchent seulement 1,6 % des hommes et 2 % des femmes adultes. Cette proportion augmente chez le sujet âgé qui représente un important groupe à risque de déficit sélénisé, compte tenu des apports bas, de la baisse de biodisponibilité due au vieillissement de l'entérocyte, et des besoins plus élevés pour combattre un stress oxydant qui augmente avec l'âge [69,77].

2.3.9. Toxicité du Sélénium

Jusqu'à 1 000 $\mu\text{g/j}$, l'apport de sélénium n'est pas toxique. Une valeur maximale de 5 $\mu\text{g/kg/j}$ a été définie comme la dose n'induisant aucun risque délétère toute la vie durant. En France, la limite de sécurité a été fixée à 150 $\mu\text{g/j}$, ce qui est bas comparé aux apports journaliers en Finlande ou au Venezuela (100 à 200 $\mu\text{g/j}$). Dans un récent rapport publié en 2006, plus réaliste que les limites françaises, l'European Food Safety Authority fixe à 300 $\mu\text{g/j}$ les tolerable upper levels.[51] Les intoxications aiguës peuvent se traduire par une irritation des muqueuses digestives, respiratoires et oculaires, cette irritation est variable selon le composé et peut aller jusqu'à un effet corrosif sur la peau et les yeux. En cas d'ingestion, des signes neurologiques ont été rapportés. L'inhalation répétée de faibles concentrations peut provoquer une altération de l'état général et une irritation des muqueuses et de la peau. Les données sont insuffisantes pour évaluer l'existence d'un effet cancérigène du sélénium en milieu professionnel. Les études environnementales ne montrent pas d'effet du sélénium sur la fertilité ou le développement [78].

3. L'activité antioxydante des oligoéléments :

✓ **Cuivre et Zinc**

Les superoxydes dismutases (SOD1 et SOD3) sont destinées à éliminer l'anion superoxyde (O_2^-), une espèce réactive de l'oxygène très toxique qui se forme au cours du métabolisme cellulaire, en produisant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) également très dangereux pour la cellule mais détoxifié par les peroxydases.

- La SOD1 est localisée dans le cytoplasme et les peroxysomes de toutes les cellules. Une forte activité est observée dans les cellules très actives sur le plan métabolique comme les hépatocytes ou les cellules rénales ainsi que dans les érythrocytes. Cette enzyme est un dimère constitué de deux sous unités identiques, l'une contenant un atome de zinc et l'autre un atome de cuivre. le zinc a un rôle structural tandis que le cuivre se trouve dans le site actif.
- La SOD3 correspond à la SOD extracellulaire. Son activité et ses caractéristiques sont similaires à celles de la SOD1 [63,79].

✓ **Sélénium**

Les sélénoprotéines jouent un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due aux glutathion peroxydases (GPx), aux Thiorédoxines réductases (TR) et aux sélénoprotéines P. Les GPx détoxifient les peroxydes d'hydrogène et hydroperoxydes organiques, et les TR jouent un rôle essentiel dans les processus antioxydants en réduisant les ponts disulfures intramoléculaires et en catalysant la régénération de la forme réduite de substances telles que vitamines C et E. L'activité antioxydante maintient l'intégrité membranaire et réduit la probabilité de propagation de lésions oxydatives à des biomolécules telles que les lipides, les lipoprotéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN).

Les sélénoprotéines assurent, en synergie avec d'autres molécules de nature enzymatique (superoxyde dismutase, catalase) ou non (vitamine E, C, caroténoïdes, groupes thiols, polyphénols, coenzyme Q10) l'équilibre intra- et extracellulaire de la balance pro- et antioxydants [80].

Généralités:

L'objectif d'une méthode d'analyse est de pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. C'est à dire que l'écart du résultat d'analyse et de la valeur vraie inconnue soit inférieur à une limite d'acceptation (λ) qui peut être variable selon les exigences de l'analyste et de la finalité de la méthode d'analyse. Il apparaît ainsi deux principes fondamentaux: la notion de limite d'acceptation des performances d'une procédure analytique et 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 laquelle elle est destinée.

Inspiré des travaux d'une commission de la SFSTP (2003 et 2006), ce nouveau protocole de validation se veut plus réaliste que le protocole de validation avec critères, en essayant de garantir la qualité des résultats ultérieurs avec un risque connu prédéfinis en fonction de la finalité de la méthode d'analyse validée.

1. Définitions

La validation d'une méthode analytique par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée[81].

Selon la norme ISO 17025 (chapitre 4 et 5) « la validation est une exigence technique qui permet l'évaluation des compétences des laboratoires d'étalonnages et d'analyse ».

Selon ICH Q2 « l'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée ».

2. Cycle de vie d'une méthode analytique

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025. L'idée de base est qu'une méthode d'analyse n'est pas statique, mais une entité vivante qui passe par plusieurs étapes interdépendantes. Ainsi, pour bien comprendre le rôle et la place de la validation, il convient de décrire les différentes étapes de ce cycle[82].

La mise en œuvre d'une procédure de dosage peut s'articuler en quatre grandes étapes tel que l'illustre la figure 10 :

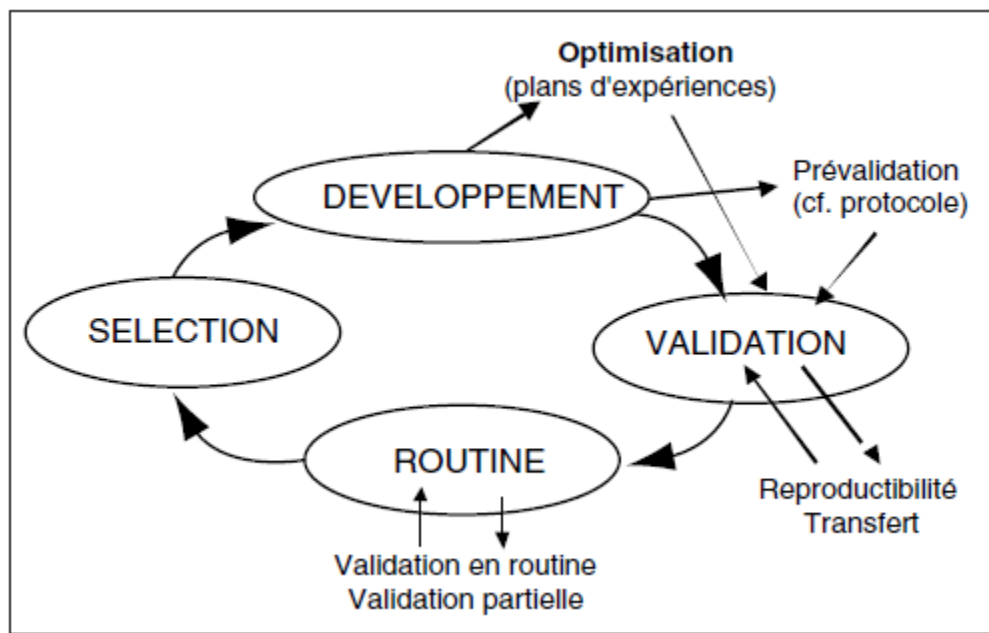


figure 10: Cycle de vie d'une procédure analytique[83].

- ❖ **Une phase de sélection:** qui permet de définir les objectifs et les conditions opératoires initiales;
- ❖ **Une phase de développement:** avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences (optimisation robuste) ;
- ❖ **Une phase de validation** précédée selon les cas, d'une phase de pré-validation ;
- ❖ **Une phase d'application en routine:** incluant le plus souvent une validation en routine.

3. Objectifs de la validation

La validation analytique a pour principal objectif de démontrer l'aptitude et la fiabilité d'une méthode vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur.

Elle permet de garantir que chaque mesure qui doit être réalisée en routine est comprise dans une limite d'acceptation appropriée au type de procédure analytique et au produit concerné. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions et le but dans lesquels la méthode sera utilisée.

Les objectifs de la validation ne sont pas seulement d'obtenir une estimation de la justesse, du biais ou de la fidélité de la méthode, mais également d'évaluer le risque statistique lié à son utilisation, qui peut être exprimé par l'incertitude de mesure associée au résultat[82] .

4. Critères de validation

Les principaux critères de validation selon SFSTP sont résumés dans le tableau 7 suivant[84] :

Tableau VIII: Principaux critères de validation (SFSTP 2003)

Critères	Définitions
La spécificité	La propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ses dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice...
La linéarité	La capacité d'une procédure d'analyse à donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon.
La justesse	Exprime l'écart 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.
La fidélité	La fidélité exprime l'écart de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesure provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les résultats liés au hasard. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : ➤ La répétabilité : exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques et sur un intervalle de temps ; la répétabilité est aussi désignée par : précision intra-analyse. ➤ La fidélité intermédiaire : exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents... ➤ La reproductibilité : exprime la fidélité inter-laboratoires.
L'exactitude	Exprime l'écart de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'écart de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, 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.
Limite de détection	La plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, mais non quantifiée comme valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.
Limite de quantification	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 d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquences de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode ; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation.

5. Choix du protocole de validation

Selon les référentiels, les principaux objectifs de la phase de validation sont de :

- ✓ Démontrer la spécificité (sélectivité),
- ✓ Valider la fonction de réponse (ou modèle d'étalonnage utilisé en routine),
- ✓ Estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire),
- ✓ Estimer la justesse,
- ✓ Estimer l'exactitude,
- ✓ Valider les seuils de quantification,
- ✓ Valider l'intervalle de dosage,
- ✓ Vérifier la linéarité de la procédure analytique.

Le logigramme de la figure 11 présente la démarche proposée par la SFSTP pour sélectionner un protocole de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage.

