# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique FACULTE DE MEDECINE Université de Mouloud Mammeri TIZI OUZOU



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة مولود معمري كلية الطب تيزي وزو

# *ŧ。Ѻ៖⋀∧。ЦѯŧЕӟИӟ∧。ŧЕ₼ӟЕЕӟQ*

Département de Pharmacie Mémoire de fin d'études N° D'ORDRE :

Présenté et soutenu publiquement Le 23 JUILLET 2017 En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie Thème :

Mise au point et validation d'une méthode de dosage

simultané de phénylalanine et de tyrosine par HPLC

dans le plasma humain

Réalisé par :

AMEYOUD OUARDIA

**SEDDAOUI MERIEM** 

Encadrées par :

Promotrice: Dr BELKAID NAWAL

**Co-promoteur** : Dr BENSISAID HASSAN

Membres du jury :

- Dr. MAMMOU M MAHU Faculté de Médecine UMMTO Président de jury
- Dr. DAHMANI D MAHU Faculté de Médecine UMMTO Examinatrice
- Dr. MEHNI M H MAHU Faculté de Médecine UMMTO Examinateur
- Dr. IDDIR S MAHU Faculté de Médecine UMMTO Examinateur

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2016/2017

#### Dédicaces

Ce travail, et bien au-delà, je le dois :

A mes très chers parents **« Ahmed et Saliha »** Aucune dédicace ne saurait exprimer tout ce que je ressens pour vous. Je vous remercie pour tout le soutien exemplaire et l'amour exceptionnel que vous me portez. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie.

A mes adorables sœurs : **Yasmine et Nadine** pour votre joie de vivre, votre bonne humeur votre gentillesse et votre soutien sans failleEn témoignage de l'attachement, de l'amour et deL'affection que je porte pour vous.Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.

A mon frère **Rabah** avec mon grand amour, je te dédie ce travail en te souhaitant beaucoup de bonheur et un avenir plein de succès

A mon cher fiancé **Hilal** je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite en témoignage de l'affection, de l'attachement que je porte pour toi.

A ma **Mamie** pour son soutien, ses prières et son attention particulière, Que Dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie.

A mes **beaux-parents**, mes **beaux-frères** et mon adorable belle-sœur « **Sarah** » Vous m'avez accueilli à bras ouverts dans votre famille.Que Dieu tout puissant vous protégé et vous procure santé, réussite, bonheur et longue vie.

A mes **oncles** et mes**tantes** (paternelle et maternelle), mes **cousins** et **cousines** (je ne peux pas tous vous citer) Vous étiez toujours présents pour m'aider et m'encourager. Sachiez que vous serez toujours dans mon cœur. A mes amies de la promotion 2011/2017 **Nabila, Dyhia, Nabila, Asma** merci pour votre bonne humeur et votre amitié sincère.

A ma précieuse binôme: **Meriem** les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à ton égard .ma meilleure amie, tu es une fille unique. Merci pour tout ce qu'on a partagé ensemble, toutes ces années étaient belles en ta compagnie. Notre amitié à commencer il ya 6 ans et elle durera toute la vie, je te dédie ce travail parce que tu le mérite vue que c'est ton travail aussi.

Ouardia

#### Dédicaces

C'est avec grand amour et profonde gratitude que je dédie ce mémoire de fin d'études

A mes très chers parents qui m'ont fourni au quotidien un soutien et une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma gratitude seulement par des mots. Que Dieu vous protège et vous garde pour nous.

A mes frères Ghiles, Abd el Halim, Abd elghani, Ahmed et à mon unique sœur Drifa avec tout l'amour que je vous porte, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.

A toute ma famille, particulièrement mon grand-père Que Dieu tout puissant te protégé et te procure santé, et longue vie.

A mes copines a : Lydia, Dyhia, Liza et Souhad, en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur et de réussite.

A toute mes amies de promotion 2011/2017 et plus particulièrement : Nabila, Dyhia, Asma, Meriem et

Bouchra

A ma binôme : Ouardia Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour t'exprimer mon affection et mes pensées, tu es pour moi une sœur et une amie.

Meriem

#### Remerciement

Nous remercions notre Dieu miséricordieux de nous avoir donné la force, le courage et la volonté pour réaliser ce travail. Nous tenons à remercier tout particulièrement notre chère promotrice **D' BELKAID.N**. Pour son aide, son sérieux, sa compétence, sa disponibilité et son sens du devoir Nous avons eu le privilège de travailler avec vous et d'apprécier vos qualités et vos valeurs, le travail à vos cotés est un honneur pour nous et une partie de plaisir, vous êtes un exemple pour nous. Nous remercierons également notre Co-promoteur **Dr BENSISAID.H** assistant en chimie analytique pour tous ses efforts fournis.

Merci à **Dr MAMOU**. *M* maitre assistant en chimie analytique d'avoir accepter de présider notre jury.

Nos vifs remerciements vont aux membres du jury, Dr DAHMANI, Dr MEHNI et Dr IDDIR. Nous vous sommes très

reconnaissants de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Nous tenon à remercier également nos invités d'honneur Dr Sifer et Dr Chibah.

Un grand merci à Dr BOURSOUTI.M, Dr AIT CHABANE.D et Dr TAMAZIRT.B, pour leur aide précieuse et leur soutien.

# TABLE DES MATIERES

Table des matières

Introduction générale	1
Objectif	2

# Partie théorique

Chapitre I: phénylalanine et tyrosine

1	Acid	les aminés : Généralités	3
	1.1	Définition	3
	1.2	Classification	3
	1.3	Rôle physiologique	4
	1.4	Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM)	4
	1.5	Les aminoacidopathies	5
2	TYF	OSINE –PHENYLALANINE : Physiologie	5
	2.1	Définition des acides aminés aromatiques	5
	2.1.1	Phénylalanine	5
	2.1.2	2 Tyrosine	6
	2.2	Propriétés physico-chimiques	6
	2.3	Origine et devenir de la phénylalanine et la tyrosine dans l'organisme	6
	2.3.1	Origine	6
	2.3.2	2 Métabolisme	7
	2.4	Rôle physiologique de la phénylalanine et la tyrosine	7
	2.4.1	Synthèse des neurotransmetteurs	8
	2.4.2	P. Hormones thyroïdiennes	8
	2.4.3	Synthèse de la mélanine	9
3	TYF	OSINE – PHENYLALANINE : Pathologies et méthodes d'exploration	9
	3.1	Phénylcétonurie	9
	3.1.1	Définition	9
	3.1.2	Physiopathologie	9
	3.1.3	Clinique	10
	3.1.4	Génétique	10
	3.1.5	Classification	11
	3.1.6	5 Exploration	12

# TABLE DES MATIERES

3.1.7 Prise en charge après le dépistage	14
3.1.8 Génotypage	16
3.1.9 Traitement	16
3.1.10 Suivi des patients PCU	17
3.2 Tyrosinémie	18
3.2.1 Tyrosinémie type I	19
3.2.2 Tyrosinémie de type II	24
3.2.3 Tyrosinémie de type III	24
Chapitre II: Validation analytique	
1 Généralités	25
1.1 Cycle de vie d'une méthode analytique	25
1.2 Contexte réglementaire	26
2 Validation	27
2.1 Définition	27
2.2 Critères de validation	27
2.2.1 La limite d'acceptabilité	27
2.2.2 L'intervalle de confiance (IC)	27
2.2.3 L'intervalle de tolérance	27
2.2.4 La spécificité ou sélectivité	27
2.2.5 La fonction de réponse	27
2.2.6 La linéarité	28
2.2.7 La justesse	28
2.2.8 La fidélité	28
2.2.9 L'exactitude	28
2.2.10 La limite de détection	28
2.2.11 La limite de quantification	28
2.2.12 Le profil d'exactitude	29
2.2.13 Robustesse	29
2.3 Objectifs d'une validation analytique	29
2.4 Choix du protocole de validation	29
2.5 Démarches statistiques	31
2.5.1 Spécificité	31
2.5.2 Fonction de réponse	32
2.5.3 Alignement des observations	35
2.5.4 Prédiction inverse	36
2.5.5 Calcul de la justesse et de la fidélité	37
2.5.6 Calcul de l'exactitude	39
2.5.7 Erreur totale et profil d'erreur totale	39
2.5.8 Calcul de l'intervalle de tolérance	40

# TABLE DES MATIERES

2.5	2.5.9 Le profile d'exactitude		
2.5	5.10 Linéarité	41	
2.5	5.11 Limites de quantification	41	
	Partie pratique		
1 Ma	atériel et méthode	42	
1.1	Matériels	42	
1.2	Méthode	45	
1.2	2.1 Le principe de la méthode	45	
1.2	2.2 Choix des paramètres de validation	46	
1.2	2.3 Préparation des réactifs	47	
1.2	2.4 Mode opératoire	48	
2 Ré	sultats	53	
2.1	Chromatogrammes obtenus	53	
2.2	Informations concernant les données brutes	54	
2.3	Spécificité et effet matrice	54	
2.4	Fonction de réponse	59	
2.5	Profils d'exactitude obtenus	79	
2.7	Choix de la fonction de réponse	87	
2.8	Alignement des observations	88	
2.9	Prédictions inverses	89	
2.10	Justesse	91	
2.11	Fidélité	92	
2.12	Exactitude	93	
2.13	Erreur totale et profil d'erreur totale	94	
2.14	Intervalle de tolérance	96	
2.15	Profil d'exactitude	98	
2.16	Linéarité	99	
2.17	Limites de quantification :	100	
3 Di	scussion	102	
Conclusion		- 110 -	
Referen	nces bibliographiques		

Annexes

Résumé

# LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Aminé.

**AAH** : AminoAcidopathie Héréditaire.

**DOPA** : Dihydroxyphénylalanine.

EI : Etalon Interne.

FAH: Fumarylacétoacétate Hydrolase.

GFAP: Glial Firillary Acid Protein.

HMP : Hyperphénylalaninémie Modérée Permanente.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

HT1: Tyrosinémie type 1.

HT2 : Tyrosinémie type 2.

HT3 : Tyrosinémie type 3.

MHM : Maladie Héréditaire du Métabolisme.

NADH : Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide-Hydrogéné.

NNé : Nouveau-Né.

**PAH** : Phénylalanine Hydroxylase.

Phe : Phénylalanine.

PCU : Phénylcétonurie.

SFSTP : Société Française des Sciences Technologiques et Pharmaceutiques.

**Tyr** : Tyrosine.

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Propriétés physicochimiques de la Phe et Tyr
Tableau II : Différents phénotypes de la PCU en fonction de la concentrationplasmatique en phénylalanine.11
Tableau III : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi
Tableau IV : Quelques exemples des différentes fonctions de réponse pouvant êtreenvisagées lors d'une validation de méthode analytique33
Tableau V : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses
Tableau VI : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses . 37
Tableau VII : Différentes façon du calcul de la justesse
Tableau VIII : Calcul de l'exactitude
Tableau IX : Matériels utilisés dans le présent travail
Tableau X : Matières premières utilisées dans le présent travail
Tableau XI : Réactifs utilisés dans le présent travail
Tableau XII : Appareillages utilisés dans le présent travail
Tableau XIII : Moyenne des temps de rétention obtenus
Tableau XIV : Résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice :standards d'étalonnage sans matrice de la Phénylalanine
Tableau XV : Résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice :standards de validation (avec matrice) de la Phénylalanine
Tableau XVI : Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine pour laPhénylalanine.57
Tableau XVII : Résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice pourstandards d'étalonnage sans matrice de la Tyrosine
Tableau XVIII: Résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice :standards de validation (avec matrice) de la Tyrosine.58
Tableau XIX: Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine pour la Tyrosine
Tableau XX : Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx + a (avec matrice)
Tableau XXI: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx + a (sans matrice)
Tableau XXII: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx (avec matrice)

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau XXIII: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx (sans matrice)
Tableau XXIV: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction LnY= f(Lnx)         (avec matrice)         63
Tableau XXV: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction $LnY = f(Lnx) 64$
Tableau XXVI: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction
Tableau XXVII: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (sans matrice)
Tableau XXVIII: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction $y = cx^2 + bx$ + a (avec matrice)67
Tableau XXIX: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (sans matrice)
Tableau XXX: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $y = bx + a$ (avecmatrice)
Tableau XXXI: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction y = bx + a (sans matrice)
Tableau XXXII: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction y = bx (avec matrice)
Tableau XXXIII: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction y = bx (sans matrice)
Tableau XXXIV: Résultats de la tyrosine obtenus avec la fonction $LnY = f(Lnx)$ (avec matrice)
Tableau XXXV: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $LnY = f(Lnx)$ (sans matrice)
Tableau XXXVI: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (avec matrice)
Tableau XXXVII: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (sans matrice)
Tableau XXXVIII: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (avec matrice)
Tableau XXXIX: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (sans matrice)
Tableau XL: Profils d'exactitude obtenus pour la Phénylalanine
Tableau XLI: Profils d'exactitude obtenus pour la Tyrosine    84
Tableau XLII: Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries devalidation pour la Phénylalanine88

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau XLIII: Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour la Tyrosine       89
Tableau XLIV: Concentrations calculées par prédiction inverse pour la Phénylalanine
Tableau XLV: Concentrations calculées par prédiction inverse pour la Tyrosine91
Tableau XLVI: Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standardsde validation pour la Phénylalanine91
Tableau XLVII: Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standardsde validation pour la Phénylalanine92
Tableau XLVIII: Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standardsde validation pour la Phénylalanine92
Tableau XLIX: Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour Tyrosine       93
Tableau L: Résultats du calcul de l'exactitude relative de la Phénylalanine
Tableau LI: Résultats du calcul de l'exactitude relative de la Tyrosine
Tableau LII: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration desstandards de validation de la phénylalanine95
Tableau LIII: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration desstandards de validation de la tyrosine95
Tableau LIV: Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentrationpour la Phénylalanine96
Tableau LV: Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration pour la Tyrosine
Tableau LVI : Limites de quantification de la phénylalanine 101
Tableau LVII : Résultats de comparaison des pentes des droites de régression 103
Tableau LVIII: Conditions chromatographique de la méthode       108

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine7
Figure 2 : Biosynthèse des hormones thyroïdiennes
Figure 3 : Biosynthèse de la mélanine9
Figure 4 : Localisation du gène de la PAH11
Figure 5 : Schéma décisionnel recommandé selon le chiffre de phénylalanine obtenu au dépistage à J3
Figure 6:Différents types de tyrosinémie
Figure 7: Localisation du gène de la FAH
Figure 8 : Etapes de la formation de la succinylacétone
Figure 9 : Formation des dérivés de 4-hydroxyphényl
Figure 10: Blocage de la PBG-S
Figure 11 : Cycle de vie d'une méthode analytique25
Figure 12 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation 30
Figure 13 : Mode opératoire
Figure 14 : Dilutions des solutions de la phénylalanine
Figure 15 : Dilution de la solution de tyrosine
Figure 18 : Chromatogramme d'un blanc albumine53
Figure 16 : Chromatogramme obtenu avec un standard d'étalonnage sans matrice53
Figure 17 : Chromatogramme obtenu avec un blanc plasma
Figure 19: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction y = bx + a (avec matrice)
Figure 20: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction y = bx + a (sans matrice)
Figure 21: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx (avec matrice)
Figure 22: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction y = bx (sans matrice)
Figure 23: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction 64
Figure 24: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction 65
Figure 25: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (avec matrice)
Figure 26: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction 67
Figure 27: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (avec matrice)

# LISTE DES FIGURES

Figure 28: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction $y = cx^2 + bx + a$ (sans matrice)
Figure 29 : Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction $y = bx + a$ (avec matrice)
Figure 30: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction $y = bx + a$ (sans matrice)
Figure 31: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction y = bx (avec matrice)
Figure 32: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction y = bx (sans matrice)
Figure 33: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction LnY = f(Lnx) (avec matrice)
Figure 34: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction LnY = f(Lnx) (sans matrice)
Figure 35: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (avec matrice)
Figure 36: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})(\text{sans matrice})$
Figure 37: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction78
Figure 38: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction
Figure 39: Profil d'erreur totale relative de la Phénylalanine95
Figure 40 : Profil d'erreur totale relative de la Tyrosine
Figure 41: Profil d'exactitude de la Phénylalanine
Figure 42: Profil d'exactitude de la Tyrosine
Figure 43: Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Phénylalanine
Figure 44: Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Tyrosine
Figure 45: Profil d'exactitude de la Tyrosine avec ( $\beta = 67\%$ et $\lambda = 15\%$ )105
Figure 46: Profil d'exactitude de la Tyrosine avec ( $\beta = 67\%$ et $\lambda = 20\%$ )105
Figure 47: Mode opératoire de la méthode
Figure 48:Droite d'étalonnage de la phénylalanine109
Figure 49:Droite d'étalonnage de la tyrosine
Figure 50 : Chromatogramme II
Figure 51 : Différents modules de l'HPLC

#### **INTRODUCTION**

#### Introduction

Les maladies héréditaires du métabolisme des acides aminés (AAH), ou erreurs innées du métabolisme des acides aminés, ou aminoacidopathies congénitales, regroupent un ensemble de désordres affectant le métabolisme des acides aminés. Ces maladies sont rares et souvent graves ; elles concernent chacune moins d'une naissance sur 10 000 mais considérées dans leur globalité, elles représentent une part considérable de la pathologie néonatale et pédiatrique et elles peuvent revêtir un large spectre phénotypique. La majorité de ces désordres est génétique, ils s'expriment dans la période néonatale, souvent par des manifestations neurologiques et s'accompagnent de perturbations métaboliques. S'ils sont présents le plus souvent dès la naissance, ils peuvent apparaître plus tard dans la vie de l'enfant voire de l'adulte.