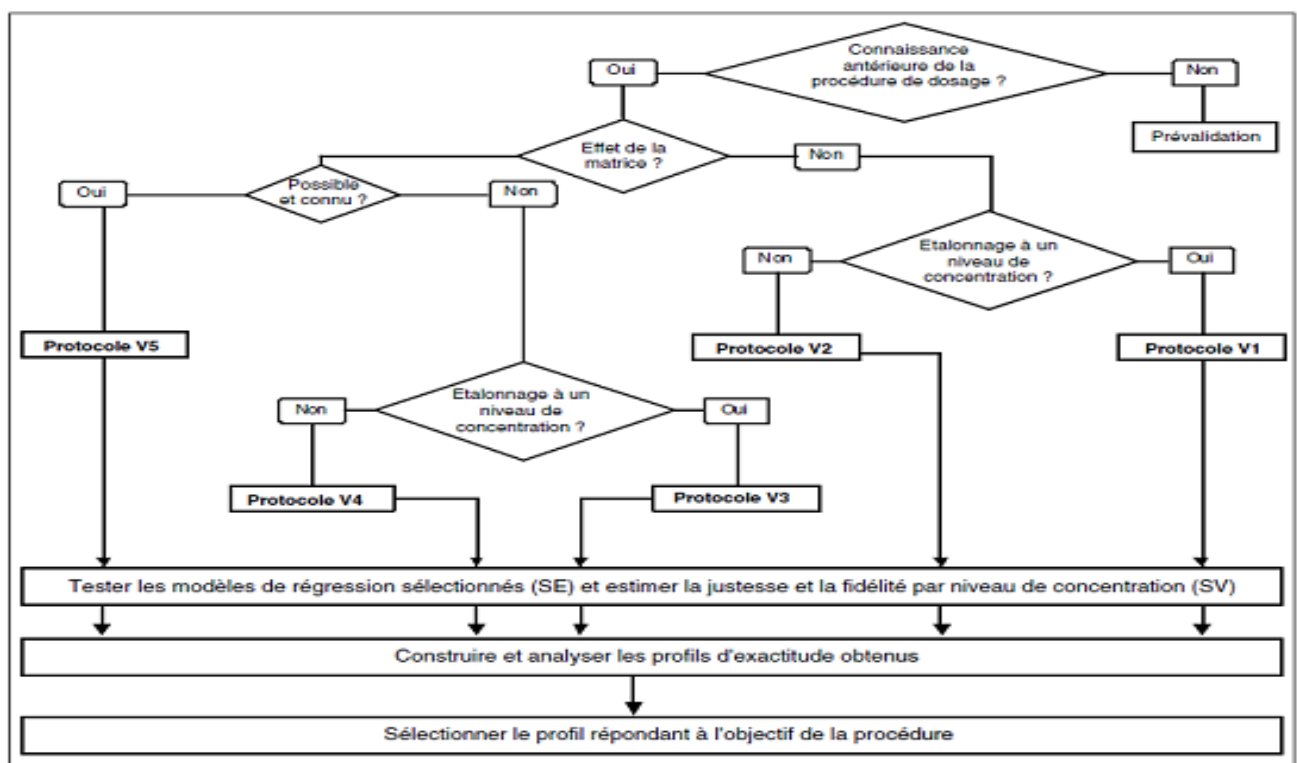


Figure 11: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation[83].

Tableau IX : Choix du nombre de standard d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi[83].

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE: Étalonnage sans matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2	2	2	
	Haut	2	2	2	2	
SE: Étalonnage avec matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2	2
	Haut			2	2	2
	Addit					2
SV: Validation avec matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre minimum de séries			3	3	3	3
Nombre total d'essais (min)		33	45	39	63	45

6. Etude statistique de la validation

6.1. Fonction de réponse

Les mesures effectuées sur les standards d'étalonnage permettent de déterminer la relation entre la réponse Y donnée par l'instrument et la concentration X des solutions. Cette relation est une fonction de type :

$$Y = f(X) + \varepsilon$$

Avec ε , l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse. Cette fonction n'est pas nécessairement linéaire mais elle doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagé.

La fonction de réponse doit être ajustée, c'est-à-dire que ses paramètres doivent être évalués de telle sorte que l'erreur résiduelle ε soit minimisée.

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non).

Le tableau 9 illustre ces deux fonctions de réponse.

Tableau X : Exemples de fonction de réponses [83].

Type	Équation	Paramètres	Linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	Pente β	Oui
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	Ordonnée à l'origine α Pente β	Oui

6.2. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries, 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 les fonctions de réponse obtenues avec les standards d'étalonnage. Ainsi l'alignement des répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit :

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

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse.

Tableau XI : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses[83].

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

6.3. Prédiction inverses

Pour les méthodes indirectes, les modèles d'étalonnage servent à déduire les concentrations calculées, à partir des données du plan de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant :

$$x_{calc} = f^{-1}(y)$$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y par les y_{calc} (la valeur de y alignée sur la moyenne des x).

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse. Le tableau 11 fournit ces équations selon la fonction de réponse choisie au tableau 10.

Tableau XII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse.

Type	Équation
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	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{\hat{\beta}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\Psi}_i}} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

6.4. Calcul de la justesse et de la fidélité

6.4.1. Modèle

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. 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 $k^{\text{ième}}$ concentration calculée du niveau j de la $i^{\text{ème}}$ 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 $i^{\text{ème}}$ série et la moyenne μ_j ; α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{B,j}$.
- ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{r,j}$

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances $\sigma^2_{B,j}$ et $\sigma^2_{r,j}$ 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 , $\sigma^2_{B,j}$ et $\sigma^2_{r,j}$ du modèle.

Calculer la moyenne générale d'un niveau :

$$\hat{\mu}_j = \bar{x}_{j,calc} = \frac{1}{I \times K} \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^K x_{ik,calc}$$

Calculer les écarts-types de répétabilité, inter-séries et de fidélité intermédiaire en effectuant l'analyse de la variance d'un modèle à effet aléatoire, selon les principes décrits de la norme ISO 5725, à savoir une décomposition de la somme des carrés des écarts totaux en deux sommes des carrés d'écarts (l'indice j de niveau n'est pas noté pour cause de simplification) :

$$\underbrace{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^I (x_{ik,calc} - \bar{x}_{i,calc})^2}_{SCE_t} = \underbrace{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^I (x_{ik,calc} - \bar{x}_{k,calc})^2}_{SCE_r} + \underbrace{\sum_{k=1}^K I \times (\bar{x}_{k,calc} - \bar{x}_{i,calc})^2}_{SCE_B}$$

Cette équation est traditionnellement écrite sous une forme abrégée, faisant appel à trois sommes de carrés d'écarts (SCE).

$$SCE_t = SCE_B + SCE_r$$

Où chacune des sommes est définie comme suit pour faciliter l'interprétation :

- SCE_t : Somme totale des écarts à la moyenne générale du niveau
- SCE_B : Somme des écarts inter-séries (due à la variance du biais)
- SCE_r : Somme des écarts intra-série (due à la variance résiduelle)

Comme le propose la norme ISO 5725, il n'est pas nécessaire de développer les trois sommes de carrés pour effectuer les calculs ; le calcul de SCE_B se fait par différence. Cette méthode peut poser des problèmes si le résultat est négatif : forcer alors la valeur de SCE_B .

$$SCE_B = SCE_t - SCE_r \text{ si } SCE_B > 0$$

$$SCE_B = 0 \text{ si } SCE_B \leq 0$$

Calculer la variance de répétabilité du niveau, Variance intra-série notée $\hat{\sigma}_r^2$ à partir des répétitions $x_{ijk,calc}$:

$$\hat{\sigma}_r^2 = \frac{SCE_r}{I(K-1)}$$

Calculer la variance inter-séries notée $\hat{\sigma}_B^2$, comme suit :

$$\hat{\sigma}_B^2 = \frac{\frac{SCE_B}{I-1} - \hat{\sigma}_r^2}{K}$$

6.4.2. 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. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit :

$$Biais_j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j$$

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

$$recouvrement(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

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

$\hat{\mu}_j$: Moyenne des concentrations prédites

6.4.3. 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.

L'écart-type de répétabilité : $\hat{\sigma}_r$

L'écart-type de fidélité intermédiaire du niveau : $\hat{\sigma}_{FI} = \sqrt{\hat{\sigma}_r^2 + \hat{\sigma}_B^2}$

6.5. 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 :

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

Pour chaque modèle et chaque observation l'exactitude de la mesure en valeur relative est donnée comme suit :

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

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.

6.5.1. Calcul de l'intervalle de tolérance

Ce qui nous importe en validation, c'est une 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 , $\hat{\sigma}_{B,j}$ et $\hat{\sigma}_{r,j}$ à chaque niveau de concentration j a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observations dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$, c'est-à-dire :

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

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation et pour chaque modèle mathématique.

Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue :

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

Où :

$$\hat{\sigma}_{FI,j}^2 = \hat{\sigma}_{r,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$$

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

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

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+1/K)^2}{I-1} + \frac{1-1/K}{I \times K}}$$

$Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$: Quantile de la distribution t de Student pour v degrés de liberté et β la probabilité.

Le même intervalle en échelle relative devient :

$$\left[\text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,J}; \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,J} \right]$$

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 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 inclus dans les limites $[-\gamma, \gamma]$ définies a priori en fonction des objectifs de la méthode.

6.4.2. Profil d'exactitude

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

$$L_j(\text{borne superieure}) = \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,J}$$

$$U_j(\text{borne inferieure}) = \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1 + \beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,J}$$

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 ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$)[85].

6.6. Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vus que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues, sachant que le coefficient de détermination R^2 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[85].

6.7. Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de mesures attendues, permet donc de décider des niveaux de concentration pour lesquels une 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[85].

6.8. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à l'intérieur de l'intervalle de dosage à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration ou quantité en substance présente dans l'échantillon.

En règle générale, la linéarité d'une procédure est établie en appliquant la méthode testée sur des séries d'échantillons préparées à partir d'une solution mère.

Il est recommandé donc d'utiliser au minimum 5 niveaux différents de concentration et d'effectuer au minimum 3 séries indépendantes de chacune des 5 concentrations (sur le PA seul et sur la forme pharmaceutique reconstituée), à raison d'une série par jour.

Pour évaluer la linéarité, il convient d'établir un graphique de réponses obtenues en fonction de la concentration, et de procéder à un examen visuel de ce graphique. Si la relation est linéaire, il faudrait alors analyser les résultats par des méthodes statistiques appropriées.

Dans un deuxième temps la linéarité de la relation entre les concentrations retrouvés (x_{calc}) et les concentrations introduites (x) est évaluée en représentant graphiquement la fonction $[x_{\text{calc}}=f(x)]$ pour les 3 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 une vérification de l'ajustement est effectuée.

6.9. Outils de calculs pour la validation

Les calculs statistiques engagent divers outils opérationnels pour donner différents significatifs des résultats pratiques, à savoir [8;6]:

- ✓ Les logiciels statistiques commerciaux (SAS, Statgraphics, Systat...) ou en accès libre (ex : R) : faire les analyses et les graphiques basiques (Boxplot, comparaison de moyenne (test de Student, Anova...), comparaison de variances (test de Fisher, Bartlett, Levène, Cochran, Grubbs, Dixon ...), les calculs d'intervalle de confiance...
- ✓ Les logiciels intégrés dédiés à la validation.
- ✓ Des feuilles de calcul du logiciel Microsoft Excel. Ces feuilles ont été développées pour le calcul du profil d'exactitude ou pour le calcul de LOD pour les méthodes qualitatives

Le zinc est un métal de transition de numéro atomique 30 et de masse atomique 65,38. C'est l'élément le plus abondant après le fer. C'est un oligo-élément essentiel qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides.

Le présent travail consiste à mettre au point et à valider une méthode de dosage du zinc dans le plasma, par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique/ flamme (SAA).

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de toxicologie du Département de Pharmacie de Tizi-Ouzou, selon les directives de la commission de la société française des sciences techniques et pharmaceutiques (SFSTP) décrivant un protocole de validation harmonisé, publié dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006.

Matériel et méthode

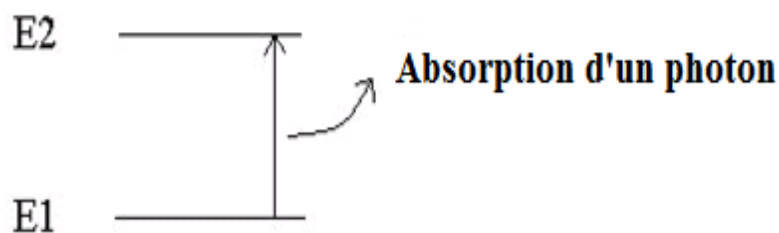
1.1. Appareillage

➤ Spectrophotométrie d'absorption atomique



Figure 12 : Spectrophotomètre d'absorption atomique SHIMADZU AA-6200.

La spectrométrie d'absorption atomique est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie de l'atome. Celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre : $\Delta E = h\nu$ où h est la constante de Planck et ν est la fréquence du photon absorbé. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés.



Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants, et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément absorbant selon la loi de distribution de Boltzmann, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments à doser.

L'analyse par absorption atomique utilise la loi de Beer- Lambert. S'il y a plusieurs éléments à doser, on réalise cette manipulation pour chaque élément de l'échantillon en se plaçant à une longueur d'onde fixée. Il faut donc à chaque manipulation choisir une source adaptée pour éclairer l'élément que l'on cherche à exciter.

Le spectrophotomètre d'absorption atomique du laboratoire est de type SHIMADZU AA-6200, équipé de:

- ✓ une lampe cathodique de zinc de type HOLLOW cathode Lamp Zn0801A ;
- ✓ un compresseur de type JUN-AIR RoHS 0038 ;
- ✓ une bouteille de gaz acétylène PHYWE SYSTEME GMBH & Co. KG ;
- ✓ un ordinateur HP L1908w ;
- ✓ un logiciel d'exploitation type WIZAAR.

- **Purificateur** Human Power 1 Scholar qui sert à la purification de l'eau.
- **Séchoir** pour sécher la verrerie.
- **Réfrigérateur** marque Condor pour réserver le PFC et la solution du zinc.

2. Matériels

- **Matière première**
 - Solution stock de zinc $20 \cdot 10^3$ ppm.
 - Eau pure.
 - Pool de Plasma Frais Congelé (PFC) contrôlé, récupéré au niveau de l'unité CTS du CHU Neddir Mohammed Tizi-Ouzou.

➤ **Verreries**

- Fioles de $50 \pm 0,06$ ml ;
- Béchers de différents volumes ;
- Tubes secs 5ml ;
- Pipettes en verres graduée 5ml;
- Erlen Meyer ;
- Entonnoir.

➤ **Consommables**

- Embouts ;
- Gants ;
- Compresses.

➤ **Autres**

- Micropipette 100-1000 μ l (DRAGON LaB ISO 9001/13485 CERTIFICATED) ;
- Poires ;
- Pissettes ;
- Portoirs ;
- Bouchons ;

3. Méthode

3.1. Méthodologie de validation

Le présent travail est basé sur les recommandations de la commission SFSTP publiées en 2003 complétées en 2006 qui propose de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision. Ces dernières reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (biais + écart type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

3.2. Choix des paramètres de validation

❖ **Choix du protocole de validation**

Afin de valider la technique de dosage plasmatique du zinc par SAA nous avons suivi le logigramme de la SFSTP (figure 11) permettant de sélectionner le protocole de validation et vu:

- La connaissance préalable de la procédure de dosage;

- La connaissance préalable de la présence d'un effet matrice ;

Nous avons opté pour le protocole V5 modifié (avec cinq niveaux de concentrations) proposé par la SFSTP 2006.

ce protocole recommande trois jours de validation (3 séries), chaque série comporte:

- ✓ Une gamme standard d'étalonnage (SE) avec matrice, 5 niveaux de concentrations, avec deux répétitions.
- ✓ Une gamme standard de validation (SV) avec matrice, 5 niveaux de concentrations, avec trois répétitions.

On obtient ainsi un nombre d'essais égale à:

- ✓ Standards d'étalonnage avec matrice: $3(\text{séries}) \times 2(\text{répétitions}) \times 5(\text{niveaux}) = 30$ essais.
- ✓ Standards de validation avec matrice : $3(\text{séries}) \times 3(\text{répétitions}) \times 5(\text{niveaux}) = 45$ essais.

Le standard d'étalonnage et de validation avec matrice est réalisé avec un pool de PFC (mélange de la totalité du plasma disponible).

Pour chaque série des blancs plasmas sont préparés et cette quantité a été soustraite par l'option tare donnée par l'automate.

❖ Choix des niveaux de concentration

Le choix des niveaux de concentrations du zinc est fait de sorte que la gamme des concentrations puisse couvrir les valeurs physiologique et pathologiques du zinc dans le plasma.

Les valeurs physiologiques du zinc: 0,80-1,20 mg/l.

Tableau XIII : Niveaux de concentrations choisis.

Niveau de concentration en %	60	80	100	120	140
Niveau de concentration en mg/l	0.6	0.8	1	1.2	1.4

❖ Choix des limites d'acceptabilité

Pour le dosage en milieux biologique, et à partir des recommandations données par la SFSTP, la limite d'acceptabilité λ est fixée à 20%.

3.3. Mode opératoire:

Il comporte plusieurs étapes résumées comme suit:

3.3.1. Préparation des solutions mères à 100mg/l

- Dans une fiole de 50ml introduire 30ml d'eau pure;
- Prélever 0,25 ml (250 μ l) de la solution stocke de 20x10³ mg/l du zinc;
- Introduire le volume prélevé dans la fiole de 50ml;
- Compléter avec de l'eau pure jusqu'au trait de jauge.

Chaque jour, deux solutions mères de zinc sont préparées, une pour le standard d'étalonnage et une autre pour le standard de validation.

3.3.2. Préparation de la gamme de solutions filles

- Introduire 30ml du plasma dans une fiole de 50ml;
- Prélever de la solution mère le volume correspondant à chaque concentration (tableau 13);
- Introduire le volume prélevé dans la fiole de 50ml;
- Compléter avec du plasma jusqu'au trait de jauge.

Tableau XIV : Volume correspondant pour chaque niveau de concentration.

Concentrations (mg/l)	Blanc	0,6	0,7	1	1,2	1,3
Solution mère de zinc à 100mg/l (μ l)	0	300	400	500	600	700

Chaque jour, deux gammes de solution fille sont préparées, une pour le standard d'étalonnage et l'autre pour le standard de validation.

3.3.3. Préparation des solutions à analysées :

Pour chaque solution fille préparée, une dilution au 1/3 est effectué avec de l'eau pure;

- Pour chaque concentration, introduire, dans un tube, 1ml de la solution de la gamme d'étalonnage correspondante;
- Pour le blanc, introduire 1ml du pool PFC;

- Ajouter 2ml d'eau pure pour chaque tube.

Chaque jour, pendant 03 jours, 05 répétitions sont préparées à raison de 02 répétitions pour le standard d'étalonnage et 03 répétitions pour le standard de validation.

3.3.4. Analyse des solutions :

Chaque jour, pendant 03 jours, les dilutions de chacune des gammes standards et de validations sont analysées par SAA/flammé.

3.4. Développement d'une feuille de calcul adaptée à la validation des méthodes d'analyse selon le Protocole proposé par SFSTP 2006:

Les résultats obtenus sont recueillis et introduits dans le logiciel Excel de Microsoft office 2016 enregistré, installé sur le système d'exploitation Windows 10 authentique.

L'ensemble des équations rentrant dans l'étude statistique de la validation et la construction du profil d'exactitude sont introduites dans un tableur, permettant d'avoir des résultats complets en tableaux et en graphes.

Résultats

1. Spécificité et effet matrice

1.1. Spécificité de la SAA :

La SAA possède une spécificité spectrale par rapport aux raies de résonance pour chaque élément à doser. L'absorption de chaque élément est spécifique, aucun autre élément n'absorbe à sa longueur d'onde.

1.2. Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique

Le tableau suivant résume les résultats obtenus sur la gamme de standard d'étalonnage:

Tableau XV: Résultats de la gamme de standard d'étalonnage

Niveaux de concentration (%)	Concentration	Absorbance
60	0.6	0.0104
	0.6	0.0117
80	0.8	0.0187
	0.8	0.0187
100	1	0.0219
	1	0.0224
120	1.2	0,0241
	1.2	0,0237
140	1.4	0,0286
	1.4	0,0293
Pente	0.02050	
Ordonnée à l'origine	0.00	

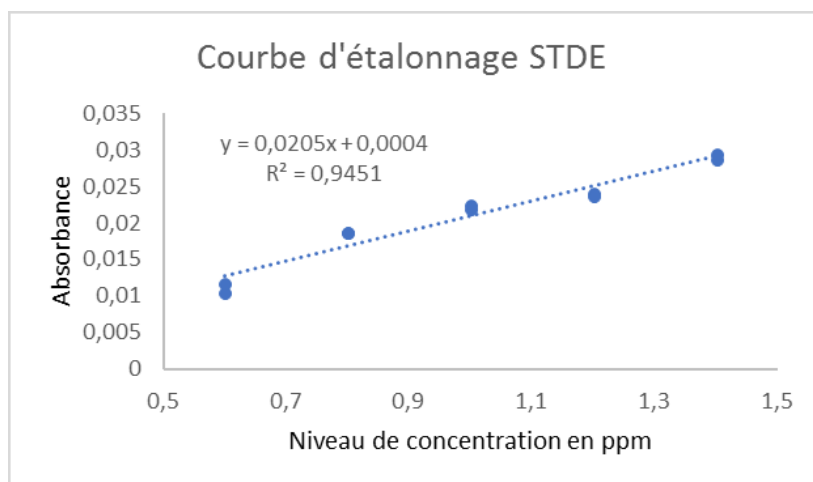


Figure 13: Courbe de standard d'étalonnage.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus sur la gamme de standard de validation

Tableau XVI: Résultat de la gamme de standard de validation

Niveaux de concentration (%)	Concentration	Variable
60	0.6	0,0126
	0.6	0,0132
	0.6	0,0119
80	0.8	0,0166
	0.8	0,0158
	0.8	0,0173
100	1	0,0197
	1	0,0193
	1	0,0202
120	1.2	0,024
	1.2	0,0239
	1.2	0,0246
140	1.4	0,0288
	1.4	0,0292
	1.4	0,0295

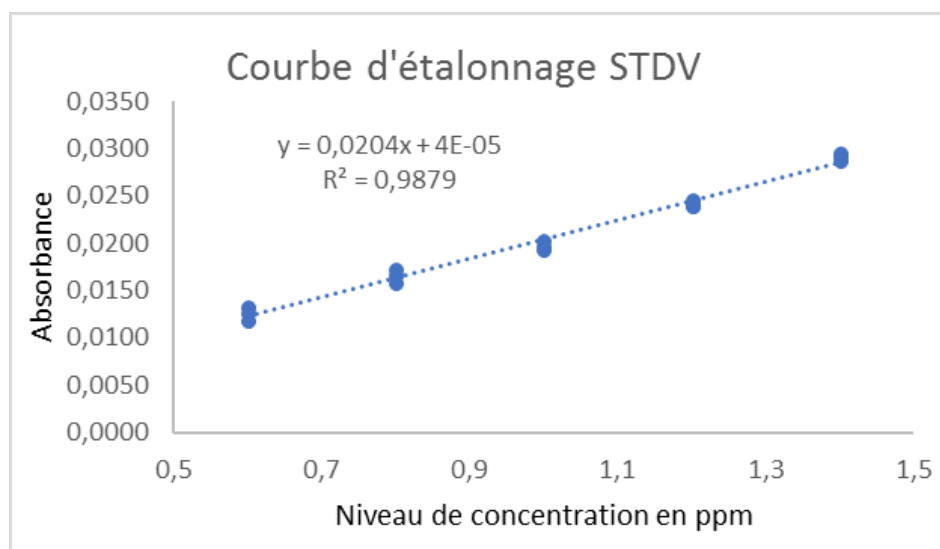


Figure 14: Courbe de standard de validation.