Le diagnostic des AAH reposait sur un faisceau de présomptions. Actuellement, l'exploration fait appel à des méthodes variées qui fournissent des diagnostics de certitude[1].

Développer une méthode de dosage des acides aminés ne peut être que bénéfique pour les laboratoires d'analyse biologique surtout s'ils n'en disposent pas.

Le but de ce travail est d'optimiser et valider une méthode analytique simple rapide et économique permettant le dosage simultané par HPLC des deux acides aminées phénylalanines (Phe) et tyrosine (Tyr), impliqués dans la survenue de deux aminoacidopathies les plus fréquentes : phénylcétonurie (PCU) et tyrosinémie qui sont des maladies métaboliques congénitales à transmission autosomique récessive dont le dépistage a bas âge permet de réduire les séquelles et d'offrir une meilleure qualité de vie.

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

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

# OBJECTIF

#### Objectif

Notre travail, qui s'est étalé sur une période de 7mois, a été réalisé au niveau du laboratoire de biochimie et laboratoire de chimie analytique de la faculté de médecine de l'université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. L'objectif était :

La mise au point et la validation d'une méthode simple, économique et réalisable en routine de dosage simultané de la Phe et de la Tyr par chromatographe liquide haute performance (HPLC), 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.

# Partie théorique

# Chapitre I : Phénylalanine et tyrosine

#### 1 Acides aminés : Généralités

#### 1.1 Définition

Ce sont des molécules qui possèdent à la fois une fonction acide carboxylique et une fonction amine primaire portées par un même atome de carbone, l'atome de carbone  $\alpha$ . Ils différent par la nature de la chaine latérale R et on définit ainsi 20 AA naturels différents[3].

Formule générale des AA NH<sub>2</sub> –CH – COOH | R

Les acides aminés sont à la fois les précurseurs et les produits de dégradation des protéines, ils jouent un rôle capital dans l'élaboration et le maintien de la matière vivante ; ils proviennent soit d'une synthèse endogène, soit de l'alimentation, soit enfin de la dégradation ou du renouvellement des protéines circulantes et tissulaires. Comme il n'existe pas de réserve en acides aminés, les interrelations avec les métabolismes glucidiques et lipidiques contribuent à équilibrer les échanges d'azote aminé et les adapter aux besoins cellulaires[4].

#### 1.2 Classification

On classe les acides aminés naturels selon leur radical :

- Acide (acide aspartique, acide glutamique);
- Alcool (sérine, thréonine) ;
- Aliphatique (glycocolle, alanine, valine, leucine, isoleucine);
- Basique (lysine, histidine, arginine);
- Aromatique (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) ;
- Imine (proline);
- Soufré (cystine, cystéine, méthionine)[5]

On peut les classer aussi selon la source:

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

# PARTIE THEORIQUE CHAPITRE I : PHENYLALANINE ET TYROSINE

De même, le caractère non essentiel des autres AA demande à être précisé. En effet, l'essentialité de ces molécules a été définie à partir des besoins évalués chez l'adulte sain alimenté par voie orale. Or, il existe un certain nombre de situations au cours desquelles un apport exogène devient nécessaire, la synthèse endogène étant insuffisante par rapport aux besoins « ex : histidine et arginine en période de croissance » [6].

En plus des acides aminés naturels ; d'autres sont inhabituels retrouvés au niveau des protéines ou sous forme libre : hydroxproline, ornithine, citrulline, homocystéine[3].

#### 1.3 Rôle physiologique

- Unité structurale des peptides et protéines ;
- Rôle métabolique et fonctionnel;
- Rôle énergétique [3].

#### 1.4 Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM)

Elles résultent le plus souvent d'un déficit enzymatique sur l'une des nombreuses voies métaboliques « glucides, acides aminés ou lipides » ou du trafic intracellulaire. Un déficit enzymatique entraine l'absence d'un compose situé en aval du déficit et/ou l'accumulation d'un compose potentiellement toxique situé en amont du déficit.

Les MHM peuvent être classées en quatre groupes par leur mécanisme physiopathologique en : maladies d'intoxication, maladies énergétiques, maladies vitamino-dépendantes, et les anomalies de synthèse et de catabolisme des molécules complexes [5].

Les maladies d'intoxication sont un groupe constitué par les erreurs innées du métabolisme intermédiaire qui donnent lieu à une intoxication aigue ou rapidement progressive, secondaire à l'accumulation de métabolites toxiques retenus en amont d'un bloc enzymatique. Ces MHM nécessitent une prise en charge thérapeutique en urgence. Elles sont donc traitables[7].

Les aminoacidopathies sont des maladies d'intoxication souvent liées à un déficit enzymatique sur la voie de dégradation des acides aminés.

#### 1.5 Les aminoacidopathies

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

Ces maladies peuvent être classées en deux grands groupes :

 Aminoacidopathies par anomalies du transport membranaires : atteignant les membranes rénales et hépatiques, de l'entérocyte ou encore les membranes intracellulaires « mitochondries, lysosomes » ;

- Aminoacidopathies par enzymopathies : déficit enzymatique touchant une étape du catabolisme de l'acide aminé incriminé[8].

#### 2 TYROSINE – PHENYLALANINE : Physiologie

#### 2.1 Définition des acides aminés aromatiques

Regroupent les acides aminés à cycle benzénique qui sont : la Phe, la Tyr et le tryptophane.

#### 2.1.1 Phénylalanine

La Phe est un acide aminé essentiel présent dans les protéines (taux moyen = 5 %), d'où sa double origine : catabolisme endogène des protéines et apport alimentaire. Le catabolisme de la Phe exige son hydroxylation en tyr, les voies menant aux acides phénylpyruvique, phényllactique et ortho-hydroxyphénylacétique étant des impasses métaboliques, non utilisées chez le sujet normal. Les concentrations plasmatiques normales de Phe varient de selon l'âge, elles sont < 80  $\mu$ mol/L[9,10].

Les variations physiologiques des valeurs plasmatiques de Phe :

Les taux plasmatiques de Phe comme ceux de la plupart des autres aides aminés sont élevés chez le fœtus et chutent rapidement après la naissance mais restent élevés comparés à ceux de l'adulte.

Le niveau de Phe plasmatique est plus élèves chez l'homme que chez la femme, et augmente progressivement avec le vieillissement, et la différence de sexe tend à disparaitre chez les personnes âgées[11].

## 2.1.2 Tyrosine

La tyr est un acide aminé aromatique dérivé de l'hydroxylation de la Phe. Son catabolisme entraîne la formation de fumarate et d'acétoacétate, deux composés importants pour la gluconéogenèse et la cétogenèse. Les concentrations plasmatiques normales de tyrosine varient de 30 à 120  $\mu$ mol / L. L'augmentation des taux de tyr peut être due à des maladies du foie ou des erreurs innées du catabolisme de la tyr[12].

## 2.2 Propriétés physico-chimiques

	Formule brute	Formule développée	Dénomination chimique	PKa NH3 <sup>+</sup>	PKa COOH	PHi	Masse molaire	T° fusion
Phe	C9H11NO2	O NH <sub>2</sub> OH	Acide 2-amino-3- phénylpropanoïque	9.2	2.6	5.9	165.18	275 à 283
Tyr	C9H11NO3	HO NH2 OH	Acide( <i>S</i> )-2-amino- 3-(4- hydroxyphényl) propanoïque	9.1	2.2	5.6	181.19	343

# Tableau I : Propriétés physicochimiques de la Phe et Tyr[13]

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

# 2.3 Origine et devenir de la phénylalanine et la tyrosine dans l'organisme

## 2.3.1 Origine

Tous les acides aminés essentiels qui pénètrent dans le corps proviennent de protéines alimentaires ; des sources de protéines de haute qualité telles que les œufs ou le lait fournissent environ 5 g de Phe pour 100 g de protéines. Les besoins chez les adultes sains sont estimés à 1 à 2 g par jour, ce qui équivaut à environ 50 g de protéines de haute qualité. La Tyr peut provenir de l'alimentation ou de la dégradation de la Phe[15].

#### 2.3.2 Métabolisme

Le catabolisme des trois aminoacides aromatiques, Phe, Tyr et tryptophane, fait intervenir des mécanismes semblables : une oxydation dans les premières étapes de la voie, l'élimination de l'azote par transamination ou hydrolyse, puis l'ouverture du cycle aromatique couplée à une oxydation[16].

Le catabolisme de la Phe peut empreinter deux voies :

- Une voie majeure la transformant en Tyr;
- Une voie mineure par transamination directe en phénylpyruvate substrat de deux autres voies cataboliques donnant du phényllactate et phénylacétate [16].



Figure 1 : Métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine[16]

#### 2.4 Rôle physiologique de la phénylalanine et la tyrosine

Au niveau du foie, la Phe, sous l'action d'une enzyme (phénylalanine hydroxylase), peut se transformer en Tyr qui est nécessaire à la synthèse :

- Des hormones thyroïdiennes
- Des neurotransmetteurs : dopamine, adrénaline, noradrénaline ;

• De la mélanine[16].

## 2.4.1 Synthèse des neurotransmetteurs

Les catécholamines sont synthétisées à partir de Tyr. La phase initiale implique l'hydroxylation en dihydroxyphénylalanine (DOPA), catalysée par l'enzyme tyrosinehydroxylase. Une fois formé, la DOPA est rapidement décarboxylée en dopamine par la DOPA décarboxylase[17].

Dans les neurones qui utilisent la dopamine comme émetteur, aucune autre modification enzymatique ne se produit. Les neurones qui utilisent la noradrénaline comme émetteur contiennent une enzyme supplémentaire, la dopamine  $\beta$  hydroxylase, qui convertit la dopamine en noradrénaline. Les neurones utilisant l'adrénaline comme émetteur contiennent une enzyme supplémentaire, la noradrénaline N -méthyl transférase, qui est responsable de catalyser la conversion de la noradrénaline en adrénaline [17].

# 2.4.2 Hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont produites par les cellules épithéliales de la glande thyroïde , par iodation de la Tyr grâce à la thyroïde peroxydase.[18,19]



Figure 2 : Biosynthèse des hormones thyroïdiennes[20]

#### 2.4.3 Synthèse de la mélanine

La mélanine est synthétisée à partir de la Tyr dans les mélanosomes, organites provenant de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique du mélanocyte. Selon les réactions suivantes[21]:



Figure 3 : Biosynthèse de la mélanine[22]

#### **3 TYROSINE – PHENYLALANINE : Pathologies et méthodes d'exploration**

#### 3.1 Phénylcétonurie

#### 3.1.1 Définition

La PCU est une affection génétique de transmission autosomique récessive. Il s'agit d'une aminoacidopathie entraînant l'accumulation de la Phe notamment dans le plasma et dans le cerveau. Cette maladie résulte de mutations du gène de la PAH qui assure la conversion de la Phe en Tyr[23].

#### 3.1.2 Physiopathologie

La pathogénie de la PCU résulte de plusieurs mécanismes :

- La Phe ainsi que ces métabolites secondaires (phényllactate, phénylpyruvate et phénylacétate) franchissent la barrière hémato-encéphalique et s'accumulent dans le cerveau

- La Tyr étant le précurseur de plusieurs neurotransmetteurs, son déficit entraine également un déficit en dopamine, adrénaline, noradrénaline ainsi qu'un déficit en mélanine entrainant des anomalies cutanées et phanériennes

# PARTIE THEORIQUE CHAPITRE I : PHENYLALANINE ET TYROSINE

- La Phe monopolise les transporteurs d'autres acides aminés neutres pour pénétrer dans le cerveau ce qui crée un déficit au niveau cérébral de ces acides aminés qui va entrainer une altération de la synthèse protéique intracérébrale et de la synthèse des neurotransmetteurs

- Un défaut de myélinisation lié au fait qu'en présence de Phe, les oligodendrocytes « myélinisants » adoptent un phénotype non myélinisant en surexprimant la GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein)[23,24].

#### 3.1.3 Clinique

On note des troubles neurologiques graves : retard mental, troubles du comportement, psychoses, spasmes en flexion, épilepsie. Ces signes neurologiques s'associent à des troubles des phanères avec une hypopigmentation globale : peau pale, cheveux blonds, yeux bleus ; associée à un eczéma dans 20 à 40 % des cas. Chez les patients plus âgés, le retard mental parfois profond associé à des troubles du comportement est habituel : hyperactivité autoagressivité, comportement autistique. Des syndromes proches de la schizophrénie ont été décrits. Environ 25 % des cas développent une épilepsie de type "grand mal"; d'autres signes neurologiques (extrapyramidaux, hypertonie globale, syndrome pyramidal, tremblements, syndrome parkinsonien, etc.) peuvent être observes avec une fréquence variable [24].

#### 3.1.4 Génétique

Plus de 450 mutations dans le gène PAH ont été identifiées chez les personnes atteintes de phénylcétonurie (PCU). La plupart des mutations connues provoquent un changement dans un seul acide aminé dans l'enzyme de la phénylalanine hydroxylase. La mutation la plus courante est une substitution de l'acide aminé arginine à l'acide aminé tryptophane en position 408 dans l'enzyme (écrite comme Arg408Trp ou R408W)[25].

Le gène PAH est situé sur le bras long (q) du chromosome 12 entre les positions 22 et 24.2. Plus précisément, de la paire de bases 101 756 233 à la paire de bases 101 835 510[25].



Figure 4 : Localisation du gène de la PAH[25].

## 3.1.5 Classification

Il est classique de distinguer deux formes de la maladie selon les taux de Phe obtenus sous régime normal, le tableau ci-dessus résume les classes de la PCU :

Tableau II : Différents phénotypes de la PCU en fonction de la concentration			
plasmatique en phénylalanine[23].			

La PCU qui nécessite une	La PCU typique	> 20 mg/ dl >1200 µmol/l
thérapeutique	La PCU atypique	10mg/dl< Phe< 20 mg/dl 600 μmol/l < Phe< 1200 μmol/l
La PCU qui ne nécessite qu'une surveillance	L'hyperphénylalaninémie modérée permanente (HMP)	Phe < 10 mg/dl, Phe <600 μmol/l

Il existe une autre forme d'hyperphénylalaninémie, la phénylcétonurie maligne, qui n'est pas causée par un déficit de la PAH elle-même, mais par un défaut de synthèse de son cofacteur, la tétrahydrobiopterine[26].

#### 3.1.6 Exploration

#### 3.1.6.1 Signes d'appels

- Les signes cliniques permettent une orientation vers une MHM en générale, et plus spécifiquement vers une aminoacidopathie.

Troubles de la pigmentation et retard psychomoteur sont des signes majeurs d'une PCU.

Odeurs et couleurs des urines : L'odeur des urines peut déjà évoquer une aminoacidopathie :
 L'odeur de souris ou de moisi est caractéristique d'une PCU[27].

#### 3.1.6.2 Dépistage et diagnostic

Le diagnostic est établi grâce à la pratique généralisée du dépistage néonatal, basé sur le dosage de la Phe recueilli au 3éme jour de vie, ou devant des signes évocateurs, quelque soit l'âge, dans les pays n'adoptant pas un dépistage néonatal systématique. Plusieurs techniques sont utilisées.

## 3.1.6.3 Étapes préanalytiques

#### - Le prélèvement spécifique au dépistage néonatal des maladies métaboliques :

Il s'agit d'une « carte » de prélèvement (papier filtre type Whatman qui permet le recueil de sang et associe les renseignements d'identification).

Les « cartes », sont séchées à température ambiante deux heures au minimum, et transportées vers les laboratoires dans de simples enveloppes, Il est important de ne pas utiliser de sachets plastiques ou en papier aluminium qui provoquent la rétention d'humidité préjudiciable à la bonne exécution du dosage.

La Phe contenue dans le sang « séché » est très stable, la conservation est optimale à +4 °C en présence d'un desséchant.

Le dosage est réalisé sur les disques de sang des « cartes » de prélèvement découpés à l'aide d'un emporte-pièce[9].

#### - Autres types du prélèvement

La recherche qualitative ou quantitative de la Phe peut se faire au niveau d'autres milieux biologiques : urines, plasma, sérum ou LCR.

#### **3.1.6.4** Techniques de dosage

Le dépistage de la PCU a été initié grâce au test mis au point par Guthrie, le besoin de méthodes quantitatives a induit le développement de méthodes fluorimétriques, enzymocolorimétriques, Chromatographiques, et même de spectrométrie de masse, toutes appliquées au prélèvement de sang séché « éluât du papier buvard » et autres types de prélèvement à visée diagnostique[9].

#### 3.1.6.4.1 Test de Guthrie

Test biologique dont le principe consiste à imprégner un disque de papier buvard de sang capillaire prélevé sur le talon du Nné et le placer sur un milieu de culture de *Bacillus subtilis* contenant l'inhibiteur antagoniste de la Phethiénylalanine qui empêche la poussée du bacille.

La présence de Phe en excès dans l'échantillon du patient PCU renverse l'inhibition de la croissance microbienne dans le milieu de culture. La taille de la colonie sera d'autant plus importante que la quantité de Phe sera grande. La comparaison à des disques témoins contenant des doses connues de Phe permet de chiffrer le taux de Phe.

Ce dosage est semi-quantitatif. La sensibilité du test peut être influencée par la prise d'antibiotiques et l'âge du nouveau-né au moment du prélèvement[10].

## 3.1.6.4.2 L'analyse par fluorimétrie

L'analyse par fluorimétrie est maintenant la méthode la plus répandue. Elle est basée sur la réaction de la PHE et la ninhydrine formant un complexe fluorescent dont la réponse fluorimétrique est augmentée par la présence du dipeptide L- leucyl L-alanine. Le dosage est quantitatif et la prise d'antibiotiques n'interfère pas avec la réaction[9].

#### 3.1.6.4.3 Enzymocolorimétrie

Cette méthode utilise la phénylalanine déshydrogénase qui catalyse la désamination de la Phe en phénylpyruvate. Le nicotinamide–adénine–dinucléotide– hydrogéné « NADH » produit est mesuré colorimétriquement avec un sel de tétrazolium comme accepteur d'électrons[9].

#### 3.1.6.4.4 Chromatographie

La chromatographie est une méthode d'analyse, qui se base sur la séparation les constituants d'un mélange par entrainement au moyen d'une phase mobile liquide ou gaz[9].

#### - Chromatographie qualitative : CCM

L'originalité de la CCM tient au fait que la phase stationnaire est déposée en un film très adhérent en faible épaisseur (0,1 à 2,5 mm) sur une surface solide rigide (verre) ou souple (aluminium ou plastique). Les phases stationnaires les plus utilisées sont le gel de silice, l'alumine et la poudre de cellulose[28].

#### - Chromatographie quantitative : HPLC

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique[28].

#### - Spectrométrie de masse en tandem (SM/SM)

Cette méthode permet d'isoler les molécules selon leur poids moléculaire et de les quantifier sur la base de fragments ioniques caractéristiques avec une grande sensibilité, exactitude et précision. La spectrométrie de masse se définit comme l'étude d'ions à l'état gazeux (ionisation par gradient de champ électrique). Le système informatisé permet d'obtenir rapidement les résultats (1 à 2 minutes par échantillon). L'avantage de cette méthode est de pouvoir analyser plusieurs métabolites sur le même échantillon et en même temps[29].

## 3.1.7 Prise en charge après le dépistage

Si le dépistage néonatal se révèle positif, il est réalisé un prélèvement de contrôle qui permet de confirmer l'hyperphénylalaninémie et d'éliminer une cause secondaire d'élévation de la PHE dans le sang. Le résultat de ce prélèvement, s'il est à nouveau positif, engendre la réalisation d'autres examens afin d'approcher l'identification de la forme phénotypique de l'enfant (PCU classique, atypique ou hyperphénylalaninémie modérée permanente) pour débuter au plus vite si besoin un régime alimentaire adapté[30].

# 3.1.7.1 Conduite à tenir en fonction de la phénylalaninémie au dépistage

Le dépistage est déclaré positif lorsque le taux de PHE est supérieur à 3 mg/dl (180 µmol/L). Cependant, la prise en charge immédiate dépend du niveau de PHE dosé lors de ce dépistage.

Schématiquement, deux situations sont possibles :

# PARTIE THEORIQUE CHAPITRE I : PHENYLALANINE ET TYROSINE

- Si le taux est inférieur à 3 mg/dl (180 μmol/l) : le nouveau-né est classé dans les dépistages négatifs.
- Le taux est situé entre 3 et 5 mg/dl (180-300 µmol/l) : le laboratoire de dépistage demande un prélèvement de contrôle.
- Le taux de dépistage est supérieur à 5 mg/dl (300 µmol/l) : le laboratoire de dépistage prévient immédiatement le centre médical responsable du traitement où l'enfant sera examiné et bénéficiera des examens suivants :
  - Contrôle du taux de PHE.
  - Dosage des bioptérines urinaires et de l'activité de la dihydroptéridine réductase (DHPR) sanguine pour dépister un déficit du métabolisme du BH4.
  - Bilan hépatique et chromatographie des acides aminés plasmatiques pour éliminer les autres causes d'hyperphénylalaninémie.
  - Test au BH4 si le taux de PHE de contrôle est supérieur à 8 mg/dl (480 µmol/l)
     [23]

Pour tout enfant dépisté, on doit se préoccuper du statut de sa fratrie et prévoir un dosage de PHE aux membres de cette fratrie qui n'auraient pas bénéficié d'un dépistage néonatal.





# 3.1.7.2 Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel se pose essentiellement devant un dépistage positif, c'est-à-dire un taux de Phe  $\geq$  3 mg/dl. Il y a un certain nombre d'hyperphénylalaninémies secondaires qu'il faut identifier :

- Hyperphénylalaninémie transitoire (prématuré +++) ;
- Avec hypertyrosinémie :
  - Augmentation de la prise alimentaire de protéine ;
  - Maladie hépatique (incluant la galactosémie et la tyrosinémie).
- Sans hypertyrosinémie
  - Secondaire à un médicament (trimethoprime, anti foliques);
  - Maladie inflammatoire sévère ;
  - Maladie rénale[24].

# 3.1.8 Génotypage

La PCU est une affection héréditaire transmise sur le mode autosomique récessif. Le gène de la PAH est situé sur le chromosome 12 en 12q24.1. Environ 500 mutations différentes ont été décrites avec une corrélation génotype/phénotype imparfaite.

L'identification des mutations du gène de la PAH des patients ayant une PCU a deux intérêts :
le premier est de pouvoir effectuer une corrélation génotype/phénotype dans la mesure où l'enfant est porteur de mutations dont l'effet sur le phénotype est connu.

• le second intérêt est lié à l'analyse du caractère BH4-sensible dont on sait qu'il est lié à certaines mutations dont la liste se constitue progressivement [20].

# 3.1.9 Traitement

La prise en charge des enfants atteints de PCU vise à garder les taux de Phe plasmatique entre 2-5mg/100ml.

Le régime alimentaire est un élément essentiel de cette prise en charge et peut être associé à un traitement médicamenteux[23].

# 3.1.9.1 Traitement diététique

Le but du traitement diététique est d'équilibrer les taux sanguins en Phe en limitant les apports alimentaires de cet acide aminé essentiel aux besoins nécessaires pour couvrir le métabolisme protéique endogène (sachant qu'en dessous de ce taux nécessaire, le patient serait en

# PARTIE THEORIQUE CHAPITRE I : PHENYLALANINE ET TYROSINE

dénutrition protéique ce qui stopperait sa croissance). Or, chaque patient phénylcétonurique possède sa propre tolérance en Phe (qui dépend de l'activité enzymatique résiduelle, de la qualité de sa croissance et de son anabolisme protéique) dont le régime doit tenir compte[23].

#### 3.1.9.2 Traitements médicamenteux

- La saproptérine dihydrochloride

Il s'agit de la tétrahydrobiopterine (BH4) qui est une forme galénique du coenzyme naturel de la PAH.

- Les acides aminés neutres

La Phe fait partie du groupe des acides aminés neutres qui ont la particularité de traverser les barrières intestinale et hémato-encéphalique par un transporteur commun, L'administration des acides aminés neutres (sans Phe) permet donc, par inhibition compétitive, de bloquer l'absorption digestive de la Phe et secondairement d'inhiber le passage cérébral de la Phe plasmatique. Par ailleurs, la Tyr et le tryptophane étant des acides aminés neutres précurseurs des neurotransmetteurs, leur administration en quantité importante, permettrait de rétablir la synthèse de dopamine et de sérotonine au niveau cérébral[31].

- Autres traitements

Plusieurs autres approches thérapeutiques sont actuellement en cours d'étude comme l'enzymothérapie substitutive, les glycomacropeptides ,les molécules chaperonnes et la thérapie génique [32].

#### 3.1.10 Suivi des patients PCU

La qualité nutritionnelle du régime instauré aux patients PCU n'est pas optimale. Il est donc nécessaire d'assurer une surveillance clinique et biologique[23].

- Surveillance biologique

Les contrôles de Phe restent bimensuels jusqu'à l'âge de cinq ans, mensuels entre cinq et dix ans, puis trimestriels jusqu'à la fin de la croissance (15/16 ans), annuels ensuite. Un bilan nutritionnel biologique avec aminogramme, bilan martial, dosage de vitamines B12 et A, bilan lipidique, dosage d'oligoéléments (Sélénium, Zinc), carnitine et bilan phosphocalcique est effectué tous les deux à trois ans[33].

- Surveillance clinique.

# PARTIE THEORIQUE CHAPITRE I : PHENYLALANINE ET TYROSINE

Les enfants sont vus en consultation pluridisciplinaire au minimum deux fois par an jusqu'à l'âge de dix ans, tous les ans ensuite[33].

- Surveillance psychométrique.

Plusieurs méthodes d'évaluation sont recommandées selon l'âge du patient et son niveau scolaire afin de dépister les troubles de l'apprentissage et la mise en place de moyens rééducatifs en cas de constatation de difficultés, et ce avant l'échec scolaire[33].

- Suivi de la femme enceinte :

La grossesse chez la femme PCU est très importante à suivre, car il existe un risque majeur d'embryofoetopathie, avec retard de croissance intra-utérin, cardiopathie, microcéphalie et retard mental. Grace à la reprise d'un régime strict normalisant parfaitement le taux sanguin de PHE dès la période préconceptionnelle et durant toute la grossesse, on supprime les risques de malformations[7,31].

- Pronostic

Le pronostic des patients est excellent lorsque le traitement est débuté dès que le diagnostic est confirmé après le dépistage néonatal systématique et lorsque le traitement et la surveillance sont maintenus au long cours.

Les patients porteurs d'HMP ont un devenir normal et ne nécessitent pas de traitement tant que les taux de Phe restent inférieurs à 10 mg/dl (600 µmol/l)[23].

# 3.2 Tyrosinémie

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

Il existe plusieurs types de tyrosinémie présentant des symptômes distinctifs et causé par la déficience d'une enzyme différente. Tyrosinémie type I est la plus fréquente, type II et type III plus rares[23].



#### Figure 6:Différents types de tyrosinémie[23].

#### 3.2.1 Tyrosinémie type I

#### 3.2.1.1 Définition

La tyrosinémie type 1 (HT1) est une maladie métabolique héréditaire à transmission autosomique récessive, caractérisée par une élévation de la concentration de la Tyr et de ses métabolites (ex. : succinylacétone qui est un signe pathognomonique de la maladie) dans le sang et l'urine. Cette maladie est due à une mutation responsable d'un déficit de l'activité de l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase (FAH) qui catalyse la dernière étape de la dégradation de la Tyr, cette enzyme est exprimée abondamment dans le foie et les reins, ce qui explique la symptomatologie qui est principalement hépatique et rénale[34].

#### 3.2.1.2 Génétique

Les chercheurs ont identifié plus de 40 mutations FAH qui causent une tyrosinémie de type I. Le gène FAH altéré ; produit une enzyme instable ou inactif, ce qui entraîne une activité hydrolase d'acide fumarique réduite ou absente.

Le gène FAH est situé sur le bras long (q) du chromosome 15 entre les positions 23 et 25. Plus précisément, de la paire de bases 78 232 395 à la paire de base 78 265 736[35].



Figure 7: Localisation du gène de la FAH[35].

#### 3.2.1.3 Clinique

HT1 est cliniquement hétérogène. Les symptômes peuvent commencer au cours des premiers mois (type aigu), au deuxième semestre de la première année (type subaigu) ou dans les années suivantes jusqu'à l'âge adulte (type chronique) [36].

#### • Forme aigue

L'affection débute entre 15 jours et 3 mois avec des manifestations de l'insuffisance hépatique prédominantes : le syndrome de nécrose hépatocellulaire associe des vomissements, une diarrhée, un ictère, une hypoglycémie, des œdèmes, une ascite et un syndrome hémorragique, avec une complication septicémique fréquente et une tubulopathie légère[36].

#### • Forme subaiguë

Se manifeste par un tableau clinique similaire, mais moins sévère, qui se présente généralement avec une hépatomégalie ou un rachitisme hypophosphatémique (due à un dysfonctionnement tubulaire) avec des crises hépatiques[37].

#### • Forme chronique

Plus tardive, est toujours caractérisée par une atteinte hépatique chronique avec cirrhose et risque très élevé de dégénérescence maligne. L'atteinte rénale est variable : le patient peut ne présenter qu'une tubulopathie modérée.

A l'autre extrémité du spectre, on trouve des patients en insuffisance rénale sévère. Le rachitisme hypophosphatémique est une complication de la tubulopathie. Plus rarement on

# PARTIE THEORIQUE CHAPITRE I : PHENYLALANINE ET TYROSINE

observe une cardiomyopathie et/ou des crises neurologiques de type porphyrie : paresthésies douloureuses et troubles neurovégétatifs, suivis parfois de paralysies, convulsions, automutilation, paralysie des muscles respiratoires et décès[26].

#### 3.2.1.4 Diagnostic

Le dépistage repose principalement sur le dosage de la Tyr et de ses métabolites contenus dans un échantillon sanguin prélevé entre 24 et 36 heures de vie et séché sur un papier buvard ou sur d'autres types de prélèvements ( sérum, plasma, urines )[10,34].

#### 3.2.1.4.1 Les analyses de base

L'atteinte hépatique : les marqueurs d'atteinte hépatique sont souvent anormaux aussi bien dans sa forme aiguë que chronique. On trouve généralement, une hypoalbuminémie, hyperbilirubinémie, une hypoglycémie, diminution des facteurs de coagulation et augmentation des transaminases.

L'atteinte rénale : on observe une hypophosphatémie, une hyperphosphaturie, une glycosurie,

et une acidose métabolique[38].

#### 3.2.1.4.2 Les analyses spécifiques

Le diagnostic est basé sur l'analyse des acides aminés dans le plasma, des acides organiques dans l'urine et éventuellement une détermination enzymatique.

- Analyse sanguine
  - Hypertyrosinémie et hyperméthioninémie
  - Présence de succinylacétone :pathognomonique [38]



Figure 8 : Etapes de la formation de la succinylacétone[39].
- Analyse urinaire
- Présence d'acide organique dans les urines : dérivé des 4-hydroxyphényl (phényle pyruvique, phényle acétique et phényle lactique)[38].



#### Figure 9 : Formation des dérivés de 4-hydroxyphényl[38].

- Présence de succinylacétone
- Présence de delta-aminolévulinate. Ceci est causé par l'inhibition de l'enzyme deltaaminolévulinate-hydratase par le succinylacétone



#### Figure 10: Blocage de la PBG-S[38].

- Détermination enzymatique
  - Le déficit en FAH a été constaté dans les lymphocytes et les fibroblastes en culture, dans le foie et les reins.
  - Ralentissement de l'activité de porphobilinogène synthase (PBG-S) ou d'aminolévulinique déshydratase (ALAD) dans les érythrocytes[38].

#### 3.2.1.4.3 Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal est possible :

- Par le dosage de la succinylacétone dans le liquide amniotique
- Par l'étude enzymatique FAH sur les villosités chorioniques[38]

#### 3.2.1.4.4 Génotypage

Des études génétiques moléculaires peuvent être nécessaire pour le conseil , le diagnostic prénatal et le dépistage familial[40].

#### 3.2.1.5 Prise en charge

Le traitement consiste en un régime restrictif sévère associé à l'administration d'un inhibiteur du 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase et éventuellement, dans certains cas, une greffe de foie[1].

#### 3.2.1.5.1 Régime alimentaire

La Tyr n'est pas acide aminé essentiel, elle est produite par l'hydroxylation de la Phe. La restriction en AA portera autant sur la Phe que sur la Tyr.

Le régime doit donc comporter un apport restreint en protéines naturelles :

• Vise à maintenir les concentrations de Tyr plasmatique < 400 µmol/L ;

• Restreint en protéines naturelles de façon drastique :

5 g (chez le nouveau-né) puis augmentation progressive jusqu'a 20-25 g par jour (chez l'adolescent) et l'utilisation de mélanges d'acides aminés sans Phe ni Tyr :

1 à 0,5 g d'AA/kg/jour pour assurer un apport protéique suffisant à la croissance et la couverture des besoins nutritionnels en vitamines et minéraux.

Ce régime doit être poursuivi à vie.

La tolérance protidique est variable selon chaque enfant et selon la sévérité de la maladie [7].

#### 3.2.1.5.2 Traitement médicamenteux (la nitisinone)

Il s'agit d'un inhibiteur de la 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase, qui crée un bloc en amont du déficit enzymatique, et évite l'accumulation des composés toxiques (fumarylacétone et maléylacétone) pour le foie et le rein. Il entraine cependant une accumulation de Tyr en amont de ce bloc, moins toxique. Le taux de Tyr doit être maintenu en dessous d'un seuil défini, < 400  $\mu$ mol/L, en l'absence de recommandations précises[7,41].

#### 3.2.1.5.3 Transplantation hépatique

La transplantation hépatique chez l'enfant atteint d'une maladie métabolique démontre d'excellents résultats cliniques et biochimiques à long terme et une excellente qualité de vie pour la plupart des receveurs[34].