- **Présentation des paramètres de régression obtenue sur les deux standards d'étalonnage et de validation**

a. Représentation graphique

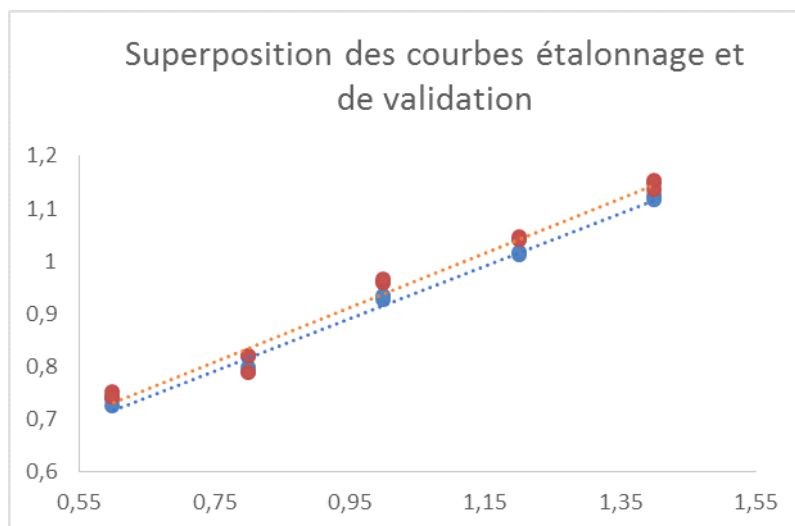


Figure 15: Superposition des courbes étalonnages et de validation.

b. Représentation des paramètres de régression :

Les paramètres de régression obtenues sur la gamme de standard d'étalonnage et celle de validation sont présentés et évalués dans les tableaux suivants :

TableauXVII: Données de droite de standard d'étalonnage.

		Écart-type	Variance
Pente	0.0397466	0.0014200	0.0000020
Ordonné à l'origine	-0.07783360	0.0359024	0.0012890

Tableau XVIII: Données de la droite de standard de validation.

		Écart-type	Variance
Pente	0.0412089	0.0014478	0.0000021
Ordonnées à l'origine	-0.0915423	0.0366041	0.0013399

➤ Recherche d'un éventuel effet matrice

Tableau XIX: Résultat de comparaison des pentes par le teste de STUDENT

ddl	21	Vrai t calculé < t°
β	0.95	
α	0.05	
t0 =	2.07961384	
tc =	0.72110843	
tc< t0: absence d'effet matrice		

La confirmation par un test d'hypothèse paramétrique la comparabilité des deux pentes des deux standards, d'étalonnage et de validation confirme le choix de protocole de validation.

➤ Recherche des Erreurs systématiques

Tableau XX: Résultat de test de STUDENT pour l'erreur systématique

ddl	21	Vrai t calculé < t°
β	0.95	
α	0.05	
t0 =	2.07961384	
tc =	0.26732363	
tc< t0: absence d'erreurs systématiques		

Les résultats de tableau de comparaison confirment l'absence d'erreurs systématique et d'un effet additif.

2. Fonctions de réponse

La relation existante entre l'absorbance (réponse instrumentale) et la concentration introduit dans les standards d'étalonnage, obtenue sur chacune des trois séries, est représentée par trois modèles mathématiques comme suit:

- Profil d'exactitude obtenu avec le modèle régression linéaire simple

Tableau XXI : Standard d'étalonnage ($y = ax + b$)

Niveaux de concentrations %	Série 1 (J1)		Série 2 (J2)		Série 3 (J3)	
	Variable	réponse	Variable	réponse	Variable	Réponse
60	0,6	0,737	0,6	0,7806	0,6	0,765
	0,6	0,724	0,6	0,7658	0,6	0,7857
80	0,8	0,796	0,8	0,8831	0,8	0,887
	0,8	0,789	0,8	0,8672	0,8	0,8928
100	1	0,927	1	0,9497	1	0,9714
	1	0,933	1	0,9482	1	0,9722
120	1,2	1,012	1,2	1,0599	1,2	1,079
	1,2	1,015	1,2	1,0616	1,2	1,0727
140	1,4	1,116	1,4	1,171	1,4	1,1516
	1,4	1,116	1,4	1,1416	1,4	1,1564
Pente	0.50		0.48		0.47	
Ordonnée à l'origine	0.42		0.49		0.50	

Tableau XXII : Standard de validation ($y = ax + b$)

Niveaux de concentrations	Série 1(J1)		Série 2 (J2)		Série 3 (J3)	
	Variable	Réponse	Variable	Réponse	Variable	Réponse
60	0,6	0,723	0,6	0,726	0,6	0,711
	0,6	0,719	0,6	0,732	0,6	0,711
	0,6	0,731	0,6	0,719	0,6	0,713
80	0,8	0,741	0,8	0,866	0,8	0,872
	0,8	0,773	0,8	0,858	0,8	0,865
	0,8	0,776	0,8	0,873	0,8	0,871
100	1	0,919	1	0,957	1	0,962
	1	0,902	1	0,963	1	0,964
	1	0,898	1	0,962	1	0,971
120	1,2	1,025	1,2	1,024	1,2	1,024
	1,2	1,024	1,2	1,023	1,2	1,023
	1,2	1,023	1,2	1,024	1,2	1,024
140	1,4	1,126	1,4	1,128	1,4	1,1298
	1,4	1,129	1,4	1,129	1,4	1,129
	1,4	1,127	1,4	1,129	1,4	1,129

- Profil d'exactitude obtenu avec le modèle régression linéaire passant par zéro

Tableau XXIII: Standard d'étalonnage ($y = ax$)

Niveaux de concentrations	Série 1(J1)		Série 2 (J2)		Série 3 (J3)	
	Variable	Réponse	Variable	Réponse	Variable	Réponse
60	0,6	0,0093	0,6	0,0104	0,6	0,0089
	0,6	0,0089	0,6	0,0117	0,6	0,0108
80	0,8	0,0135	0,8	0,0187	0,8	0,0113
	0,8	0,0143	0,8	0,0187	0,8	0,0114
100	1	0,0197	1	0,0219	1	0,0184
	1	0,0168	1	0,0224	1	0,0184
120	1,2	0,0243	1,2	0,0241	1,2	0,0227
	1,2	0,0227	1,2	0,0237	1,2	0,0209
140	1,4	0,0266	1,4	0,0286	1,4	0,0233
	1,4	0,0274	1,4	0,0293	1,4	0,0242
Pente	0,01870		0,02090		0,01720	
Ordonnée à l'origine	0,00		0,00		0,00	

Tableau XXIV : Standard de validation ($y = ax$)

Niveaux de concentrations	Série 1(J1)		Série 2 (J2)		Série 3 (J3)	
	Variable	Réponse	Variable	Réponse	Variable	Réponse
60	0,6	0,0123	0,6	0,0126	0,6	0,0111
	0,6	0,0119	0,6	0,0132	0,6	0,0111
	0,6	0,0131	0,6	0,0119	0,6	0,0113
80	0,8	0,0141	0,8	0,0166	0,8	0,0172
	0,8	0,0173	0,8	0,0158	0,8	0,0165
	0,8	0,0176	0,8	0,0173	0,8	0,0171
100	1	0,019	1	0,0197	1	0,0192
	1	0,02	1	0,0193	1	0,0184
	1	0,0198	1	0,0202	1	0,0201
120	1,2	0,024	1,2	0,024	1,2	0,0246
	1,2	0,0246	1,2	0,0239	1,2	0,0231
	1,2	0,0236	1,2	0,0246	1,2	0,0246
140	1,4	0,0264	1,4	0,0288	1,4	0,0298
	1,4	0,0295	1,4	0,0292	1,4	0,029
	1,4	0,0272	1,4	0,0295	1,4	0,0295

- Profil d'exactitude obtenu avec la fonction racine carré $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Tableau XXV: Standard d'étalonnage ($\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$)

Niveaux de concentrations %	Série 1 (J1)		Série 2 (J2)		Série 3 (J3)	
	Variable	Réponse	Variable	Réponse	Variable	Réponse
60	0,77	0,10	0,77	0,10	0,77	0,09
	0,77	0,09	0,77	0,11	0,77	0,10
80	0,89	0,12	0,89	0,14	0,89	0,11
	0,89	0,12	0,89	0,14	0,89	0,11
100	1,00	0,14	1,00	0,15	1,00	0,14
	1,00	0,13	1,00	0,15	1,00	0,14
120	1,10	0,16	1,10	0,16	1,10	0,15
	1,10	0,15	1,10	0,15	1,10	0,14
140	1,18	0,16	1,18	0,17	1,18	0,15
	1,18	0,17	1,18	0,17	1,18	0,16
Pente	0,17		0,15		0,15	
Ordonnée à l'origine	-0,04		0,00		-0,02	

Tableau XXVI : Standard de validation $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Niveaux de concentrations %	Série 1 (J1)		Série 2 (J2)		Série 3 (J3)	
	Variable	Réponse	Variable	Réponse	Variable	Réponse
60	0,77	0,11	0,77	0,11	0,77	0,11
	0,77	0,11	0,77	0,11	0,77	0,11
	0,77	0,11	0,77	0,11	0,77	0,11
80	0,89	0,12	0,89	0,13	0,89	0,13
	0,89	0,13	0,89	0,13	0,89	0,13
	0,89	0,13	0,89	0,13	0,89	0,13
100	1,00	0,14	1,00	0,14	1,00	0,14
	1,00	0,14	1,00	0,14	1,00	0,14
	1,00	0,14	1,00	0,14	1,00	0,14
120	1,10	1,15	1,10	1,15	1,10	0,16
	1,10	1,16	1,10	1,15	1,10	0,15
	1,10	0,15	1,10	0,16	1,10	0,16
140	1,18	0,16	1,18	0,17	1,18	0,17
	1,18	0,17	1,18	0,17	1,18	0,17
	1,18	0,16	1,18	0,17	1,18	0,17

Les différents modèles de régression testés dans notre travail aboutissent aux profils d'exactitudes élucidés dans le tableau 26 qui couvre tous les intervalles de dosage et la fonction la plus simple.