#### 3.2.2 Tyrosinémie de type II

La tyrosinémie de type II est une aminoacidopathie parfaitement traitable, liée à un déficit en tyrosine aminotransférase hépatique responsable de l'accumulation de Tyr dans l'organisme. Ce déficit entraine une atteinte oculaire (larmoiement, photophobie, kératite) et une atteinte cutanée (lésions érosives palmo-plantaires très douloureuses). Un retard mental peut être associe. Il n'existe pas d'épisodes de décompensation aigue[7].

Elle doit être suspectée devant toute kératite dendritique ne répondant pas au traitement antiviral, a fortiori si elle s'accompagne d'une atteinte cutanée type kératodermie palmoplantaire. Le diagnostic peut être confirmé par un taux élevé de Tyr au niveau du sérum et des urines. Le dépistage chez les frères et sœurs est indiqué même en absence de signes cliniques. Le diagnostic précoce permet l'instauration d'une alimentation pauvre en Tyr et en Phe dès l'enfance, seule thérapie actuellement efficace permettant un développement intellectuel normal[42].

#### 3.2.3 Tyrosinémie de type III

La tyrosinémie de type 3 (HT3) est une erreur innée rare du métabolisme de la Tyr causée par des mutations dans le gène HPD Codant pour la 4-hydroxyphényl-pyruvate dioxygénase, qui est transmise d'une façon autosomique récessif. Le trouble est caractérisé par l'accumulation de Tyr dans les fluides corporels et l'excrétion massive de dérivés de la Tyr dans l'urine. Les manifestations cliniques sont variables et léger voir asymptomatique en raison de l'inhibition de la deuxième étape de la dégradation de la Tyr[12,43].

# **Chapitre II**

# Validation analytique

#### 1 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 ( $\lambda$ ) qui peut être variable selon les exigences de l'analyste (et/ou du client) 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 lequel 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 les protocoles de validation avec critères, en essayant de garantir la qualité des résultats ultérieurs avec un risque connu prédéfini en fonction de la finalité de la méthode d'analyse à valider[44].

#### 1.1 Cycle de vie d'une méthode analytique

La vie d'une méthode d'analyse est un processus évolutif qui suit les différentes étapes pouvant être représentées par un cycle:



Figure 11 : Cycle de vie d'une méthode analytique[45].

Les principales étapes de ce cycle sont les suivantes :

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

À l'issue de ces étapes, l'utilisation en routine de la méthode peut être envisagée (étape 5). La revue périodique de la méthode peut donner lieu à un besoin de revalidation ou d'un nouveau développement[46].

#### 1.2 Contexte réglementaire

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ICH, notamment le guideline ICH Q2 (R1) paru en 2005 : « Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology ». Son but est de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique

Il existe également des publications, comme les guides de validation analytique de la SFSTP : -SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP »

- Partie I. Méthodologie. En 1992 ;
- Partie II. Exemples d'application. En 1992 ;

-SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP ». En 1997 ;

-SFSTP «Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches»

- Partie I. Généralités, en 2003 ;
- Partie II. Statistiques, en 2006 ;
- Partie III. Exemples d'application, en 2006.

#### 2 Validation

#### 2.1 Définition

La clause 5.4.5.1.de la norme ISO 17025 :2005 définit ainsi la validation :

« La validation est la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies »[47].

#### 2.2 Critères de validation

La validation analytique d'une méthode correspond à l'étude de plusieurs critères de validation définis ci-après[48].

#### 2.2.1 La limite d'acceptabilité

La limite d'acceptabilité d'une méthode sert à chiffrer ses objectifs. Il s'agit d'une valeur seuil globale exprimée le plus souvent sous forme de pourcentage, fixée de préférence par l'utilisateur du résultat[48].

#### 2.2.2 L'intervalle de confiance (IC)

L'intervalle de confiance déterminé au risque  $\alpha$  % est un intervalle de valeurs qui a (1- $\alpha$ ) % de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé : par exemple, l'intervalle de confiance déterminé au risque de 5% à 95% de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé[48].

#### 2.2.3 L'intervalle de tolérance

C'est l'intervalle dans lequel on s'attend à avoir une proportion ( $\beta$ %) des futurs résultats[48].

#### 2.2.4 La spécificité ou sélectivité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser en présence d'autres composés potentiellement présents[49].

#### 2.2.5 La fonction de réponse

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans un échantillon [49].

#### 2.2.6 La linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à prédire des concentrations retrouvées proportionnelles aux concentrations théoriques d'une série d'échantillons [49].

#### 2.2.7 La justesse

La justesse d'une méthode exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme vraie, soit comme valeur de référence, et la valeur trouvée [50].

#### 2.2.8 La fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle est exprimée en termes de coefficient de variation à partir d'une série de mesures.

La fidélité peut être évaluée à trois niveaux :

- La répétabilité exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps ;
- La fidélité intermédiaire exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents...;
- La reproductibilité exprime la fidélité inter-laboratoire [50].

#### 2.2.9 L'exactitude

L'exactitude d'une méthode combine justesse et fidélité d'un mesurage [50].

#### 2.2.10 La limite de détection

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure [50].

#### 2.2.11 La limite de quantification

C'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie [49].

#### 2.2.12 Le profil d'exactitude

Combinaison, sous une forme graphique, d'un ou plusieurs intervalles de tolérance d'espérance  $\beta$  calculés à différents niveaux de concentration et d'un ou plusieurs intervalles d'acceptabilité $\lambda$ [51].

#### 2.2.13 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 dans les conditions normales d'utilisation [49].

#### 2.3 Objectifs d'une validation analytique

L'objectif d'une validation est de pouvoir donner au laboratoire et aux autorités réglementaires la garantie que chaque résultat Z qui sera obtenu dans le futur par la méthode d'analyse sera suffisamment proche de la vraie valeur X de l'échantillon à doser.

Dans cette définition le terme « suffisamment proche » impose en premier lieu de choisir la limite d'acceptabilité qui correspond à l'écart maximum  $\lambda$  accepté entre le résultat *Z* obtenu par la méthode d'analyse et la valeur de référence *X* acceptée comme valeur vraie.

$$|X-Z| < \lambda$$

La limite d'acceptabilité  $\lambda$  doit être fixée en fonction des exigences réglementaires, et en fonction des performances de la méthode, en particulier de son incertitude.

Pour apporter les garanties que l'équation soit vérifiée, il faut que la probabilité que  $|X - Z| < \lambda$  soit supérieure ou égale à une valeur minimale  $\beta$  Pr( $|X - Z| < \lambda \ge \beta$ [50].

#### 2.4 Choix du protocole de validation

Le logigramme de la figure 12 présente la démarche proposée par le SFSTP pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve.



Figure 12 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation[48].

Tableau III : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction
du protocole choisi[48].

Standards	Niveau de			Protocole		
	concentration	V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage	Bas		2		2	
sans la matrice	Médian	2	2 <sup>(1)</sup>	2	2 <sup>(1)</sup>	
	Haut	2 <sup>(2)</sup>	2	2 <sup>(2)</sup>	2	
SE. Etalonnage	Bas				2	2
avec la matrice	Médian			2	2 <sup>(2)</sup>	2 <sup>(2)</sup>
	Haut			2 <sup>(1)</sup>	2	2
	Addit.					2 <sup>(3)</sup>
SV. Validation	Bas	3	3	3	3	3
avec la matrice	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min.)		33	45	39	63	45

### PARTIE THEORIQUE

1Suppression possible du niveau de concentration médian pour l'étalonnage sur la base du modèle de régression retenu pour exprimer la fonction de réponse (exemple : modèle plus simple comme le modèle mathématique des moindres carrés). Dans ce cas, le nombre total est de 39 essais pour les protocoles V2 (sans matrice) et V5 (avec la matrice). Le nombre d'essais est de 51 pour le protocole V4.

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

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

Le tableau présente les types de standards (SE et SV) ainsi que les niveaux de concentration à utiliser en fonction du protocole de validation choisi. Il présente également, selon le protocole choisi, le nombre total d'essais à réaliser pour valider la procédure analytique concernée. Il est important d'insister sur le fait qu'il s'agit de protocoles minimaux construits en fonction de contraintes réglementaires[48].

#### 2.5 Démarches statistiques

#### 2.5.1 Spécificité

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

- ✓ Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des quatre solutions suivantes :
  - Le diluant (solution des standards sans matrice).
  - Une solution placebo (matrice)
  - Une solution standard à 100% préparée dans le diluant.
  - Une solution d'échantillon à 100% préparée dans la matrice.

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

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

La comparaison des droites est basée sur le test  $\mathbf{t}$  de Student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage de la substance seule et avec matrice[48].

#### 2.5.2 Fonction de réponse

La majorité des méthodes d'analyse quantitatives ne mesure pas directement une quantité absolue de l'analyte recherché, mais procède indirectement par comparaison avec une quantité connue de l'analyte. La validation de ces méthodes comporte donc nécessairement une étape d'étalonnage, qui consiste à construire un modèle permettant de prédire la concentration inconnue d'échantillons, par analogie avec des concentrations connues des solutions d'étalonnage.

En pratique, l'étalonnage est réalisé à partir de solutions de témoin de pureté connue, préparées à des concentrations connues, et appelées Standards d'Etalonnage (SE).

L'analyse de ces SE va donner une réponse observée mesurée par l'appareillage[48].

#### 2.5.2.1 Calcul du modèle d'étalonnage

Les mesures effectuées sur les SE 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 :  $\varepsilon$ , 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  $\varepsilon$  soit minimisée.

La procédure SFSTP 2003-2006 propose d'appliquer le concept de « fitness-for purpose» pour choisir la fonction de réponse la mieux adaptée pour la courbe d'étalonnage, et ainsi avoir un modèle d'étalonnage permettant de minimiser  $\varepsilon$  et donc de calculer les concentrations prédites les plus correctes possibles[52].

Tableau IV : Quelques exemples des différentes fonctions de réponse pou	ıvant être
envisagées lors d'une validation de méthode analytique[48].	

Туре	Equation	Paramètre	Linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	Pente <sup>β</sup>	Oui
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	Ordonnée à l'origine α Pente β	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α, β, γ	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^{\beta}}$	α, β, γ, δ	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left[ \left( \frac{x}{\gamma} \right)^{\beta^{\Psi}} \right]}$	α, β, γ, δ, Ψ	Non

Les modèles d'étalonnage vont être calculés pour chaque série de validation, et le calcul des concentrations prédites *X* des solutions d'échantillon, appelées Standards de Validation (SV) devra être effectué en utilisant le modèle d'étalonnage de la série correspondante[53].

Des transformations mathématiques sont également envisageables. Par exemple, le logarithme népérien ou la racine carrée pourrait être appliqué à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y. Il est cependant recommandé de n'appliquer ce type de transformation qu'avec les modèles linéaires[48].

#### 2.5.2.2 Ajustement des fonctions de réponse

#### 2.5.2.2.1 Fonctions linéaires

Dans une gamme de concentration, la variance des réponses peut varier en fonction de la concentration, d'autant plus que l'intervalle de gamme est important. On dit alors que la variance n'est pas homogène.

Afin de palier à cette hétérogénéité deux approches sont possibles : la pondération ou la transformation des données[48].

#### - Transformation des données

La transformation des données permet de stabiliser la variance. Les plus utilisées sont les logarithmes ou les racines carrées.

Les techniques de régression sont alors utilisées comme pour une régression classique, en particulier l'utilisation des moindres carrés. L'observation des résidus doit montrer une stabilisation des variances. Dans ce cas le modèle de fonction de réponse utilisée en routine implique de transformer les réponses avant de calculer les concentrations en retour[54].

#### - Pondération

Pour chaque niveau de concentration d'un intervalle de dosage, la variance n'est pas proportionnelle à la concentration. Ceci implique de donner un poids à chaque niveau de concentration pour corriger le manque de proportionnalité.

Les choix de pondération habituels qui permettront de prendre en compte l'influence de la variance sont w = 1/X ou  $w = 1/X^2$ . Notons que si w = 1, cela est équivalent au cas sans pondération[54].

#### 2.5.2.2.1.1 Estimation des paramètres

Les paramètres des fonctions de réponse vont être estimés soit par la méthode des moindres carrés classique, soit par la méthode du maximum de vraisemblance, comme recommandé dans la procédure SFSTP 2003-2006.

#### - Méthode des moindres carrés classique

Cette méthode de calcul consiste à estimer les paramètres de la droite d'étalonnage en minimisant la somme des différences entre les valeurs observées et les valeurs prédites.

Les résidus pouvant être positifs ou négatifs, ils sont élevés au carré pour le calcul de leur somme afin d'éviter leur contrebalancement.

L'équation de la droite pour laquelle la somme de ces carrés est minimale permet d'obtenir des valeurs prédites au plus proche des vraies valeurs[55].

#### - Méthode du maximum de vraisemblance

Le protocole SFSTP 2003-2006 recommande d'estimer les paramètres du modèle d'étalonnage en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance. L'estimation par maximum de vraisemblance repose sur la notion de vraisemblance d'un ensemble donné

d'observations relatives à un modèle. Dans le cadre d'un étalonnage, cette méthode consiste à trouver les paramètres permettant de maximiser la fonction de vraisemblance associée au modèle d'étalonnage, qui représente la vraisemblance d'avoir obtenu les données générées.

Les prérequis de cette méthode sont d'une part la normalité de la réponse à chaque niveau de concentration, et d'autre part l'homogénéité des variances ou homoscédasticité.

Cependant, comme spécifié dans le protocole SFSTP 2003-2006, un modèle d'étalonnage fournissant de bons résultats sera préféré à un modèle ayant de bonnes qualités d'ajustement, même si les prérequis ne sont pas respectés[50].

#### 2.5.2.2.1.2 Erreur résiduelle et coefficient de détermination

En complément des paramètres de la fonction d'étalonnage, on peut obtenir d'autres statistiques, en particulier l'écart-type résiduel, Cet écart-type permet d'évaluer la qualité de l'ajustement car il indique l'étroitesse de l'ajustement entre la droite calculée et les points expérimentaux.

Les variances résiduelles sont estimées pour chaque niveau de concentration, après alignement des valeurs [47,50].

$$\widehat{\sigma_J^2} = \frac{1}{\sum_{k=1}^p n_{ij} - p} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} (y_{ijk,c} - \overline{y_{j,c}})^2$$

La norme ICH Q2 (R1) demande également de calculer le coefficient de détermination  $R^2$  de la droite pour évaluer la qualité de l'ajustement par série. Ce coefficient exprime la partie de la variance totale des réponses expliquée par le modèle. Il n'est cependant pas approprié, et un coefficient de type  $R^2$ >0,99 n'est pas un gage de qualité des résultats qui seront obtenus[56].

#### 2.5.2.2.2 Fonctions non linéaires en leurs paramètres

Pour ces fonctions, l'ajustement est plus difficile car la maximalisation de la fonction de vraisemblance ne donne pas de solutions analytiques. Ce cas requiert des valeurs initiales des différents paramètres et l'utilisation de méthodes itératives pour obtenir des estimations[50].

#### 2.5.3 Alignement des observations

Si pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire). Cela

consiste à transformer les réponses observées (yijk  $\rightarrow$  yijk,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.[50]

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

 $y_{ijk.c=y_{ijk}+f(\overline{x_{ij}})-f(x_{ijk})}$ 

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse : [50]

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

Tableau V : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses[50].

#### 2.5.4 Prédiction inverse

Après collecte des données, et détermination du modèle d'étalonnage le mieux adapté à la méthode, on utilise la fonction inverse du modèle d'étalonnage pour transformer les réponses mesurées en concentrations calculées pour chaque mesurage.

Ce calcul s'effectue indépendamment pour chaque série de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant :

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

Le tableau fournit ces équations selon la fonction d'étalonnage choisie :

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les  $y_{ijk}$  par  $y_{ijk,c}$  dans le tableau précédent. Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse après ce calcul en retour[50].

Tableau VI : Calcul de	prédictions inverses	pour différentes	fonctions de	réponses[50].
------------------------	----------------------	------------------	--------------	---------------

Types de fonction	Equation
Droite passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \widehat{\alpha}_i}{\widehat{\beta}_i}$
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	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left( \left( \frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\widehat{\varphi}_i}} \right)^{\frac{1}{\widehat{\beta}_i}}$

#### 2.5.5 Calcul de la justesse et de la fidélité

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 :

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

 $x_{ijk}$ :Est la k-ième concentration calculée du niveau j de la i -ème série,

 $\mu_i$ :Est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j,

 $\alpha_{ij:}$ Est au niveau j l'écart entre la moyenne de la i -ème série et la moyenne  $\mu_j$ 

 $\varepsilon_{ijk}$ . Est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire indépendante de la série.

Les variances  $\sigma_{bj}^2$  et  $\sigma_{wj}^2$  représentent les variances inter-série et intra-série, respectivement.

#### PARTIE THEORIQUE

La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres,  $\mu_j$ ,  $\sigma^2_{bj}$  et  $\sigma^2_{wj}$  du modèle.

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

$$MSM_{j} = \frac{1}{p - 1} \sum_{i=1}^{p} n_{ij} \left( \bar{x}_{ij,cal} - \bar{x}_{j,cal} \right)^{2}$$

$$MSE_{j} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{p} n_{ij} - p} \sum_{i=1}^{p} \sum_{K=1}^{n_{ij}} \left( x_{ijk,cal} - \bar{x}_{ij,cal} \right)^{2}$$

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

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

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

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

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

L'estimation de la fidélité d'une méthode peut être effectuée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité

Le traitement statistique des données consiste à utiliser une méthode appelée analyse de la variance à un facteur (ANOVA). Elle permet de décomposer la variance totale de toutes les mesures toutes séries confondues, ou variance de fidélité intermédiaire – en une variance intra-série et une variance inter-série.

Une fois l'analyse ANOVA réalisée, deux conclusions sont envisageables. Soit l'hypothèse nulle est confirmée, et il n'y a alors pas de différence significative entre les séries, soit l'hypothèse alternative est confirmée, et une différence significative est établie[47,50].

#### 2.5.5.1 Justesse d'une méthode

La justesse est obtenue en calculant la différence entre la moyenne des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Cette différence peut être exprimée de plusieurs façons.

Tableau VII : Différentes façon du calcul de la justesse[57]

Type de biais	Formule de calcule
Biais absolu	$\text{biais}_j = \bar{\widehat{\mu}}_j - \overline{x}_j$
Biais relatif	$biais(\%)_j = \frac{\bar{\hat{\mu}}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \times 100$
Taux de recouvrement	Recouvrement (%) <sub>j</sub> = $\frac{\overline{\mu}_j}{\overline{x}_j} \times 100$

Où :

 $\overline{\hat{\mu}}_{i}$ : Moyenne des concentrations calculées du niveau j.

 $\bar{xj}$ : Moyenne des concentrations introduites du niveau j[57]

#### 2.5.6 Calcul de l'exactitude

L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui de la méthode analytique) exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure :[57]

Exactitude	Formule de calcul
Exactitude	$x-\mu$
Exactitude (%)	$\frac{x-\mu}{\mu}  imes 100$

#### 2.5.7 Erreur totale et profil d'erreur totale

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

$$x = \mu + |biais|_{procédure} + fidélité intermédiaire_{procédure}$$

$$x - \mu = |biais|_{procédure} + fidélité intermédiaire_{procédure}$$

 $x - \mu = erreurtotale_{procédure}$ 

L'Erreur Totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Donc l'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode[57].

Cette erreur totale, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. Elle reflète les plus grandes erreurs auxquelles on peut s'attendre dans la plupart des cas[57].

#### 2.5.8 Calcul de l'intervalle de tolérance

Il s'agit d'un intervalle dans lequel on est capable de prédire que se trouve en moyenne une proportion connue de mesures. Cet intervalle peut être calculé de plusieurs façons, et la commission SFSTP a retenu la méthode de calcul proposée par Mee

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

$$\left[biais(\%)_{j}-Q_{t}\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{pnB_{j}^{2}}}CV_{FIJ};biais(\%)_{j}+Q_{t}\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{pnB_{j}^{2}}}CV_{FIJ}\right]$$

Les coefficients intervenant dans cette formule sont calculés comme suit :

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

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

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

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

**n** : nombre de répétitions

**p** : nombre de séries

Dans le calcul du facteur de couverture de l'intervalle de tolérance, la quantité  $Q_t(v; \frac{1+\beta}{2})$  représente le quantile de la distribution *t* de Student pour la probabilité  $t\frac{1+\beta}{2}$  et *v* degrés de liberté[57].

#### 2.5.9 Le profile d'exactitude

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

$$L_{j}(\text{borne superieure}) = biais(\%)_{j} - Q_{t}\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_{j}^{2}}CV_{FI,j}}$$
$$U_{j}(\text{borne inferieure}) = biais(\%)_{j} + Q_{t}\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_{j}^{2}}CV_{FI,j}}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes  $L_j$  entre elles  $(L1 \rightarrow L2 \rightarrow ... \rightarrow L_m)$  et d'autre part les bornes  $U_j$  entre elles  $(U1 \rightarrow U2 \rightarrow ... \rightarrow U_m)$ [57].

#### 2.5.10 Linéarité

L'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentration calculée = f (concentrations

Introduite)), pas aux réponses (signal = f (concentrations introduites)). C'est un pré requis à l'estimation de la justesse. A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste[50].

#### 2.5.11 Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles des mesures attendues, permet 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 (LLOQ) et haute (ULOQ) 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[46].

# Partie pratique

# Matériels et méthode

Phe et Tyr sont responsables successivement de la PCU et de la Tyrosinémie, deux maladies métaboliques dont le diagnostic précoce permet d'éviter des séquelles très graves chez les enfants atteints.

C'est ce qui nous a inspiré pour développer et valider une méthode de dosage simultané de ces deux AA par chromatographie liquide haute performance HPLC dans le plasma et contribuer au diagnostic néonatal.

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

#### 1 Matériels et méthode

#### 1.1 Matériels

#### ✓ Matériels consommables, verreries et autres

#### Tableau IX : Matériels utilisés dans le présent travail

	• Pipettes jaugées de 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 15ml et 20ml;			
Verreries	• Fioles de 10ml, 20ml, 25ml, 100ml et 2L ;			
	• Béchers ;			
	Eprouvette de 100ml			
	• Micro seringue de 50µl ;			
	• Verres à montre ;			
	• Entonnoir ;			
	• Vials			
	• Tubes à essai;			
Consommables	• Embouts bleus et jaunes ;			
	• Papiers filtre millipores ;			
	• Gants.			

	• Poire ;
	• Pissettes ;
	• Spatules ;
	• Portoirs ;
Autres	• Comptes gouttes ;
	• Micropipette 1ml;
	• Barreau magnétique ;
	• Bavettes ;
	• Flacons pour phase mobile.

### ✓ Matières premières

## Tableau X : Matières premières utilisées dans le présent travail.

Matières premières	Provenance Données physicochimiques		
L-Phénylalanine ;	SIGMA-ALDRECH	N° CAS :63-91-2 Formule brute: C9H11NO2 M <sup>r</sup> :165.19 Pureté: ≥99%	
L-Tyrosine	BIOCHEM Chemopharma	N° CAS :60-18-4 Formule brute : C9H11NO3 M <sup>r</sup> :181.19 Pureté :≥98.5%	
N –méthyl- phénylalanine hydrochloride	SIFMA-ALDRECH	N° CAS :66866, Formule brute :C₁9H₁3NO2 ECH M <sup>r</sup> :215.68 Pureté : ≥98%	
Albumine humaine 20%	Biotest	1	

## ✓ Les réactifs

Les réactifs	Provenance	Données physicochimiques	
Dihydrogénophosphate de potassium	Fluka Chemika	N° CAS : 7778-77-0 Formule brute: $KH_2PO_4$ $M^r$ : 136.09 Pureté : > 99%	
Acide trichloracétique	SIGMA ALDRICH	$N^{\circ}$ CAS : 76-03-9 Formule brute: $C_2HCl_3O_2$ $M^r$ : 163.39 Pureté : > 99%	
Acide chlorhydrique	SIGMA ALDRICH	Formule brute : HCl N° CAS : 7647-01-0 $M^{r}$ : 36,46 g/mol $\rho$ : 1,19 g / cm <sup>-3</sup>	
Méthanol grade HPLC	BIOCHEM Chemopharma	Formule brute : CH <sub>4</sub> O N° CAS : 67-56-1 M <sup>r</sup> : 32,04 g/mol $\rho$ : 0,79 g / cm <sup>-3</sup>	
Acétonitrile grade HPLC	BIOCHEM Chemopharma	Formule brute : $C_2H_3N$ N° CAS : 75-05-8 M <sup>r</sup> : 41,05 g/mol $\rho$ : 0,8g / cm <sup>-3</sup>	
Eau distillée	Préparée avec le distillateur LAB-TECH	Formule brute : H2O N° CAS : 7732-18-5 Mr : 18 g/mol <b>ρ</b> : 1 g / cm-3	

# Tableau XI : Réactifs utilisés dans le présent travail.

#### ✓ Appareillage

Désignation		Spécification	Usage	
HPLC	Pompe	Lc20 at.		
(SHIMADZU LC20)	Injecteur automatique	SIL 20 A		
	Contrôleur	CBM-20		
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	Séparation et dosage	
	Colonne	C8 (15 cm)		
	Détecteur	Spectrophotomètre		
		UV visible		
	Logiciel d'exploitation	LC-solution		
Distillateur		Lab-Tech	Production de l'eau distillée	
Pompe à vide		Fisher bioblock scientific Pmax = 4 bar	Filtration de la phase mobile	
Sonicateur		Advantage-LAB	Solubilisation	
Agitateurs magnétique		NAHITA ModeL690-1	Homogénéisation des solutions	
Balances analytiques		KERN	Pesée	
		METLER TOLEDO		
Centrifugeuse		Hettich-EBA20	Centrifuger	
Vortex		IKA MS digital	Agitation des échantillons	
Etuve		MEMMERT	Séchage de la verrerie	

#### 1.2 Méthode

#### 1.2.1 Le principe de la méthode

La méthode consiste à séparer la Tyr et la Phe présentes dans un plasma hépariné déprotéinisé avec le TCA par HPLC et les quantifier par un détecteur fluorimétrique en présence d'un étalon interne la N- méthyl L-phénylalanine hydrochloride.

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

#### 1.2.2 Choix des paramètres de validation

#### ✓ Le choix du plan d'expérience

Afin de valider la technique de dosage plasmatique de Phe et de Tyr par HPLC nous avons suivi le logigramme de la SFSTP permettant de sélectionner le protocole de validation et vu la non connaissance préalable de la procédure de dosage et la possibilité de la présence d'un effet matrice et que l'étalonnage ne se fait pas à un seul point nous avons opté pour le protocole V4 modifié (avec cinq niveaux de concentration) proposé par la SFSTP 2006.

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

- Deux standards d'étalonnage : un avec matrice et l'autre sans matrice, chacun avec deux répétitions.
- Un standard de validation avec trois répétitions.

On a choisie de travailler avec cinq niveaux de concentration.

On obtient ainsi un nombre d'essais égale à :

- ✓ Standards d'étalonnage avec matrice: 3(séries) x 2(répétitions) x 5(niveaux) = 30 essais.
- ✓ Standards d'étalonnage sans matrice : 3(séries) x 2(répétitions) x 5(niveaux) = 30 essais.
- ✓ Standards de validation :  $3(séries) \ge 3(répétitions) \ge 5(niveaux) = 45$  essais.

Les standards d'étalonnage sans matrice sont préparés dans une solution d'albumine à 40g/l pour leurs faire subir les mêmes étapes de préparation de l'échantillon que le plasma à savoir la déprotéinisation et les différentes dilutions.

Les standards d'étalonnage avec matrice et les standards de validation sont réalisés dans un pool de plasma héparine.

Pour chaque série des blancs plasma sont préparés et dosés afin de déterminer la quantifié de Tyr et Phe présente dans le plasma avant l'ajout des standards, permettant ainsi de quantifier la quantité introduite par la méthode des ajouts dosés.

#### ✓ Le choix des niveaux de concentration

Le choix des niveaux de concentrations de la Phe et de la Tyr est fait de sorte que la gamme des concentrations puisse couvrir les valeurs physiologiques et pathologiques de la Phe et de la Tyr dans le plasma.

Les niveaux de concentrations choisis pour la Phe sont : 30, 60, 180, 225, 300 µmol/l dans l'échantillon (albumine ou plasma).

Les niveaux de concentrations choisis pour la Tyr sont 5, 25, 50, 75, 100µmol/l dans l'échantillon(albumine ou plasma).

#### ✓ Le choix des limites d'acceptabilité

Pour le dosage en milieux biologiques, et à partir des propositions données par la SFSTP, la limites d'acceptabilité  $\lambda$  est fixée à 15%.nous voulons que 80% des futures mesures soient à l'intérieur de ces limites ( $\beta$ =80%) avec un risque  $\alpha$  de 15%.

#### 1.2.3 Préparation des réactifs

#### ✓ Préparation de la phase mobile (solution de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.015M)

Dans un verre de montre peser 4.08g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puis les verser dans une fiole de 2L à l'aide d'un entonnoir, ajouter de l'eau distillée puis agiter avec l'agitateur magnétique jusqu'à dissolution totale et compléter au trait de jauge par l'eau distillée.

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

#### ✓ Préparation de la solution d'albumine à 40g/L

A l'aide d'une pipette prélever 10ml de la solution d'albumine à 20% les verser dans une fiole de 50ml, ajouter de l'eau distillée, bien agiter et compléter au trait de jauge par l'eau distillée.

#### ✓ Préparation de la solution de HCl 0.1M

A l'aide d'une pipette prélever 16.6ml d' HCl 16M les verser dans une fiole de 2L ajouter de l'eau distillée bien agiter et enfin compléter au trait de jauge par l'eau distillée.

#### ✓ Préparation de TCA (Acide trichloracétique) 0.33M

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

#### ✓ Préparation de l'étalon interne 6000µM

Dans une fiole de 25ml peser 32,4mg de EI, ajouter l'eau distillée, le dissoudre au sonicateur pendant 4min, compléter avec le même solvant au trait de jauge.

#### 1.2.4 Mode opératoire

Il comporte plusieurs étapes résumées comme suit :



Figure 13 : Mode opératoire

#### ✓ Première étape : préparation des solutions mères

#### • Préparation de solution de la Phénylalanine à 3mmol/l

Dans une fiole de 100ml peser 49.5mg de Phe, ajouter de l'eau distillée, dissoudre au sonicateur pendant 4min compléter au trait de jauge avec l'eau distillée.

#### • Préparation de la solution de Tyr à 1mmol/l

Dans une fiole de 100ml peser 18.11mg de Tyr, ajouter le HCl à 0.1M, dissoudre au sonicateur pendant 4min et compléter au trait de jauge avec l'eau distillée.

Chaque jour, sept solutions mères de Phe et Tyr sont préparées, quatre pour les standards d'étalonnage avec et sans matrice trois pour les standards de validation.

#### ✓ Deuxième étape : dilution des solutions mères

La gamme de concentration est obtenue par dilution des solutions mères

#### • Les dilutions de la solution de Phénylalanine

Pour chaque solution mère de Phe quatre dilutions sont effectuées :



#### Figure 14 : Dilutions des solutions de la phénylalanine

#### • Dilution 4/5

Prélever 20ml de la solution mère à l'aide d'une pipette de 20ml et les verser dans une fiole de 25 ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### • Dilution 3/5

Prélever 15ml de la solution mère à l'aide d'une pipette de 20ml et les verser dans une fiole de 25 ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### • Dilution 1/5

Prélever 5ml de la solution mère à l'aide d'une pipette de 5ml et les verser dans une fiole de 25 ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### • Dilution 1/10

Prélever 2ml de la solution mère à l'aide d'une pipette de 2ml et les verser dans une fiole de 20 ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### • Les dilutions de la solution de Tyr

Pour chaque solution mère de Tyr quatre dilutions sont effectuées :



Figure 15 : Dilution de la solution de tyrosine.

#### • Dilution 3/4

Prélever 15ml de la solution mère a l'aide d'une pipette de 20ml et les verser dans une fiole de 20ml et compléter au trait de jauge avec de l'HCL 0.1M.

#### • Dilution 1/2

Prélever 10ml de la solution mère a l'aide d'une pipette de 10ml et les verser dans une fiole de 20ml et compléter au trait de jauge avec de l'HCL 0.1M.

#### • Dilution 1/4

Prélever 2.5 ml de la solution mère a l'aide d'une pipette de 5ml et les verser dans une fiole de 10ml et compléter au trait de jauge avec de l'HCL 0.1M.

#### • Dilution 1/20

Prélever 1ml de la solution mère a l'aide d'une pipette de 1ml et les verser dans une fiole de 20ml et compléter au trait de jauge avec de l'HCL 0.1M.

# ✓ Troisième étape : Charger la matrice /solution d'albumine à 40g/l de phénylalanine, tyrosine et de l'étalon interne

Dans chaque tube a essai préalablement étiqueté introduire 0.35 ml de plasma /albumine à l'aide d'une pipette de 1ml ,ajouter  $50\mu$ l d'étalon interne , $50\mu$ l de solution de Phe et  $50\mu$ l de solution de Tyr correspondant à chaque niveau de concentration et cela à l'aide d'une microseringue, agiter au vortex pendant 30seconde.

#### ✓ Quatrième étape : Déprotéinisation

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

#### ✓ Cinquième étape : Centrifugation

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

#### ✓ Sixième étape : dilution dans du KH₂PO4

Récupérer 0.5ml de surnageant a l'aide d'une pipette de 1ml dans des tubes à essai et ajouter 4ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15 mmol/l, agiter au vortex pendant 30 seconde et remplir les vials.

#### ✓ Septième étape : analyse des échantillons

Le dosage se fait par HPLC avec une détection fluorimétrique a une longueur d'onde d'excitation de  $\lambda$ =210nm et une longueur d'onde d'émission de  $\lambda$ =310 nm , avec un volume d'injection de 10 µl et un débit de la phase mobile de 0.8ml /min, le temps d'analyse pour chaque échantillon est de 12min.

Le chromatogramme obtenu comporte trois pics :

- Premier pic a un temps de rétention d'environ 4,3 min qui correspond à la tyrosine.
- Deuxième pic a un temps de rétention 8.2min correspondant à la Phe
- Troisième pic a un temps de rétention de 10.3 min correspondant à l'étalon interne.

NB : vue la complexité de matrice et l'absence de la précolonne, il est nécessaire d'effectuer entre chaque série des lavages de la colonne avec un mélange V/V d'eau acétonitrile afin d'éliminer les éventuels résidus du plasma.