Tableau XXVII: Critères de choix de la fonction de réponse

Modèle de fonction de réponse	Profil d'exactitude	Intervalle de dosage ppm
$y=ax+b$		[0.6 - 1.4]
$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$		[0,6-1.4]
$y=ax$		[0.6-1.4]

Les résultats qui seront désormais élucidés sont basés sur le modèle mathématique choisi, en l'occurrence la fonction de réponse : $y=ax$.

3. Alignement des observations

L'alignement appliqué aux réponses obtenues avec les trois séries des standards de validation, sur la moyenne des concentrations introduites pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans le tableau 27 :

Tableau XXVIII: Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation

Niveaux de concentrations %	Série 1 (J1)		Série 2 (J2)		Série 3 (J3)	
	Réponse instrumentale	Réponse aligné	Réponse instrumentale	Réponse aligné	Réponse instrumentale	Réponse aligné
60	0,0123	0,012	0,0126	0,013	0,0111	0,011
	0,0119	0,012	0,0132	0,013	0,0111	0,011
	0,0131	0,013	0,0119	0,012	0,0113	0,011
80	0,0141	0,014	0,0166	0,017	0,0172	0,017
	0,0173	0,017	0,0158	0,016	0,0165	0,017
	0,0176	0,018	0,0173	0,017	0,0171	0,017
100	0,019	0,019	0,0197	0,020	0,0192	0,019
	0,02	0,020	0,0193	0,019	0,0184	0,018
	0,0198	0,020	0,0202	0,020	0,0201	0,020
120	1,024	0,024	1,024	0,024	0,0246	0,025
	1,00246	0,025	1,0239	0,024	0,0231	0,023
	0,0236	0,024	0,0246	0,025	0,0246	0,025
140	0,0264	0,026	0,0288	0,029	0,0298	0,030
	0,0295	0,030	0,0292	0,029	0,029	0,029
	0,0272	0,027	0,0295	0,030	0,0295	0,030

4. Prédiction inverses

Le calcul des concentrations prédites dites en retour est présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau XXIX : Prédications inverses obtenus à partir des standards de validations

Niveaux de concentrations %	Série 1 (J1)		Série 2 (J2)		Série 3 (J3)		Moyens/séries
	Réponse aligné	prédictions inverses	Réponse aligné	prédictions inverses	Réponse aligné	prédictions inverses	
60	0,012	0,66	0,013	0,60	0,011	0,60	0,64
	0,012	0,64	0,013	0,63	0,011	0,63	
	0,013	0,70	0,012	0,57	0,011	0,57	
80	0,014	0,75	0,017	0,79	0,017	0,79	0,88
	0,017	0,93	0,016	0,76	0,017	0,76	
	0,018	0,94	0,017	0,83	0,017	0,83	
100	0,019	1,02	0,020	0,94	0,019	0,94	1,04
	0,020	1,07	0,019	0,92	0,018	0,92	
	0,020	1,06	0,020	0,97	0,020	0,97	
120	0,024	1,28	0,024	1,15	0,025	1,15	1,28
	0,025	1,32	0,024	1,14	0,023	1,14	
	0,024	1,26	0,025	1,18	0,025	1,18	
140	0,026	1,41	0,029	1,38	0,030	1,38	1,53
	0,030	1,58	0,029	1,40	0,029	1,40	
	0,027	1,45	0,030	1,41	0,030	1,41	

5. Justesse :

La justesse est exprimée en biais absolu, biais relatif en sus du taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration théorique des standards de validation comme indiqué dans le tableau 29 :

Tableau XXX : Calcul de la justesse pour chaque niveau de concentration des standards de validation

Niveaux de concentrations %	60	80	100	120	140
Concentrations moyennes théorique (ppm)	0,64	0,88	1,04	1,28	1,53
Concentrations moyennes introduites (ppm)	0,6	0,8	1	1,2	1,4
Biais absolu	0,04	0,08	0,04	0,08	0,13
Biais relatifs (%)	6,410	10,442	3,684	6,790	9,239
Taux de Recouvrement (%)	110,81	109,18	104,81	107,25	105,81

6. Fidélité :

La fidélité en ses deux conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire est exprimée en écarts types relativisés en coefficients de variation suite à l'étude de la variance du modèle choisi qui a donné les résultats suivants dans le tableau ci-dessous :

Tableau XXXI : Calcul de fidélité pour chaque niveau de concentrations des standards de validation

Niveaux de concentrations %	60	80	100	120	140
Concentrations moyennes (ppm)	0,6	0,8	1	1,2	1,4
SCE résiduelle	0,00	0,03	0,02	0,05	0,08
SCE totale	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SCE inter-séries	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02
Ecart type de répétabilité	0,03	0,06	0,04	0,03	0,05
Ecart type inter séries	0,02	0,05	0,05	0,05	0,09
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,03	0,08	0,06	0,08	0,11
CV de répétabilité	4,39	8,08	3,52	2,88	3,74
CV de fidélité intermédiaire	5,23	10,31	6,05	6,49	7,60

7. Erreur totale

Le tableau ci-dessous représente le calcul de l'erreur totale absolue pour chaque niveau de concentration théorique :

Tableau XXXII : Calcul de l'erreur totale absolu pour chaque niveau de concentration des standards de validations.

Niveaux de concentrations %	60	80	100	120	140
Biais absolu	0,04	0,08	0,04	0,08	0,13
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,03	0,08	0,06	0,08	0,11
Erreur total absolu	0,07	0,17	0,10	0,16	0,24

Le tableau ci-dessous représente le calcul de l'erreur totale relative pour chaque niveau de concentration théorique :

Tableau XXXIII : Calcul de l'erreur totale relative pour chaque niveau de concentration des standards de validations

Niveaux de concentrations %	60	80	100	120	140
Biais relatifs (%)	6,410	10,442	3,684	6,790	9,239
CV de fidélité intermédiaire	5,23	10,31	6,05	6,49	7,60
Erreur total relative	11,636	20,754	9,730	13,281	16,841
Erreur total maximal	16,76	25,00	16,86	19,19	23,75

8. Intervalle de tolérance

Le calcul des limites de l'intervalle de tolérance pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XXXIV : Calcul des limites de l'intervalle de tolérances pour chaque niveau de concentration

Niveaux de concentrations %	60	80	100	120	140
Limites de tolérance inférieure	1,78	3,75	-2,05	0,29	2,42
Limites de tolérance supérieure	11,04	17,13	9,42	13,29	16,06

La limite de tolérance à la différence de la limite d'acceptabilité représente la limite calculée à partir de la série statistique en prenant en compte un facteur de correction k calculé à un risque α et l'erreur apportée par la série statistique.

9. Profil d'exactitude

La figure ci-dessous dans laquelle l'axe horizontal représente les concentrations théoriques allant de 0,6 à 1,4 ppm et l'axe vertical le biais relatif, représente le profil d'exactitude :

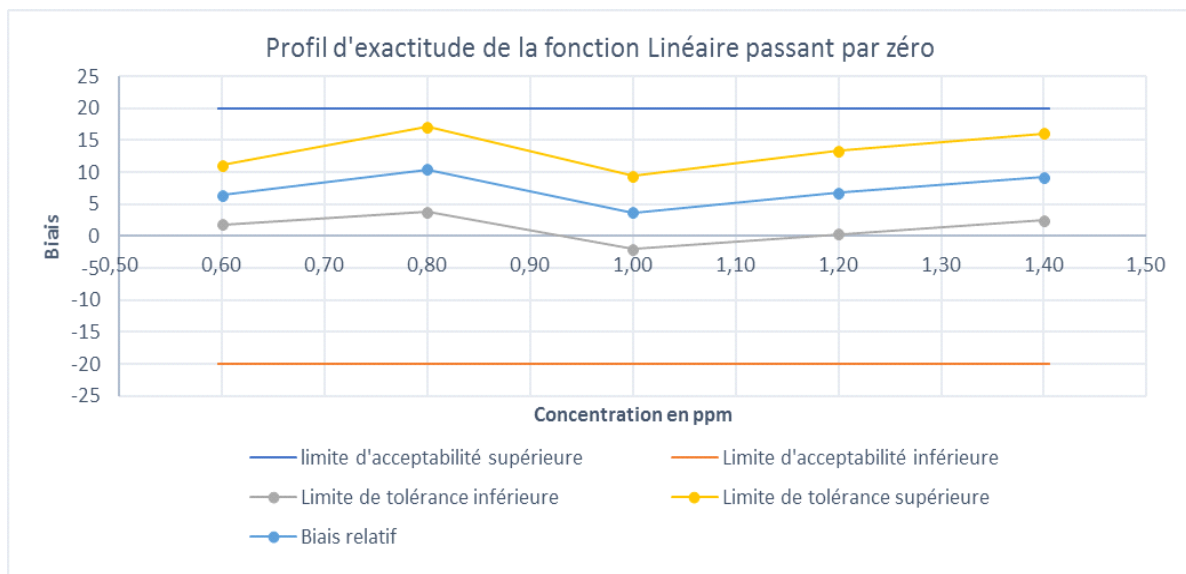


Figure 16: profil d'exactitude

10. Linéarité de justesse:

Le calcul des différents paramètres de la linéarité, nécessaires pour sa vérification est élucidé dans le tableau suivant :

Tableau XXXV: vérification de la linéarité de la méthode

Niveaux de concentrations %	Concentration introduite	Concentration prédite
60	0,6	0,64
	0,6	0,64
	0,6	0,64
80	0,8	0,85
	0,8	0,88
	0,8	0,92
100	1	1,02
	1	1,02
	1	1,06
120	1,2	1,29
	1,2	1,27
	1,2	1,29
140	1,4	1,51
	1,4	1,55
	1,4	1,53