# Résultats

#### 2 Résultats

#### 2.1 Chromatogrammes obtenus

Les figures représentent les chromatogrammes obtenus avec :

✓ Standard d'étalonnage sans matrice niveau 5



Figure 16 : Chromatogramme obtenu avec un standard d'étalonnage sans matrice.



✓ Blanc plasma :

Figure 18 : Chromatogramme d'un blanc albumine
Composé	Moyenne des temps de rétention (min)
Tyrosine	4.300
Phénylalanine	8.208
Etalon interne	10.305

#### Tableau XIII : Moyenne des temps de rétention obtenus

#### 2.2 Informations concernant les données brutes

- ✓ Généralement lorsqu'on travaille avec un étalon interne, on construit les fonctions d'étalonnage et de validation en utilisant les rapports de concentrations (concentration introduite/concentration de l'étalon interne) comme abscisses et les rapports des réponses comme ordonnées.
- ✓ Dans ce travail la concentration de l'EI étant constante ce qui nous permet d'utiliser directement les concentrations en abscisses.
- Comme on a utilisé un plasma d'origine humaine qui contient une quantité biologique de la Phe et la Tyr, les réponses étudiées sont celle obtenues par soustraction des résultats du blanc plasma.

#### Spécificité et effet matrice

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

## ✓ Phénylalanine

Tableau XIV : Résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice :standards d'étalonnage sans matrice de la Phénylalanine

Niveaux	1 <sup>ère</sup> répétitions de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (µmol /l)	Réponses instrumentales (Yi) (Rapports)	Réponses calculées (Y*i)	(Yi-Y*i) <sup>2</sup>	(X <sub>i</sub> -X') <sup>2</sup>				
	1	30.05	0.17789	0.12155	0.0032	17442.0959				
1	2	30.07	0.09443	0.12159	0.0007	17435.7005				
	3	29.94	0.09350	0.12134	0.0008	17470.8895				
	1	60.10	0.21751	0.17789	0.0016	10407.7299				
2	2	60.15	0.13482	0.17798	0.0019	10397.8509				
	3	59.88	0.17104	0.17748	0.0000	10452.2432				
	1	180.30	0.47185	0.40325	0.0047	330.6105				
3	2	180.45	0.33313	0.40352	0.0050	335.9151				
	3	179.65	0.41076	0.40202	0.0001	307.2625				
	1	240.40	0.54997	0.51593	0.0012	6128.2577				
4	2	240.60	0.54044	0.51629	0.0006	6158.6247				
	3	239.53	0.47731	0.51429	0.0014	5992.5350				
	1	300.50	0.66709	0.62861	0.0015	19150.0427				
5	2	300.74	0.61887	0.62906	0.0001	19217.1193				
	3	299.41	0.57875	0.62656	0.0023	18849.6493				
	Pente		0.00187486							
0	ordonnée à l'origine		0.065206894							
E	rreur pente		0.000109341							
Erre	ur ordonnée : l'origine	à	0.021019195							

Niveaux	1 <sup>ère</sup> répétitions de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (µmol /l)	Réponses instrumentales (Yi) (Rapports)	Réponses calculées (Y*i)	(Yi-Y*i) <sup>2</sup>	(Xi-X') <sup>2</sup>		
1	1	30.00	0.21144	0.11008	0.0102744	17475.051		
	2	30.12	0.06576	0.11031	0.0019844	17444.654		
	3	29.99	0.04311	0.11006	0.0044816	17478.252		
2	1	60.00	0.22643	0.17005	0.0031791	10443.085		
	2	60.23	0.16553	0.17051	2.482E-05	10396.123		
	3	59.98	0.16481	0.17000	2.701E-05	10448.035		
3	1	180.01	0.40432	0.40994	3.159E-05	317.40445		
	2	180.70	0.41629	0.41132	2.469E-05	342.47066		
	3	179.94	0.35454	0.40979	0.0030531	314.82132		
4	1	240.01	0.55566	0.52988	0.0006648	6055.8716		
	2	240.93	0.55224	0.53172	0.0004209	6199.9298		
	3	239.92	0.45700	0.52969	0.0052838	6040.806		
5	1	300.02	0.66446	0.64982	0.0002141	18995.21		
	2	301.17	0.68208	0.65212	0.0008977	19313.579		
	3	299.90	0.65121	0.64958	2.645E-06	18961.852		
	Pente		0.00	1998931				
0	ordonnée à l'origine		0.050108151					
E	rreur pente		0.00	0121135				
Erre	ur ordonnée á l'origine	à	0.02	3297376				

## Tableau XV : Résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (avec matrice) de la Phénylalanine.

Tableau XVI : Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine pour la Phénylalanine.

Comparaison des deux	t calculé	0.760308526		
pentes des deux droites	t°(α ; 26)	1.314971864	Difference non	
de régression	Condition	t calculé < t°( $\alpha$ ; 26)	significative	
Comparaison des	t calculé	0.48118997		
ordonnées à l'origine des deux droites de	t°(α ; 26)	1.314971864	Différence non significative	
régression	Condition	t calculé < t°(α ; 26)	C	

## ✓ Tyrosine

### Tableau XVII : Résultats obtenues pour l'étude de spécificité et de l'effet matrice pour standards d'étalonnage sans matrice de la Tyrosine

Niveaux	1 <sup>ère</sup> répétitions de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (µmol /l)	Réponses instrumentales (Yi) (Rapports)	Réponses calculées (Y*i)	(Yi- Y*i) <sup>2</sup>	(Xi-X') <sup>2</sup>			
1	1	5.00	0.27301	0.31450	0.0017	2121.6703			
	2	4.99	0.21029	0.31433	0.0108	2122.4331			
	3	5.03	0.26318	0.31521	0.0027	2118.6208			
2	1	24.99	0.68056	0.74179	0.0037	679.7245			
	2	24.95	0.87308	0.74091	0.0175	681.8846			
	3	25.15	0.78349	0.74533	0.0015	671.1185			
3	1	49.98	1.03767	1.27590	0.0568	1.1749			
	2	49.89	1.25207	1.27413	0.0005	1.3613			
	3	50.31	1.73485	1.28298	0.2042	0.5667			
4	1	74.96	1.85699	1.81001	0.0022	571.3839			
	2	74.84	1.67411	1.80735	0.0178	565.4626			
	3	75.46	1.96402	1.82062	0.0206	595.3772			
5	1	99.95	1.87327	2.34411	0.2217	2390.3513			
	2	99.78	2.36939	2.34057	0.0008	2374.1887			
	3	100.61	2.64004	2.35827	0.0794	2455.5501			
Pente			0.021374927						
ordo	nnée à l'origin	ie	0.207682928						
E	rreur pente		0.001686814						
Erre	eur ordonnée a l'origine	à	0.103485143						

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

Niveaux	1 <sup>ère</sup> répétitions de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (µmol /l)	Réponses instrumentales (Yi) (Rapports)	Réponses calculées (Y*i)	(Yi-Y*i) <sup>2</sup>	(X <sub>i</sub> -X') <sup>2</sup>		
1	1	5.00	0.10437	0.09642	6.321E-05	2114.5075		
	2	4.99	0.31523	0.09625	0.0479543	2115.2689		
	3	5.00	0.25320	0.09648	0.0245599	2114.2537		
2	1	25.00	0.27021	0.52353	0.0641707	675.09915		
	2	24.96	0.79273	0.52265	0.0729458	677.25186		
	3	25.02	0.15453	0.52382	0.1363813	674.38234		
3	1	50.00	0.48817	1.05742	0.3240444	0.9629308		
	2	49.92	1.64417	1.05565	0.3463556	1.1322586		
	3	50.03	0.75971	1.05800	0.0889818	0.9095342		
4	1	75.00	1.38457	1.59130	0.0427359	576.9647		
	2	74.88	2.27901	1.58865	0.4766063	571.01453		
	3	75.05	1.25299	1.59218	0.1150499	578.95494		
5	1	100.01	1.52429	2.12518	0.3610733	2403.1044		
	2	99.84	3.01740	2.12165	0.8023694	2386.8987		
	3	100.06	1.93497	2.12636	0.0366331	2408.5185		
	Pente		0.0	2135421				
(	ordonnée à l'origine		-0.010354377					
E	rreur pente		0.00	3615623				
Erre	ur ordonnée à l'origine		0.22	21489149				

Tableau XIX: Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine pour la Tyrosine.

	t calculé 0.005192752			
Comparaison des deux pentes des deux droites de	t°(α; 26) 1.314971864		Différence non significative	
régression	Condition	t calculé < t°(α ; 26)		
Comparaison des ordonnées	t calculé	0.891869813		
à l'origine des deux droites	t°(α ; 26)	1.314971864	Différence non significative	
de régression	Condition	t calculé < t°( $\alpha$ ; 26)		

D'après ces résultats, on constate qu'il n'y'a pas une différence significative entre les deux pentes, donc il n'existe pas d'effet matrice important pour cette méthode d'analyse, ce qui nous laisse la liberté de choisir la fonction de réponse adéquate entre l'étalonnage sans et avec matrice de façon à répondre aux objectifs de l'analyste en terme d'exactitude et d'intervalle de dosage ou même de facilité.

#### **1.6 Fonction de réponse**

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

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

- ✓ Phenylalanine
- Droite : y = bx+ a
  - Etalonnage avec matrice

# Tableau XX : Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx + a (avec matrice)

X	suo	Séries (Jours)							
veau	étiti	1			2		3		
Ni	Rép	X <sub>i</sub> (µmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (µmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (µmol/l)	Yi		
1	1	30.08	0.20265	30.04	0.12640	30.06	0.02966		
	2	30.03	0.16317	29.98	0.09795	30.00	0.02421		
2	1	60.16	0.21088	60.08	0.15569	60.12	0.07046		
	2	60.05	0.20283	59.97	0.17286	59.99	0.16240		
3	1	180.48	0.46171	180.23	0.41629	180.37	0.37613		
	2	180.16	0.46661	179.90	0.47036	179.97	0.29470		
4	1	240.64	0.49269	240.31	0.50593	240.50	0.37246		
	2	240.21	0.55566	239.87	0.51293	239.97	0.52243		
5	1	300.81	0.62836	300.38	0.68208	300.62	0.61906		
	2	300.26	0.61336	299.84	0.63424	299.96	0.59724		
Pente		0.00168	80037	Pente	0.002007143	Pente	0.002051687		
Ordonnée à l'origine		0.1271	424	Ordonnée à l'origine	0.052197	Ordonnée à l'origine	-0.025820		





• Etalonnage sans matrice

Tableau XXI: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx + a (sans
matrice)

×	SU	g Séries (Jours)						
eaux	titio	1			2	3	3	
Niv	Répé	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi	
1	1	30.05	0.17789	30.07	0.09443	29.94	0.09350	
	2	30.06	0.14648	30.01	0.08274	30.04	0.14648	
2	1	60.10	0.21751	60.15	0.13482	59.88	0.17104	
	2	60.12	0.18356	60.03	0.14516	60.09	0.18356	
3	1	180.30	0.47185	180.45	0.33313	179.65	0.41076	
	2	180.37	0.42721	180.08	0.31546	180.27	0.42721	
4	1	240.40	0.54997	240.60	0.54044	239.53	0.47731	
	2	240.50	0.55949	240.11	0.57765	240.35	0.48190	
5	1	300.50	0.66709	300.74	0.61887	299.41	0.57875	
	2	300.62	0.57830	300.14	0.62865	300.44	0.64585	
Pente		0.001	179	Pente	0.00205	Pente	0.00179	
Ordonnée à l'origine		0.107	779	Ordonnée à l'origine	0.01406	Ordonnée à l'origine	0.07112	



Figure 20: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction y = bx + a (sans matrice)

- Droite passant par 0: y = bx
  - Etalonnage avec matrice

# Tableau XXII: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx (avec matrice)

×	suc	Séries (Jours)					
/eau	ŝtitic	1		2		3	
Niv	Répé	X <sub>i</sub> (µmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (µmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi
1	1	30.0805	0.2027	30.0381	0.1264	30.0624	0.0297
	2	30.0260	0.1632	29.9837	0.0980	29.9958	0.0242
2	1	60.1610	0.2109	60.0763	0.1557	60.1247	0.0705
	2	60.0521	0.2028	59.9673	0.1729	59.9915	0.1624
3	1	180.4831	0.4617	180.2288	0.4163	180.3741	0.3761
	2	180.1562	0.4666	179.9019	0.4704	179.9746	0.2947
4	1	240.6441	0.4927	240.3051	0.5059	240.4988	0.3725
	2	240.2082	0.5557	239.8692	0.5129	239.9661	0.5224
5	1	300.8051	0.6284	300.3814	0.6821	300.6235	0.6191
	2	300.2603	0.6134	299.8366	0.6342	299.9576	0.5972
Pente		0.00223	37233	Pente	0.002236219	Pente	0.00193844
Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine	0	Ordonnée à l'origine	0



Figure 21: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx (avec matrice)

• Etalonnage sans matrice

# Tableau XXIII: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction y = bx (sans matrice)

×	SU	Séries (Jours)					
/eau	étitic	1		2		3	
Niv	Répé	X <sub>i</sub> (µmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (µmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi
	1	30.0502	0.1779	30.0745	0.0944	29.9413	0.0935
1	2	30.0624	0.1465	30.0139	0.0827	30.0442	0.1465
	1	60.1005	0.2175	60.1489	0.1348	59.8826	0.1710
2	2	60.1247	0.1836	60.0278	0.1452	60.0884	0.1836
	1	180.3015	0.4719	180.4468	0.3331	179.6477	0.4108
3	2	180.3741	0.4272	180.0835	0.3155	180.2651	0.4272
	1	240.4020	0.5500	240.5957	0.5404	239.5302	0.4773
4	2	240.4988	0.5595	240.1114	0.5777	240.3535	0.4819
	1	300.5025	0.6671	300.7446	0.6189	299.4128	0.5788
5	2	300.6235	0.5783	300.1392	0.6286	300.4419	0.6459
Pente		0.0022	50004	Pente	0.002114624	Pente	0.00210605
Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine	0	Ordonnée à l'origine	0



Figure 22: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction y = bx (sans matrice)

- Logarithme népérien : LnY = f(Lnx)
  - Etalonnage avec matrice

Tableau XXIV: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction LnY= f(Lnx)
(avec matrice)

×	suo	Séries (Jours)					
/eau	ŝtitic	1			2	3	3
Niv	Répé	LnX <sub>i</sub>	LnY <sub>i</sub>	LnX <sub>i</sub>	LnY <sub>i</sub>	LnX <sub>i</sub>	LnY <sub>i</sub>
1	1	3.40	-1.59627	3.40	-2.06832	3.40	-3.51802
	2	3.40	-1.81297	3.40	-2.32327	3.40	-3.72092
2	1	4.10	-1.55648	4.10	-1.85987	4.10	-2.65269
	2	4.10	-1.59539	4.09	-1.75529	4.09	-1.81768
3	1	5.20	-0.77282	5.19	-0.87638	5.20	-0.97782
	2	5.19	-0.76226	5.19	-0.75427	5.19	-1.22181
4	1	5.48	-0.70788	5.48	-0.68136	5.48	-0.98763
	2	5.48	-0.58759	5.48	-0.66762	5.48	-0.64926
5	1	5.71	-0.46464	5.71	-0.38260	5.71	-0.47956
	2	5.70	-0.48880	5.70	-0.45532	5.70	-0.51543
Pente 0.56		0.56403	30009	Pente	0.781975738	Pente	1.2843271 08
Ordon à l'orig	née gine	-3.7285	19766	Ordonnée à l'origine	-4.91632277	Ordonnée à l'origine	-7.7874517



## Figure 23: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction LnY = f(Lnx) (avec matrice)

#### • Etalonnage sans matrice

## Tableau XXV: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction LnY = f(Lnx)

×	titions	Séries (Jours)						
/eau		1			2	3		
Niv	Répé	LnX <sub>i</sub>	LnY <sub>i</sub>	LnX <sub>i</sub>	LnY <sub>i</sub>	LnX <sub>i</sub>	LnY <sub>i</sub>	
1	1	3.40	-1.72661	3.40	-2.35990	3.40	-2.36977	
	2	3.40	-1.92087	3.40	-2.49210	3.40	-1.92087	
2	1	4.10	-1.52553	4.10	-2.00385	4.09	-1.76586	
	2	4.10	-1.69523	4.09	-1.92993	4.10	-1.69523	
3	1	5.19	-0.75109	5.20	-1.09923	5.19	-0.88974	
	2	5.20	-0.85048	5.19	-1.15374	5.19	-0.85048	
4	1	5.48	-0.59789	5.48	-0.61538	5.48	-0.73958	
	2	5.48	-0.58072	5.48	-0.54878	5.48	-0.73003	
5	1	5.71	-0.40483	5.71	-0.47986	5.70	-0.54688	
	2	5.71	-0.54766	5.70	-0.46418	5.71	-0.43718	
Pent	te	0.61928	31655	Pente	0.861821882	Pente	0.716458699	
Ordonnée -4.018066805 à l'origine		66805	Ordonnée à l'origine	-5.430804586	Ordonnée à l'origine	- 4.615180249		

(Sans matrice)





LnY = f(Lnx) (sans matrice)

- Racine carrée :  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ 
  - Etalonnage avec matrice

#### Tableau XXVI: Résultats de la Phénylalanine obtenus avec la fonction

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

×	နို Séries (Jours)						
/eau	étitic	1			2	3	
Niv	Répé	√Xi	√Yi	√Xi	√Yi	√Xi	√Yi
	1	5.48	0.45017	5.48	0.35553	5.48	0.17221
1	2	5.48	0.40394	5.48	0.31297	5.48	0.15560
	1	7.76	0.45921	7.75	0.39458	7.75	0.26545
2	2	7.75	0.45037	7.74	0.41576	7.75	0.40299
	1	13.43	0.67949	13.42	0.64520	13.43	0.61330
3	2	13.42	0.68309	13.41	0.68582	13.42	0.54286
_	1	15.51	0.70192	15.50	0.71129	15.51	0.61029
4	2	15.50	0.74543	15.49	0.71619	15.49	0.72280
	1	17.34	0.79269	17.33	0.82588	17.34	0.78680
5	2	17.33	0.78317	17.32	0.79639	17.32	0.77281
Pent	e	0.0319	90257	Pente	0.040421608	Pente	0.049256929
Ordonnée à l'origine 0.234233191		33191	Ordonnée à l'origine	0.105245382	Ordonnée à l'origine	-0.08145704	



Figure 25: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (avec matrice)

• Etalonnage sans matrice

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

×	suc	Séries (Jours)					
/eau	étitic	1			2		3
Niv	Répé	√Xi	√Yi	√Xi	√Yi	√Xi	√Yi
1	1	5.48	0.42177	5.48	0.30729	5.47	0.30578
	2	5.48	0.38273	5.48	0.28764	5.48	0.38273
2	1	7.75	0.46637	7.76	0.36717	7.74	0.41357
	2	7.75	0.42844	7.75	0.38100	7.75	0.42844
3	1	13.43	0.68691	13.43	0.57717	13.40	0.64091
	2	13.43	0.65361	13.42	0.56165	13.43	0.65361
4	1	15.50	0.74160	15.51	0.73514	15.48	0.69088
	2	15.51	0.74799	15.50	0.76003	15.50	0.69419
5	1	17.34	0.81676	17.34	0.78668	17.30	0.76076
	2	17.34	0.76046	17.32	0.79287	17.33	0.80365
Pent	e	0.03443	36634	Pente	0.042569945	Pente	0.036645636
Ordon à l'orig	née gine	0.2008	13842	Ordonnée à l'origine	0.049119585	Ordonnée à l'origine	0.141771869



Figure 26: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction

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

- Fonction polynomiale :  $y = cx^2 + bx + a$ 
  - Etalonnage avec matrice

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

×	Répétitions			Séri	es (Jours)		
eau		1			2		3
Niv		Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi
1	1	30.08	0.20	30.04	0.13	30.06	0.03
	2	30.03	0.16	29.98	0.10	30.00	0.02
2	1	60.16	0.21	60.08	0.16	60.12	0.07
	2	60.05	0.20	59.97	0.17	59.99	0.16
3	1	180.48	0.46	180.23	0.42	180.37	0.38
	2	180.16	0.47	179.90	0.47	179.97	0.29
4	1	240.64	0.49	240.31	0.51	240.50	0.37
	2	240.21	0.56	239.87	0.51	239.97	0.52
5	1	300.81	0.63	300.38	0.68	300.62	0.62
	2	300.26	0.61	299.84	0.63	299.96	0.60
с		0.000	002	0.0000007		0.000001	
b		0.00	22	0.0022		0.0016	
a		0.10	43	0.0423		0.0004	



Figure 27: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction  $y = cx^2 + bx + a$  (avec matrice)

✓ Etalonnage sans matrice

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

X	su		Séries (Jours)						
eaux	titio	iii 1			2	3			
N	Répé	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi		
1	1	30.05	0.18	30.07	0.09	29.94	0.09		
	2	30.06	0.15	30.01	0.08	30.04	0.15		
2	1	60.10	0.22	60.15	0.13	59.88	0.17		
	2	60.12	0.18	60.03	0.15	60.09	0.18		
3	1	180.30	0.47	180.45	0.33	179.65	0.41		
	2	180.37	0.43	180.08	0.32	180.27	0.43		
4	1	240.40	0.55	240.60	0.54	239.53	0.48		
	2	240.50	0.56	240.11	0.58	240.35	0.48		
5	1	300.50	0.67	300.74	0.62	299.41	0.58		
	2	300.62	0.58	300.14	0.63	300.44	0.65		
c		0.000002 0.000002		0.00000	)01				
b		0.00	24	0.	0015	0.0018			
a		0.07	98	0.039		0.081	5		



Figure 28: Courbes d'étalonnage de la Phénylalanine obtenues avec la fonction  $y = cx^2 + cx^2$ bx + a (sans matrice)

- ✓ Tyrosine
- **Droite :** y = bx + a•
  - Etalonnage avec matrice

			•	matrice)			
×	su			Série	s (Jours)		
eau)	iitio	1			2	3	
Nive	Répét	X <sub>i</sub> (µmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi
	1	5.04	0.13443	5.00	0.67824	4.99	-0.16786
1	2	5.06	0.07534	4.99	0.01117	4.99	-0.17705

Tableau XXX: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction y = bx + a (avec

Ré	, ( <b>F</b>	••		••	, ( <b>P</b> , )	••
1	5.04	0.13443	5.00	0.67824	4.99	-0.16786
2	5.06	0.07534	4.99	0.01117	4.99	-0.17705
1	25.21	0.52858	25.00	1.09122	24.93	-0.04932
2	25.28	0.07127	24.93	0.62875	24.95	0.26613
1	50.42	1.04053	50.00	1.18068	49.86	0.93280
2	50.55	0.47261	49.86	1.74863	49.89	0.96615
1	75.63	1.72018	75.00	2.46166	74.80	1.21729
2	75.83	1.07452	74.80	2.32655	74.84	1.54096
1	100.83	1.72960	100.01	2.70274	99.73	2.24895
2	101.11	2.11816	99.73	3.15391	99.78	1.77549
nte	0.01963	34654	Pente	0.027980069	Pente	0.023603 371
nnée igine	-0.1145	73718	Ordonnée à l'origine	0.173262345	Ordonnée à l'origine	-0.3454 93884
	2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1	2       5.04         2       5.06         1       25.21         2       25.28         1       50.42         2       25.28         1       50.42         2       50.55         1       75.63         2       75.83         1       100.83         2       101.11         nte       0.01963         nnée       -0.1145	2         1         5.04         0.13443           1         5.06         0.07534           1         25.21         0.52858           2         25.28         0.07127           1         50.42         1.04053           2         50.55         0.47261           1         75.63         1.72018           2         75.83         1.07452           1         100.83         1.72960           2         101.11         2.11816           nnée         -0.114573718	2         1         5.04         0.13443         5.00           2         5.06         0.07534         4.99           1         25.21         0.52858         25.00           2         25.28         0.07127         24.93           1         50.42         1.04053         50.00           2         20.55         0.47261         49.86           1         75.63         1.72018         75.00           2         75.83         1.07452         74.80           1         100.83         1.72960         100.01           2         101.11         2.11816         99.73           nte         0.019634654         Pente           nnée         -0.114573718         Ordonnée	2M(pmos) ()M(pmos) ()M(pmos) ()M(pmos) ()15.040.134435.000.6782425.060.075344.990.01117125.210.5285825.001.09122225.280.0712724.930.62875150.421.0405350.001.18068250.550.4726149.861.74863175.631.7201875.002.46166275.831.0745274.802.326551100.831.72960100.012.702742101.112.1181699.733.15391nte0.019634654Pente0.027980069nnée-0.114573718Ordonnée0.173262345	2 $(1,1)$ $(1$



Figure 29 : Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction y = bx + a (avec matrice)

#### • Etalonnage sans matrice

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

×	su			Série	es (Jours)			
/eau	étitic	1 stitie			2		3	
vin	Répé	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi	
	1	5.00	0.27301	4.99	0.21029	5.03	0.26318	
1	2	4.99	0.34032	4.98	0.36727	5.00	0.27350	
	1	24.99	0.68056	24.95	0.87308	25.15	0.78349	
2	2	24.93	0.77484	24.89	0.69124	25.00	0.72669	
	1	49.98	1.03767	49.89	1.25207	50.31	1.73485	
3	2	49.86	1.43128	49.78	1.33989	50.00	1.25599	
	1	74.96	1.85699	74.84	1.67411	75.46	1.96402	
4	2	74.80	1.65786	74.67	1.84683	75.00	1.50314	
	1	99.95	1.87327	99.78	2.36939	100.61	2.64004	
5	2	99.73	2.26909	99.56	2.37036	100.01	2.60219	
Pente		0.01898	86773	Pente	0.021465239	Pente	0.0214652 39	
Ordo à l'or	Ordonnée à l'origine		Ordonnée à l'origine	0.2082892	Ordonnée à l'origine	0.2082892		



Figure 30: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction y = bx + a (sans matrice)

- Droite passant par 0 : y = bx
  - Etalonnage avec matrice

Tableau XXXII: Résultats de la	Tyrosine obtenus avec l	a fonction y = bx (	(avec matrice)
--------------------------------	-------------------------	---------------------	----------------

×	su	Séries (Jours)								
/eau	ŝtitic	1			2		3			
NiN	Répé	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi	X <sub>i</sub> (μmol/l)	Yi			
	1	5.04167	0.13443	5.00028	0.67824	4.98648	-0.16786			
1	2	5.05547	0.07534	4.98648	0.01117	4.98924	-0.17705			
2	1	25.20834	0.52858	25.00138	1.09122	24.93239	-0.04932			
	2	25.27733	0.07127	24.93239	0.62875	24.94619	0.26613			
	1	50.41669	1.04053	50.00276	1.18068	49.86478	0.93280			
3	2	50.55467	0.47261	49.86478	1.74863	49.89238	0.96615			
	1	75.62503	1.72018	75.00414	2.46166	74.79717	1.21729			
4	2	75.83200	1.07452	74.79717	2.32655	74.83857	1.54096			
_	1	100.83338	1.72960	100.00552	2.70274	99.72957	2.24895			
5	2	101.10933	2.11816	99.72957	3.15391	99.78476	1.77549			
Pente		0.018093499		Pente	0.03033641 6	Pente	0.01889949			
Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine	0	Ordonnée à l'origine	0			



Figure 31: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction y = bx (avec matrice)

• Etalonnage sans matrice

×	SU	Séries (Jours)									
eau	titio	1			2	3					
Niv	Répé	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi				
	1	4.99752	0.27301	4.98924	0.21029	5.03063	0.26318				
1	2	4.98648	0.34032	4.97820	0.36727	5.00028	0.27350				
	1	24.98758	0.68056	24.94619	0.87308	25.15315	0.78349				
2	2	24.93239	0.77484	24.89100	0.69124	25.00138	0.72669				
	1	49.97516	1.03767	49.89238	1.25207	50.30631	1.73485				
3	2	49.86478	1.43128	49.78200	1.33989	50.00276	1.25599				
	1	74.96275	1.85699	74.83857	1.67411	75.45946	1.96402				
4	2	74.79717	1.65786	74.67300	1.84683	75.00414	1.50314				
_	1	99.95033	1.87327	99.78476	2.36939	100.61262	2.64004				
5	2	99.72957	2.26909	99.56399	2.37036	100.00552	2.60219				
Pente		0.022424609		Pente	0.02430343 9	Pente	0.02587008				
Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine	0	Ordonné e à l'origine	0				



Figure 32: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction y = bx (sans matrice)

- Logarithme népérien : LnY = f(Lnx) •
  - Etalonnage avec matrice

	matrice)										
×	su	Séries (Jours)									
eau	titio		1		2	3					
Nive	Répét	LnX <sub>i</sub>	LnYi	LnXi	LnYi	LnXi	LnYi				
	1	1.62	-2.00670	1.61	-0.38826	1.61	-1.78461				
1	2	1.62	-2.58578	1.61	-4.49446	1.61	-1.73135				
	1	3.23	-0.63756	3.22	0.08730	3.22	-3.00943				
2	2	3.23	-2.64128	3.22	-0.46402	3.22	-1.32375				
	1	3.92	0.03973	3.91	0.16609	3.91	-0.06957				
3	2	3.92	-0.74949	3.91	0.55883	3.91	-0.03443				
_	1	4.33	0.54243	4.32	0.90084	4.31	0.19663				
4	2	4.33	0.07187	4.31	0.84439	4.32	0.43241				
	1	4.61	0.54789	4.61	0.99427	4.60	0.81046				
5	2	4.62	0.75055	4.60	1.14864	4.60	0.57407				
Pei	nte	1.0040	070463	Pente	1.178948268	Pente	0.881396037				
Ordo à l'or	nnée igine	-4.22351832		Ordonnée à l'origine	- 4.227825081	Ordonnée à l'origine	-3.705433325				

Tableau XXXIV: Résultats de la tyrosine obtenus avec la fonction LnY = f(Lnx) (avec



## Figure 33: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction LnY = f(Lnx) (avec matrice)

#### • Etalonnage sans matrice

## Tableau XXXV: Résultats de la Tyrosine obtenus avec la fonction LnY = f(Lnx) (sans matrice)

×	su	Séries (Jours)									
/eau	étitic	1			2		3				
NiN	Répé	LnX <sub>i</sub>	LnY <sub>i</sub>	LnX <sub>i</sub>	LnY <sub>i</sub>	LnX <sub>i</sub>	LnY <sub>i</sub>				
1	1	1.61	-1.29824	1.61	-1.55929	1.62	-1.33492				
	2	1.61	-1.07788	1.61	-1.00164	1.61	-1.29647				
2	1	3.22	-0.38484	3.22	-0.13573	3.22	-0.24399				
	2	3.22	-0.25509	3.21	-0.36927	3.22	-0.31926				
3	1	3.91	0.03698	3.91	0.22480	3.92	0.55092				
	2	3.91	0.35857	3.91	0.29259	3.91	0.22793				
4	1	4.32	0.61896	4.32	0.51528	4.32	0.67499				
	2	4.31	0.50553	4.31	0.61347	4.32	0.40756				
5	1	4.60	0.62769	4.60	0.86263	4.61	0.97080				
	2	4.60	0.81938	4.60	0.86304	4.61	0.95635				
Per	nte	0.6442	8155	Pente	0.702257752	Pente	0.740385708				
Ordonnée à l'origine		-2.279851044		Ordonnée à l'origine	- 2.447916992	Ordonnée à l'origine	-2.558375489				



Figure 34: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction LnY = f(Lnx) (sans matrice)

- Racine carrée :  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ 
  - Etalonnage avec matrice

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

Niveaux	su	Séries (Jours)									
	étitic	1			2		3				
	Répé	√Xi	√Yi	√Xi	√Yi	√Xi	√Yi				
	1	2.25	0.36665	2.24	0.82355	2.23	0.40971				
1	2	2.25	0.27448	2.23	0.10569	2.23	0.42077				
	1	5.02	0.72703	5.00	1.04462	4.99	0.22208				
2	2	5.03	0.26696	4.99	0.79294	4.99	0.51588				
	1	7.10	1.02006	7.07	1.08659	7.06	0.96581				
3	2	7.11	0.68746	7.06	1.32236	7.06	0.98293				
	1	8.70	1.31155	8.66	1.56897	8.65	1.10331				
4	2	8.71	1.03659	8.65	1.52530	8.65	1.24135				
	1	10.04	1.31514	10.00	1.64400	9.99	1.49965				
5	2	10.06	1.45539	9.99	1.77592	9.99	1.33247				
Pei	nte	0.14181	6342	Pente	0.162459042	Pente	0.141411796				
Ordonnée à l'origine		-0.093460368		Ordonnée à l'origine	0.098534482	Ordonnée à l'origine	-0.061865441				



# Figure 35: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (avec matrice)

• Etalonnage sans matrice

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

x	su	Séries (Jours)								
/eau	étitic		1		2		3			
Niv	Répé	√Xi	√Yi	√Xi	√Yi	√Xi	√Yi			
	1	2.24	0.52251	2.23	0.45857	2.24	0.51301			
1	2	2.23	0.58337	2.23	0.60603	2.24	0.52297			
	1	5.00	0.82496	4.99	0.93439	5.02	0.88515			
2	2	4.99	0.88025	4.99	0.83141	5.00	0.85246			
	1	7.07	1.01866	7.06	1.11896	7.09	1.31714			
3	2	7.06	1.19636	7.06	1.15754	7.07	1.12071			
	1	8.66	1.36272	8.65	1.29387	8.69	1.40143			
4	2	8.65	1.28758	8.64	1.35898	8.66	1.22603			
	1	10.00	1.36868	9.99	1.53928	10.03	1.62482			
5	2	9.99	1.50635	9.98	1.53960	10.00	1.61313			
Pei	nte	0.1169	914172	Pente	0.127835958	Pente	0.137262826			
Ordonnée à l'origine		0.28488896		Ordonnée à l'origine	0.242352123	Ordonnée à l'origine	0.20124943			



Figure 36: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (sans matrice)

- Fonction polynomiale :  $y = cx^2 + bx + a$ 
  - Etalonnage avec matrice

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

X	Suc	Séries (Jours)								
veau	śtitic	1		2		3	3			
Niv	Rép	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi			
	1	5.04	0.13	5.00	0.68	4.99	-0.17			
1	2	5.06	0.08	4.99	0.01	4.99	-0.18			
	1	25.21	0.53	25.00	1.09	24.93	-0.05			
2	2	25.28	0.07	24.93	0.63	24.95	0.27			
	1	50.42	1.04	50.00	1.18	49.86	0.93			
3	2	50.55	0.47	49.86	1.75	49.89	0.97			
	1	75.63	1.72	75.00	2.46	74.80	1.22			
4	2	75.83	1.07	74.80	2.33	74.84	1.54			
_	1	100.83	1.73	100.01	2.70	99.73	2.25			
5	2	101.11	2.12	99.73	3.15	99.78	1.78			
	c	0.000	04	0.000	008	0.00001				
Ì	b	0.0112		0.02	72	0.0251				
	a	0.0143		0.18	56	0.3924				



Figure 37: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction  $y = cx^2 + bx + a$  (avec matrice)

• Etalonnage sans matrice

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

X	Répétitions	Séries (Jours)									
eaux		1			2	3					
Niv		Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi	Xi (µmol/l)	Yi				
1	1	5.00	0.27	4.99	0.21	5.03	0.26				
1	2	4.99	0.34	4.98	0.37	5.00	0.27				
2	1	24.99	0.68	24.95	0.87	25.15	0.78				
	2	24.93	0.77	24.89	0.69	25.00	0.73				
	1	49.98	1.04	49.89	1.25	50.31	1.73				
3	2	49.86	1.43	49.78	1.34	50.00	1.26				
	1	74.96	1.86	74.84	1.67	75.46	1.96				
4	2	74.80	1.66	74.67	1.85	75.00	1.50				
_	1	99.95	1.87	<b>99.78</b>	2.37	100.61	2.64				
5	2	<b>99.73</b>	2.27	99.56	2.37	100.01	2.60				
	2	0.00	005	0.00	0002	0.00002					
b		0.0244		0.0216		0.0214					
8	1	0.16	99	0.2	056	0.2157					



Figure 38: Courbes d'étalonnage de la Tyrosine obtenues avec la fonction  $y = cx^2 + bx + a$  (sans matrice)

#### 1.7 Profils d'exactitude obtenus

On a cité dans les tableaux ci-dessous les différents profils d'exactitude à titre indicatif pour justifier notre choix de la fonction de réponse.