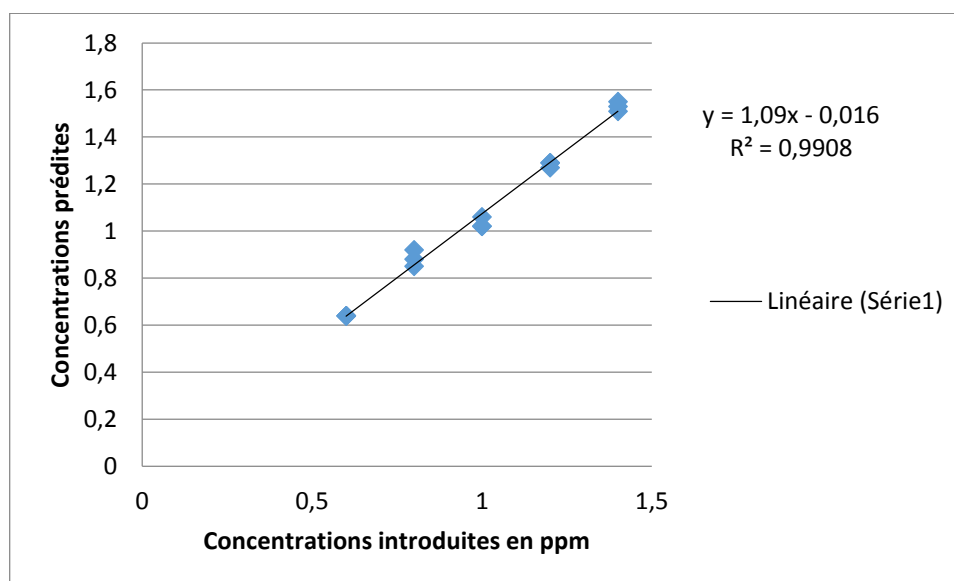


Figure 17: Droite de régression linéaire entre les concentrations prédites et les concentrations introduites en ppm.

Tableau XXXVI : Données de la droite du standard de validation

		Ecart-type	Variance
Pente	1,09	0,03	0,00083
Ordonnées à l'origine	-0,02	0,03	0.00090

Tableau XXXVII: Comparaison de la pente à 1 avec le test de STUDENT.

Ddl	13	Vrai t calculé < t°
β	0,99	
α	0,001	
t0	4,22083173	
tc	3,11049564	
Si vrai: différence non significatif (pente comparable à 1)		

Tableau XXXVIII: Comparaison de l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de STUDENT.

Ddl	13	Vrai t calculé < t°
β	0,95	
α	0,05	
t0	2,16036866	
tc	0,53061828	
Si vrai: différence non significatif (l'ordonnée à l'origine est comparable avec 0)		

Discussions

1. Spécificité et effet matrice :

1.1. Spécificité de la SAA :

La spécificité peut être inhérente à la technique [83]: la SAA possède une spécificité spectrale par rapport aux raies de résonance pour chaque élément à doser. L'absorption de chaque élément est spécifique, aucun autre élément n'absorbe à sa longueur d'onde.

S'il y a plusieurs éléments à doser, on doit utiliser une lampe à cathode creuse correspondant à une longueur d'onde fixée. Il faut donc à chaque manipulation choisir une source adaptée pour éclairer l'élément que l'on cherche à exciter.

Il semble alors claire que pour le dosage du zinc, l'absorption de cet élément lui est spécifique à une longueur d'onde de 213,9 nm.

1.2. Effet matrice et erreur systématique

La comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine nous renseigne sur l'absence ou la présence d'un éventuelle effet matrice et d'erreur systématique.

Il semble alors évident que pour cette technique, il y'aurai absence d'effet matrice et d'erreur systématique.

Tableau XXXIX : Effet matrice et erreurs systématiques

Test	Résultats	Signification
Les pontes sont-elles comparables ?	Oui	Pas d'effet matrice
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables ?	Oui	Pas d'erreurs systématiques

2. Fonction de réponse :

Le non traitement de la fonction Ln est justifié par la non signification du modèle mathématique obtenu après transformation logarithmique d'une concentration égale à 1 mg/l.

La fonction $y=ax$ est considérée comme étant le modèle mathématique le plus simple, le plus facile à mettre en œuvre et adaptée à l'analyse en routine.

3.Critères de performance de la fonction de réponse choisie :

3.1. Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérées comme étant la valeur de référence est assez étroit pour le niveaux 3, mais on remarque que pour le reste des niveau, la concentration moyenne prédite s'éloigne de la valeur de référence (les biais relatif variant entre 3 et 10%).

3.2.Fidélité

Le degré de dispersion des concentrations prédites obtenues à partir des trois séries de validation est large pour les 5 niveaux de concentrations, compte tenu du fait que le coefficient de variation est inférieur à 10 %.

Ces écarts de valeurs en termes de justesse et fidélité restent tout-de-même acceptables compte tenu du faite que la matrice soit d'origine biologique (Bio-analyse).

Ces estimations (fidélité et de la justesse) ne sont qu'une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, elles ne renseignent pas sur la qualité des résultats et ne permettent pas de prendre une décision sur la validité de la méthode.

4.Critères de décision sur la validité de la méthode

4.1. Erreur totale

Selon les résultats du tableau 31, tous les niveaux de concentrations de la gamme sont incluses dans l'intervalle de validité car présentant une erreur total inférieures à 20 % qui est considéré comme la limite d'acceptabilité en bio-analyse.

4.2. Profil d'exactitude

Selon le profil d'exactitude élucidé dans la figure 11, la méthode mise au point dans cette étude est valide sur l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation.

4.3. Intervalle de validité et limites de quantification

Selon les résultats, la méthode est tenue pour valide dans l'intervalle [0,6 ; 1,4 mg/l]

4.4. Linéarité

Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est acceptable ($R_2 = 0,9934$), étant donné que les deux variables ne sont pas toutes les deux indépendantes, il ne peut confirmer à lui seul la validité de la linéarité de la justesse.

La pente est statistiquement comparable à 1, et l'ordonnée à l'origine est statistiquement comparable à 0, donc on peut conclure que la linéarité de la justesse est validée pour le modèle choisi.

Conclusion

Le zinc est un élément indispensable et essentiel à l'organisme humain car impliqué dans de nombreux mécanismes physiopathologiques, en particulier comme cofacteur de nombreuses enzymes, essentiellement la SOD.

Dans l'optique d'évaluer la concentration de cet oligoélément dans le plasma humain une méthode de dosage du Zinc sanguin par spectrophotométrie d'absorption atomique/flamme est élaborée selon le protocole développé et proposé par les guides de validation SFSTP 2003-2006, qui repose sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

Les résultats obtenus prouvent que toutes les exigences spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée sont remplies, ce qui atteste la validité de la méthode mise au point dans le présent travail, ce qui implique que l'appareil décrit peut garantir la fiabilité des résultats de cette méthode de dosage et qu'elle est apte à être utilisée et appliquée en routine pour le dosage du zinc sanguin

Cette technique de dosage du Zinc dans le plasma humain constituerait alors une amorce dans l'établissement d'un profil complet du statut radialaire chez des patients à haut risque de développer certaines maladies (pathologie cardiovasculaires, cancers...) comme les tabagiques et les alcooliques ou après exposition à certains xénobiotiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Pro-oxydant prooxydant [Internet]. [cité 19 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.prooxydant.com/>
2. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. 4th edition. Oxford University Press, USA. 704p. In.
3. Djellouli F. (2013).Aspect qualitatif et quantitatif des lipoprotéines sériques chez les agriculteurs utilisant les pesticides. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en biologie.
4. Defraigne J-O, Pincemail J. Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. Rev Médicale Liège. 2008;63:10–19.
5. Garrel C, Bigard X. 7 Stress oxydatif et micronutriments antioxydants. Nutr Sport. 2017;151.
6. Foyer CH and G Noctor (2005b). « Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. » Plant Cell 17(7): 1866-1875.
7. Gamet-Payraastre Laurence (2011). Effets physiopathologiques des mélanges de pesticides. Original Research Article Cahiers de Nutrition et de Diététique. Volume 46, Issue 2 : 82-85.
8. Sanz A SR. The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. Curr Aging Sci. mars 2008;10- 21.
9. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. J Bioenerg Biomembr. 1999 Aug;31(4):347–66. In.
10. Sanz A, Stefanatos RKA. The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. Curr Aging Sci. 2008 Mar;1(1):10–21.
11. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). « Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. » Chem Biol Interact 160(1): 1-40.
12. Shiva S, Crawford JH, Ramachandran A, Ceaser EK, Hillson T, Brookes PS, et al. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. Biochem J. 2004 Apr 15;379(Pt 2):359–66. In.
13. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension Clinical implications and therapeutic possibilities. Diabetes Care. 2008 Feb 1;31(Supplement 2):S170–80. In.
14. ocl200073p258.pdf [Internet]. [cité 6 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.ocl-journal.org/articles/ocl/pdf/2000/03/ocl200073p258.pdf>
15. Anvari E, Wikström P, Walum E, Welsh N. The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. Free

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Radic Res. 2015 Nov;49(11):1308–18. 35. Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui. In.
16. Zhang M, Kho AL, Anilkumar N, Chibber R, Pagano PJ, Shah AM, et al. Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation*. 2006 Mar 7;113(9):1235–43.
 17. Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, et al. Production of Reactive Oxygen Species in the Diabetic Heart. *Circ J*. 2014;78(2):300–6.
 18. Lytvyn Y, Perkins BA, Cherney DZI. Uric Acid as a Biomarker and a Therapeutic Target in Diabetes. *Can J Diabetes*. 2015 Jun;39(3):239–46.
 19. Seidle, T., Robinson, S., Holmes, T. et al. (2010). Cross-sector review of drivers and available 3Rs approaches for acute systemic toxicity testing. *Tox. Sci*. 16, 382-396.
 20. Robineau P, Mercier T (2012). Quelle évaluation pour les produits phytopharmaceutiques Which assessment for plant protection products *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* 6 : 927–933.
 21. Garg D.P., Kiran R., Bansal A.N., Malhotra A. and Dhawan D.K. (2008). Role of vitamin E in mitigating methomyl acute toxicity in blood of male Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 31: 487-499.
 22. Grandjean D. (2005). Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. *Le Nouv. Prat.Vét*. 22: 11-15.
 23. McMichael M. (2007). Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *JAVMA*. 231: 714-720.
 24. Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydatif induit par pesticides organophosphorés. *Food and Chemical Toxicology* 52 177-180.
 25. Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique*. 108-115.
 26. Uzunhisarcikli M., Kalender Y. (2011). Protective effects of vitamins C and E against hepatotoxicity induced by methyl parathion in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
 27. TISSIER M. Contribution à l'étude du stress oxydant chez le chien de cross canin. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2011.
 28. DURAND D, DAMON M, GOBERT M. Le stress oxydant chez les animaux de rente: principes généraux. *Cah. Nutr. Diét.*, 2013, in press. .
 30. Dikalov S., Griendling K.K., Harrison D.G. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 49 : 717-727.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

31. Mandelker, L, 2008. Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Vet Clin. North Am Small Anim Pract 38, 1-30, v.
32. El-Demerdash F.M., Dewar Y., Elmazoudy R.H., Attia A.A. (2013). Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1mice. Experimental and Toxicologic Pathology. 65: 897-901.
33. Belyagoubi Nabila, (2011).Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et de Sud-ouest Algérien,Thèse présentée pour l'obtention de grade de doctor en biologie.
34. Alain Massart ,(2011). Supplémentation en oméga 3 et antioxydant et stress oxydant au cours d'un entraînement de judo.thèse présentée pour obtenir le grade de : Docteur de l'université d'Orléans.
35. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P .(2007). Le stress oxydant. Revue médicale de Liège 62 : 628-638.
36. Lu, S. C. (2013). « Glutathione synthesis. » Biochim Biophys Acta 1830(5): 3143-3153.
37. Gulcin, I. (2012). « Antioxidant activity of food constituents: an overview. » Arch Toxicol 86(3): 345-391.
38. Buettner G. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. Arch Biochem Biophys 300:535–43.
39. Suzuki K, Ito Y, Inoue T, Hamajima N. Inverse association of serum carotenoids with prevalence of metabolic syndrome among Japanese. Clin Nutr. 2011; 30(3): 369-75.
40. Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q-biosynthesis and functions. Biochem Biophys Res 2010; 396(1): 74-79.
41. Grochot-Przeczek A, Dulak J, Jozkowicz A. Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. Clin Sci (Lond) 2012; 122(3): 93-103.
42. favier 2006 - Recherche Google [Internet]. [cité 18 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.google.com/search?q=favier+2006&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b>
43. Berger MM, Roussel A-M. Complémentation ou supplémentation en oligo-éléments : qui, pourquoi, comment ? Nutr Clin Métabolisme. mai 2017;31(2):93- 102.
44. CHAPPUIS P., Les oligo-éléments en médecine et biologie, Lavoisier, Paris, 1991.
45. Canada. (2016). Qualité de l'eau - Rapports et publications. Retrieved July 2, 2017, from <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieutravail/rapports-publications/qualite-eau.html>.
46. EL-HADJELA D. Effet de la combinaison de la vitamine C et la vitamine E sur le métabolisme et la distribution du zinc chez des rats diabétiques sous un régime alimentaire pauvre en zinc [PhD Thesis]. Université Badji Mokhtar-Annaba; 2016.
47. <http://tableau-periodique.fr/element-zinc.php>.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

48. https://www.biomis.com/referentiel/liendoc/preci/ZINC.pdf&ved=2ahUKqa9vDP8QFjAAegQIBxAB&usg=AOvVaw2nLIJH-ZiZ_P3INVOZZBH-.
49. Focus sur Zinc élément chimique du tableau périodique de Mendeleïev [Internet]. 123RF Stock Photos. [cité 7 juin 2018]. Disponible sur: https://fr.123rf.com/photo_61258902_focus-sur-zinc-élément-chimique-du-tableau-périodique-de-mendeleïev.html
50. N.Bonnard,M.T. Brondeau, D. Jargot et al. Zinc et composés minéraux(I): Cahier de notes documentaires- Hygiène et sécurité du travail. N 187, 2e trimestre 2002. Fiche établie par les services techniques et médicaux de l'INRS. Fiche toxicologiques n 75. [11] Béatrice SENEMAUD.
51. Roussel AM, Hininger-Favier I. Éléments-trace essentiels en nutrition humaine: chrome, sélénium, zinc et fer. *Endocr Nutr.* 2009;10:359–10.
52. S.Khaled, JF. Brun, L. Bardet et al. Importance physiologique du zinc dans l'activité physique. *Science & Sport.* Laboratoire de physique industrielle et pharmaceutique. Service avenue du Doyen Girand. Montpellier cedex 5, France.
53. Roth, D.E., Caulfield, L.E., Ezzati, M and Black, R.E. (2008). Acute lower respiratory infections in childhood : Opportunities for reducing the global burden through nutritional interventions. *Bull World Health Organ* 86:356-64.
54. Richard CLAEYSEN. Zinc et bruulure :Etude du statut en zinc et influence de la supplémentation sur un modèle animal de bulure sévère. Diplome de doctorat: Ecole doctorale en ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement. Université de grenoble-joseph fourier.30/11/2009. P87-90,255.
55. A. PICHARD. Zinc et ses dérivés. INERIS - fiche de données toxicologique et environnementales des substances chimiques. Version 2 mars 2005.doc. p 8, 13,22,26,28.
56. Journée Techniques Viticulture Biologique. conférence 2: (cuivre: origines, usages et différentes formes), Avignon. 8 et 9 décembre 2004. P 73.
57. Roche M. protection contre la corrosion des ouvrages maritimes pétroliers. 1978;
58. Riley JP, Skirrow G. *Chemical oceanography.* academic press. 1965;
59. Reinhart FM. *Corrosion of Materials in Hydrospace.* US Naval Civil Engineering Laboratory, report R504. 1966;
60. les propriétés chimiques du cuivre [Internet]. Institut Européen du cuivre. [cité 18 juin 2018]. Disponible sur: <http://copperalliance.fr/le-cuivre/les-proprietes-du-cuivre/les-propri%C3%A9t%C3%A9s-chimiques-du-cuivre>
61. COX DW. Disorders of copper transport. *Br.Med.Bull* 1999, 55 (3): 544-555.
62. KLEWAY LM, RECK SJ, BARCOME DF. evidence of dietary copper and zinc deficiencies,*JAMA*, 1979,241: 1916-1918.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

63. GUIRAUD P, FAVIER A, HORN N. Métabolisme du cuivre. Encycl Méd Chir, Endocrinologie Nutrition, 10-359-C-10, 2003, 10 P.
64. ELKOUBI P. Le cuivre. J.Chir. 1989, 126(4): 248-57.
65. André PICOT. La destinée du cuivre dans l'organisme humain, entre bénéfice et risque. octobre 2009.
66. PICHARD A. fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, cuivre et ses dérivés. INERIS. 11 avril 2003. 66p.
67. Komroff. M., The travels of Marco Polo. Revised from Marsden's Translation. Chapter 43, édition Manuel., New York, pp 81.
68. Berzelius Jacob J. (1817), Lettre de M. Berzelius à M. Berthollet sur deux métaux nouveaux. Vol 7, pp 199-207.
69. Schwarz K., Foltz C M. (1957), Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. J. Am. Chem. Soc., pp 3292-3293.
70. Rotruck J T., Pope A L., Ganther H E., Swanson A B., Hafemen D G. Hoekstra W.G. (1973), Selenium biochemical role as component of glutathione peroxidase. Science vol 179, pp 588-590.
71. Combs A F. Combs S B. (1986), Chemical aspects of selenium. In, The role of selenium in nutrition. Academic Press., New York, Chapter 2, pp 15-40.
72. Reddy C C., Massaro E J. (1983), Biochemistry of selenium, a brief overview. Fundam App Toxicol., vol 3, pp 341-436.
73. Nait MA. Cheminement du Sélénium dans l'est Algérien. 2014;
74. Zingaro R A., Cooper C W. Selenium. édité par Van Nostrand Reinhold Company., New-York, pp 835.
75. Yansunnu Medesse L. (1984), Le sélénium : oligo- élément. Thèse de doctorat d'état : Univ Paris 11.
76. THEROND P., Le sélénium : un oligoélément essentiel pour la santé humaine. Cahier de Nutrition et Diététique, 2003, 38(4), p. 250-256.
77. Martin A. (1996), La toxicité du sélénium. Cahiers de nutrition et de diététique., vol. 31, n° 6, pp 348-353.
78. Sélénium et composés (FT 150). Pathologie - Toxicologie - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cité 19 avr 2018]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_150§ion=pathologieToxicologie#tab_toxiHomme
79. Trocello JM, Chappuis P, El Balkhi S, Poupon J, Leyendecker A, Chaîne P, Woimant F. Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte. Revue de médecine interne 31 (2010) 750-756.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

80. Roussel A.-M., Hininger-Favier I. Éléments-trace essentiels en nutrition humaine : chrome, sélénium, zinc et fer. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Endocrinologie-Nutrition, 10-359-B-10, 2009.
81. VIAL J. Définition de la validation de méthodes et outils associés. laboratoire environnement et chimie analytique de l'ESPCI. Journée de formation scientifique en spectrométrie atomique. 14 novembre 2006; Paris.
82. Pharmacie_2015_Pinguet.pdf.
83. STP PHARMA - VAL ANA - 2003 - PART I final.pdf.
84. STP PHARMA - VAL ANA - 2006 - PART II final.pdf.
85. Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2006. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II. Statistiques. STP Pharma Pratiques. 2006, 16, 1, 30-60.
86. Groupe de travail « GT Val 2 » coordonné par Michel Laurentie. Guide de validation des méthodes d'analyses. ANSES. Agence nationale de sécurité sanitaire; 2015.

ANNEXE I SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

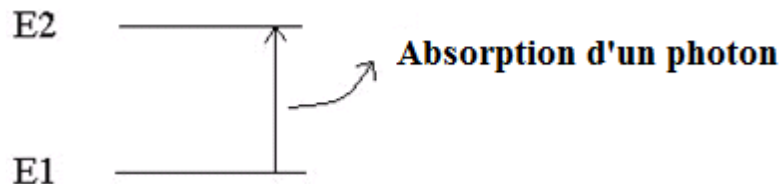
I.1. Généralité:

La spectrométrie d'absorption atomique (AAS) est une technique décrite pour la 1ère fois par Walsh (1955). SAA étudie les absorptions de lumière par l'atome libre. C'est une des principales techniques mettant en jeu la spectroscopie atomique dans le domaine UV-visible utilisée en analyse chimique. Elle permet de doser une soixantaine d'éléments chimiques (métaux et non-métaux). Les applications sont nombreuses étant donné qu'on atteint couramment des concentrations inférieures au mg/L (ppm).

I.2. Principe:

L'absorption atomique de flamme est une méthode qui permet de doser essentiellement les métaux en solution. Cette méthode d'analyse élémentaire impose que la mesure soit faite à partir d'un analyte (élément à doser) transformé à l'état d'atomes libres. L'échantillon est porté à une température de 2000 à 3000 degrés pour que les combinaisons chimiques dans lesquelles les éléments sont engagés soient détruites.

La spectrométrie d'absorption atomique est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie de l'atome. Celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre : $\Delta E = h\nu$ où h est la constante de Planck et ν est la fréquence du photon absorbé. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés.



Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants, et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément absorbant selon la loi de distribution de Boltzmann, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments à doser.

L'analyse par absorption atomique utilise la loi de Beer- Lambert. S'il y a plusieurs éléments à doser, on réalise cette manipulation pour chaque élément de l'échantillon en se plaçant à une longueur d'onde fixée. Il faut donc à chaque manipulation choisir une source adaptée pour éclairer l'élément que l'on cherche à exciter.

I.3. INSTRUMENTATION DE BASE

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose d'une source, la lampe à cathode creuse ⁽¹⁾, d'un brûleur et un nébuliseur ⁽²⁾, d'un monochromateur ⁽³⁾ et d'un détecteur ⁽⁴⁾ relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition.

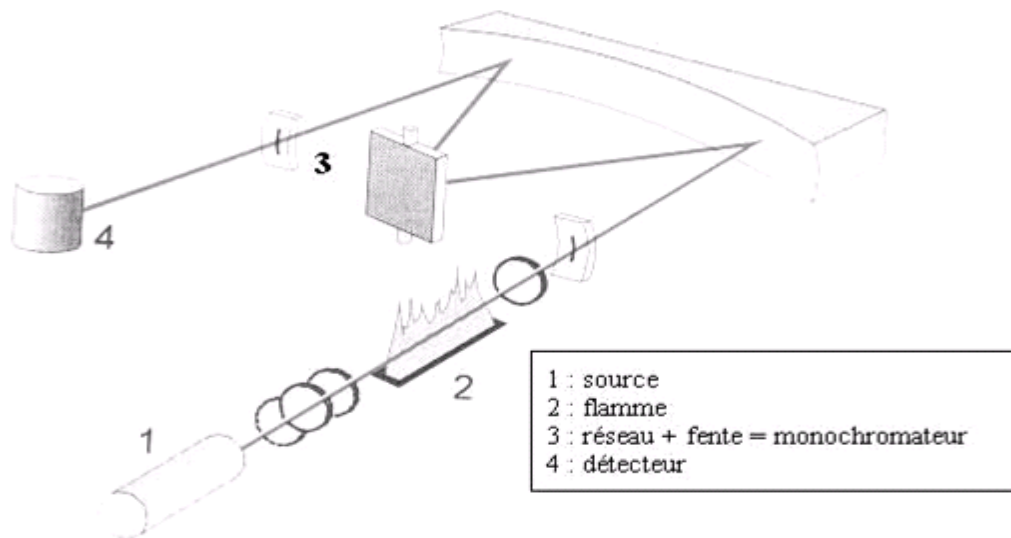


figure 1: instrumentation de base de la spectroscopie d'absorption atomique.

- **La Lampe à cathode creuse:**

La lampe à cathode creuse est constituée par une enveloppe de verre scellée et pourvue d'une fenêtre en verre ou en quartz contenant une cathode creuse cylindrique et une anode. La cathode est constituée de l'élément que l'on veut doser. Un vide poussé est réalisé à l'intérieur de l'ampoule qui est ensuite remplie d'un gaz rare (argon ou néon) sous une pression de quelques mm de Hg.

Lorsqu'on applique une différence de potentiel de quelques centaines de volts entre les deux électrodes, une décharge s'établit. Le gaz rare est alors ionisé et ces ions bombardent alors la cathode, arrachant des atomes à celle-ci. Ces atomes sont donc libres et sont excités par chocs : il y a émission atomique de l'élément constituant la cathode creuse. La particularité du rayonnement ainsi émis est qu'il est constitué de raies très intenses et très fines.

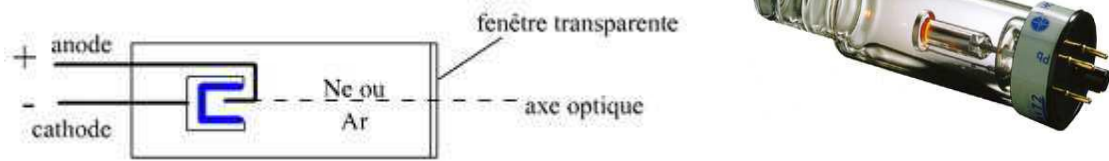


Figure X : Cathode creuse : source pour la spectrométrie d'absorption atomique.

- **Le nébuliseur:**

L'échantillon à analyser est en solution. Celle-ci est aspirée au moyen d'un capillaire par le nébuliseur. A l'orifice du nébuliseur, du fait de l'éjection d'un gaz à grande vitesse, il se crée une dépression (effet Venturi). La solution d'analyse est alors aspirée dans le capillaire et à la sortie, elle est pulvérisée en un aérosol constitué de fines gouttelettes. Cet aérosol pénètre alors dans la chambre de nébulisation dont le rôle est de faire éclater les gouttelettes et d'éliminer les plus grosses. Ce brouillard homogène pénètre alors dans le brûleur.

- **La flamme – atomisation:**

L'aérosol pénètre dans le brûleur puis dans la flamme. Au bout d'un certain parcours au seuil de la flamme, le solvant de la gouttelette est éliminé, il reste les sels ou particules solides qui sont alors fondus, vaporisés puis atomisés. La flamme air acétylène est la plus répandue et permet de réaliser le dosage de nombreux éléments. Sa température est de 2500°C environ. A la place d'une flamme, on peut également utiliser un four cylindrique en graphite pour atomiser l'échantillon.

La lumière qui quitte la source n'est pas monochromatique. On obtient un spectre de raies contenant :

- ✓ les raies de l'élément à doser,
- ✓ les raies du gaz de remplissage dans la source,
- ✓ les raies d'éventuelles impuretés,
- ✓ les raies de l'atomiseur (flamme).

Le rôle du monochromateur consiste à éliminer toute la lumière, quelle que soit son origine, ayant une longueur d'onde différente de celle à laquelle on travaille.

- **Le détecteur:**

Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur. Ce dernier mesure les intensités lumineuses nécessaires au calcul des absorbances. Il est relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition. On détermine :

Absorbance spécifique = Absorbance totale – Absorbance non spécifique.

L'absorption spécifique est due à l'élément à doser (sur une raie). L'absorption non spécifique est due à l'absorption continue de la matrice. Des mesures permettent la correction des absorptions non spécifiques.

I.4. PERTURBATIONS PHYSIQUES ET CHIMIQUES:

Un élément est dosé par absorption de sa raie la plus intense. Cependant, plusieurs facteurs peuvent affecter la position des raies donc conduire à des dosages inexacts.

Les interférences perturbant l'analyse sont de quatre types :

- ✓ chimique,
- ✓ d'ionisation,
- ✓ physique,
- ✓ spectrale.

I.5. DOSAGE PAR ABSORPTION ATOMIQUE:

La courbe d'étalonnage est déterminée de deux manières différentes :

- **Etalonnage direct** → matrice simple (un seul élément à doser)
- **Méthode des ajouts dosés** → matrice complexe ou inconnue.

I.6. QUELQUES APPLICATIONS:

La spectrophotométrie d'absorption atomique est essentiellement une méthode d'analyse quantitative qui convient beaucoup mieux à la détermination des traces qu'à celle des composants majeurs. La spectrométrie d'absorption atomique permet le dosage de nombreux matériaux inorganiques (roches et minerais, métaux et alliages...). Elle est donc très adaptée à l'étude du matériel archéologique. Elle permet aussi de quantifier les éléments métalliques en solutions (Gestion des déchets). Citons quelques exemples :

- ✓ l'analyse des constituants majeurs et mineurs de céramiques archéologiques
- ✓ le dosage du Ca, Sr, Zn dans les os
- ✓ l'analyse des éléments traces pour identification des pierres
- ✓ la dégradation des verres
- ✓ dosage des particules métalliques (Cu, Fe...) dans le papier

ANNEXE I SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

- ✓ l'analyse des eaux
- ✓ l'analyse des tissus végétaux et animaux, des liquides biologiques
- ✓ l'analyse des aliments et boissons,
- ✓ l'analyse des sols, engrais et sédiments
- ✓ l'analyse des produits industriels.

❖ Avantages :

haute sensibilité, grande spécificité, rapidité, faible quantité de substance nécessaire (1 ml de la solution peut suffire) et facilité de préparation des solutions étalons.

❖ Inconvénients :

nécessité d'utiliser pour chaque élément à doser une source caractéristique, technique d'analyse destructrice, domaine d'application limité presque exclusivement aux métaux (Cu, Zn, Pb, Cr, Fe, Cd, etc...), nécessité d'avoir des concentrations assez faibles.

df	Valeurs critiques du t de Student					
	.10	.05	.025	.01	.005	.0005
Uni	.10	.05	.025	.01	.005	.0005
Bi	.20	.10	.05	.02	.01	.001
1	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	636.62
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3	1.683	2.353	3.182	4.541	5.841	12.941
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.859
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.405
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	4.883
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
35	1.31	1.69	2.030	2.438	2.724	3.591
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551
45	1.301	1.679	2.014	2.412	2.69	3.520
50	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.496
55	1.297	1.673	2.004	2.396	2.668	3.476
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.460
65	1.295	1.669	1.997	2.385	2.654	3.447
70	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.435
75	1.293	1.665	1.992	2.377	2.643	3.425
80	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.416
85	1.292	1.663	1.988	2.371	2.635	3.409
90	1.291	.662	1.987	2.368	2.632	3.402
95	1.291	1.661	1.985	2.366	2.629	3.396
100	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.390
120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.373
Inf	1.282	1.645	1.960	2.236	2.576	3.291
Uni	.10	.05	.025	.01	.005	.0005
Bi	.20	.10	.05	.02	.01	.001

Figure : Table de Student

Résumé

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies. Dans un souci de prévention, il conviendra donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant. Pour cela, une méthode de dosage du zinc sanguin par une technique de spectrophotométrie d'absorption atomique / flamme est mise au point et validée selon les directives de la SFSTP suivant un protocole de validation harmonisé, publié dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006 qui repose sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

Les résultats obtenus prouvent que toutes les exigences spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée sont remplies, ce qui atteste la validité de la méthode proposée dans le présent travail, prouvant ainsi mathématiquement la fiabilité et l'exactitude des résultats de dosage sanguin du zinc par SAA.

Mots clés : stress oxydant, oligoéléments, zinc, validation, profil d'exactitude.

Abstract:

Oxidative stress corresponds to an imbalance between the generation of activated oxygen species and the antioxidant defences of the body, in favour of the former. Our lifestyle but also our bad eating habits, abnormally increase the production of EOA in our body. In the long term, this can contribute to the appearance of various pathologies. In the interest of prevention, it will therefore be necessary to have efficient tools at one's disposal to correctly assess the oxidative stress status. For this, a method for the determination of blood zinc using an atomic absorption / flame spectrophotometry technique is developed and validated according to SFSTP guidelines according to a harmonized validation protocol published in the journal STP Pharma pratique in January 2006 based on the accuracy profile as a decision-making tool.

The results obtained prove that all the specific requirements developed in this harmonised approach are met, which attests to the validity of the method proposed in this work, thus mathematically proving the reliability and accuracy of the SAA blood zinc assay results.

Keywords: oxidative stress, trace elements, zinc, validation, accuracy profile