✓ Phénylalanine



Tableau XL: Profils d'exactitude obtenus pour la Phénylalanine







RESULTATS

## ✓ Tyrosine



Tableau XLI: Profils d'exactitude obtenus pour la Tyrosine







#### 2.7 Choix de la fonction de réponse

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

- Pour la Phénylalanine : c'est fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  : un étalonnage sans matrice.
- Pour la Tyrosine : sachant que tous les modèles testés n'ont pas donné des résultats souhaités, on a choisi la fonction de réponse qui a donné le meilleur profil d'exactitude : y = bx + a : un étalonnage avec matrice

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

### 2.8 Alignement des observations

Pour chaque niveau de concentration, on applique un alignement des réponses obtenues à partir des standards de validation sur la moyenne des concentrations introduites pour avoir des réponses corrigées qui prennent en considération les variations des masses introduites lors des pesés. Les résultats pour les deux acides aminés sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XLI	I: Tableau d'align	ement des réponses	observées avec	les trois séries de
validation po	ur la Phénylalanin	ie		

	(i					Séries (Jours)					
	es (VX	S		1			2			3	
Niveaux	Moyenne d concentrations	Répétitio	Concentrations des SV (√Xi)	Réponses instrumentales	Alignement	Concentrations des SV (√Xi)	Réponses instrumentales	Alignement	Concentrations des SV (√Xi)	Réponses instrumentales	Alignement
		1	5.477	0.460	0.460	5.488	0.256	0.256	5.476	0.208	0.208
1	5.478	2	5.478	0.423	0.423	5.481	0.260	0.260	5.478	0.261	0.261
		3	5.476	0.465	0.465	5.477	0.316	0.316	5.473	0.215	0.216
		1	7.746	0.476	0.476	7.761	0.407	0.406	7.745	0.406	0.406
2	7.748	2	7.747	0.441	0.441	7.752	0.439	0.439	7.748	0.430	0.430
		3	7.745	0.457	0.457	7.746	0.395	0.395	7.740	0.418	0.418
		1	13.417	0.636	0.636	13.443	0.645	0.644	13.414	0.595	0.596
3	13.419	2	13.418	0.638	0.638	13.426	0.640	0.640	13.420	0.621	0.621
		3	13.414	0.615	0.615	13.417	0.633	0.633	13.406	0.613	0.614
		1	15.492	0.745	0.746	15.522	0.743	0.742	15.489	0.676	0.676
4	15.495	2	15.494	0.742	0.742	15.503	0.711	0.711	15.496	0.707	0.707
		3	15.489	0.744	0.745	15.492	0.716	0.716	15.480	0.618	0.619
		1	17.321	0.815	0.815	17.354	0.826	0.825	17.318	0.807	0.807
5	17.324	2	17.323	0.783	0.783	17.333	0.796	0.796	17.325	0.776	0.776
		3	17.318	0.793	0.793	17.321	0.835	0.835	17.307	0.796	0.797

	(1			Séries (Jours)								
Nitroone	Moyenne des concentrations (µmol/	ránátitione	1			2			3			
			Concentrations des SV (µmol/L)	Réponses instrumentales	Alignement	Concentrations des SV (µmol/L)	Réponses instrumentales	Alignement	Concentrations des SV (µmol/L)	Réponses instrumentales	Alignement	
1	5.00	1	5.00	0.1043	0.1042	4.99	0.3152	0.3153	5.00	0.2532	0.2530	
		2	5.00	0.1344	0.1343	4.99	0.0596	0.0596	5.01	0.0681	0.0677	
		3	5.01	0.1763	0.1761	4.97	0.1486	0.1493	<i>4.98</i>	0.2199	0.2201	
2	24.98	1	25.00	0.2702	0.2697	24.96	0.7927	0.7931	25.02	0.1545	0.1535	
		2	24.99	0.2433	0.2430	24.97	0.5331	0.5332	25.06	0.3038	0.3019	
		3	25.03	0.3555	0.3545	24.84	0.4993	0.5032	24.92	0.2661	0.2674	
3	49.95	1	50.00	0.4881	0.4871	49.92	1.6441	1.6450	50.03	0.7597	0.7578	
		2	<i>49.98</i>	0.6790	0.6785	49.95	1.5046	1.5046	50.11	1.3008	1.2969	
		3	50.06	0.7748	0.7727	49.67	1.3691	1.3769	<i>49.84</i>	0.7487	0.7514	
4	74.93	1	75.00	1.3845	1.3830	74.88	2.2790	2.2803	75.05	1.2529	1.2501	
		2	74.96	1.4063	1.4056	74.92	2.0770	2.0771	75.17	1.7574	1.7516	
		3	75.09	1.3401	1.3370	74.51	1.9845	1.9962	74.76	0.9990	1.0030	
5	99.90	1	100.01	1.5242	1.5222	99.84	3.0174	3.0191	100.0 6	1.9349	1.9312	
		2	99.95	1.6286	1.6276	99.90	3.1942	3.1944	100.2 3	2.4004	2.3927	
		3	100.12	1.5247	1.5204	99.34	2.8836	2.8992	99.67	1.8321	1.8375	

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

#### 2.9 Prédictions inverses

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

eaux	nne des ons(µmol	titions	Série 1		Séi	rie 2	Série 2	
Niv	Moyel prédicti	répét	Réponse s alignées	prédiction s inverses (µmol/L)	Réponses alignées	prédiction s inverses (µmol/L)	Réponse s alignées	prédiction s inverses (µmol/L)
		1	0.45986	56.59	0.25604	23.63	0.20771	3.24
1	29.14	2	0.42255	41.46	0.26009	24.56	0.26064	10.52
		3	0.46498	58.85	0.31624	39.37	0.21557	4.06
		1	0.47590	63.81	0.40628	70.39	0.40607	52.02
2	62.07	2	0.44084	48.58	0.43920	83.97	0.43009	61.90
		3	0.45663	55.18	0.39464	65.88	0.41827	56.93
		1	0.63595	159.66	0.64422	195.42	0.59562	153.38
3	170.26	2	0.63819	161.31	0.63995	192.63	0.62133	171.25
		3	0.61497	144.64	0.63298	188.11	0.61379	165.91
		1	0.74553	250.21	0.74199	264.91	0.67624	212.71
4	235.40	2	0.74168	246.68	0.71095	241.70	0.70697	237.88
		3	0.74464	249.39	0.71631	245.64	0.61888	169.51
		1	0.81526	318.36	0.82461	331.86	0.80722	329.75
5	314.45	2	0.78323	286.04	0.79601	307.83	0.77631	299.83
		3	0.79292	295.64	0.83537	341.13	0.79695	319.65

#### Tableau XLIV: Concentrations calculées par prédiction inverse pour la Phénylalanine

#### ✓ Tyrosine

X	es	ns	Série 1		Sé	rie 2	Série 2	
Niveau	Moyenne d prédictions (11mol/1)	Répétitio	Réponses alignées	Prédictio ns inverses (µmol/l)	Réponses alignées	Prédictio ns inverses (µmol/l)	Réponses alignées	prédictio ns inverses (umolA)
		1	0.10427	11.15	0.31532	5.08	0.25301	25.36
1	11.74	2	0.13438	12.68	0.26009	-4.06	0.06777	17.51
		3	0.17618	14.81	0.31624	-0.85	0.22018	23.97
		1	0.26970	19.57	0.40628	22.15	0.15359	21.14
2	20.34	2	0.24309	18.22	0.43920	12.86	0.30194	27.43
		3	0.35451	23.89	0.39464	11.80	0.26747	25.97
		1	0.48714	30.65	0.64422	52.60	0.75782	46.74
3	46.92	2	0.67856	40.39	0.63995	47.58	1.29698	69.59
		3	0.77274	45.19	0.63298	43.02	0.75147	46.47
		1	1.38304	76.27	0.74199	75.31	1.25017	67.60
4	72.19	2	1.40563	77.42	0.71095	68.04	1.75167	88.85
		3	1.33701	73.93	0.71631	65.15	1.00306	57.13
		1	1.52224	83.36	0.82461	101.71	1.93120	96.46
5	96.38	2	1.62764	88.73	0.79601	107.98	2.39276	116.01
		3	1.52049	83.27	0.83537	97.43	1.83750	92.49

#### 2.10 Justesse

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

#### ✓ Phénylalanine

## Tableau XLVI: Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour la Phénylalanine

Niveau de concentration	1	2	3	4	5
Moyenne des Concentrations introduites (μmol/L)	30.0133	60.0265	180.0795	240.1060	300.1325
Moyenne des Concentrations calculées (µmol/L)	29.1412	62.0741	170.2570	235.4042	314.4536
Biais absolu	-0.8720	2.0476	-9.8225	-4.7018	14.3211
Biais relatif (%)	-2.9055	3.4111	-5.4546	-1.9582	4.7716
Taux de recouvrement	97.0945	103.4111	94.5454	98.0418	104.7716

#### PARTIE PRATIQUE

#### ✓ Tyrosine

Tableau XLVII: Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de
validation pour la Phénylalanine

Niveau de concentration	1	2	3	4	5
Moyenne des Concentrations introduites (µmol/L)	4.9951	24.9753	49.9506	74.9260	99.9013
Moyenne des Concentrations calculées (µmol/L)	11.7364	20.3374	46.9157	72.1911	96.3819
Biais absolu	6.7413	-4.6379	-3.0349	-2.7348	-3.5194
Biais relatif (%)	134.9594	-18.5700	-6.0758	-3.6500	-3.5228
Taux de recouvrement	234.9594	81.4300	93.9242	96.3500	96.4772

#### 2.11 Fidélité

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

#### ✓ Phénylalanine

#### Tableau XLVIII: Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour la Phénylalanine

Niveaux de Concentrations	1	2	3	4	5
Concentration moyenne retrouvé	29.14	62.07	170.26	235.40	314.45
SCE résiduelle	366.68	342.73	364.18	2706.67	1605.11
SCE totale	3590.60	923.03	2605.23	6419.93	2709.77
SCE inter-séries	3223.91	580.30	2241.05	3713.26	1104.66
Ecart type de répétabilité	7.82	7.56	7.79	21.24	16.36
Ecart type inter-séries	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ecart type de fidélité intermédiaire	7.82	7.56	7.79	21.24	16.36
CV de répétabilité	26.83	12.18	4.58	9.02	5.20
CV de fidélité intermédiaire	26.83	12.18	4.58	9.02	5.20

#### ✓ Tyrosine

### Tableau XLIX: Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour Tyrosine

Niveaux de Concentrations	1	2	3	4	5
Concentration moyenne retrouvé	11.74	20.34	46.92	72.19	96.38
SCE résiduelle	84.82	104.13	507.79	583.37	393.04
SCE totale	831.47	232.50	872.34	648.78	964.23
SCE inter-séries	746.65	128.37	364.55	65.41	571.19
Ecart type de répétabilité	3.76	4.17	9.20	9.86	8.09
Ecart type inter-séries	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ecart type de fidélité intermédiaire	3.76	4.17	9.20	9.86	8.09
CV de répétabilité	32.04	20.48	19.61	13.66	8.40
CV de fidélité intermédiaire	32.04	20.48	19.61	13.66	8.40

#### 2.12 Exactitude

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

					S	Séries (Jou	r)			
×	Su		1			2			3	
Niveau	répétitio	Concentra tion introduite	Concentra tion prédite (nmol <i>I</i> .)	Exactitude relative (%)	Concentra tion introduite	Concentra tion prédite (nmol <i>I</i> .)	Exactitude relative (%)	Concentra tion introduite	Concentra tion prédite (nmol <i>I</i> .)	Exactitude relative (%)
	1	30.00	56.588	-46.982	30.12	23.627	27.470	29.99	3.238	826.273
1	2	30.01	41.461	-27.624	30.04	24.560	22.330	30.01	10.522	185.243
	3	29.99	58.846	-49.037	30.00	39.374	-23.803	29.95	4.055	638.662
2	1	60.00	63.812	-5.968	60.23	70.393	-14.433	59.98	52.019	15.304
	2	60.02	48.582	23.534	60.09	83.965	-28.437	60.03	61.902	-3.027
	3	59.98	55.183	8.693	60.00	65.879	-8.918	59.91	56.932	5.226
	1	180.01	159.663	12.745	180.70	195.421	-7.532	179.94	153.385	17.312
3	2	180.05	161.311	11.615	180.27	192.627	-6.417	180.08	171.21	5.158
	3	179.94	144.641	24.403	180.01	188.107	-4.304	179.72	165.908	8.325
	1	240.01	250.207	-4.074	240.93	264.908	-9.050	239.92	212.714	12.789
4	2	240.06	246.681	-2.683	240.35	241.704	-0.559	240.11	237.880	0.938
	3	239.92	249.393	-3.799	240.01	245.639	-2.290	239.63	169.510	41.364
	1	300.02	318.361	-5.762	301.17	331.856	-9.247	299.90	329.753	-9.054
5	2	300.08	286.036	4.909	300.44	307.830	-2.400	300.14	299.830	0.103
	3	299.90	295.641	1.440	300.02	341.126	-12.051	299.53	319.651	-6.293

 Tableau L: Résultats du calcul de l'exactitude relative de la Phénylalanine

						Séries (Jo	ur)			
	(6		1			2			3	
Niveaux	répétitions	Concentration introduite (umol /L)	Concentration prédite ۱۰۰۰۰۰۱ ۱۱	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (,,,,,,,)	Concentration prédite (umol /L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (umol /L)	Concentration prédite (µmol /L)	Exactitude relative (%)
	1	5.00	11.146	-55.138	4.99	5.077	-1.674	5.00	25.357	-80.269
1	2	5.00	12.679	-60.586	4.99	-4.061	-222.997	5.01	17.509	-71.378
	3	5.01	14.808	-66.196	4.97	-0.854	-681.924	4.98	23.966	-79.205
	1	25.00	19.571	27.746	24.96	22.155	12.661	25.02	21.144	18.306
2	2	24.99	18.216	37.172	24.97	12.865	94.124	25.06	27.430	-8.652
	3	25.03	23.891	4.765	24.84	11.795	110.561	24.92	25.969	-4.047
	1	50.00	30.646	63.164	49.92	52.600	-5.096	50.03	46.744	7.030
3	2	49.98	40.394	23.718	49.95	47.585	4.966	50.11	69.586	-27.984
	3	50.06	45.191	10.770	49.67	43.020	15.461	49.84	46.475	7.235
	1	75.00	76.274	-1.665	74.88	75.305	-0.564	75.05	67.603	11.009
4	2	74.96	77.425	-3.180	74.92	68.045	10.106	75.17	88.850	-15.397
	3	75.09	73.930	1.565	74.51	65.154	14.355	74.76	57.134	30.843
	1	100.01	83.364	19.963	99.84	101.710	-1.839	100.06	96.456	3.737
5	2	99.95	88.732	12.643	99.90	107.977	-7.485	100.23	116.011	-13.606
	3	100.12	83.274	20.224	99.34	97.426	1.968	99.67	92.487	7.772

#### Tableau LI: Résultats du calcul de l'exactitude relative de la Tyrosine

#### 2.13 Erreur totale et profil d'erreur totale

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

#### ✓ Phénylalanine

### Tableau LII: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation de la phénylalanine

Niveau	1	2	3	4	5
Moyenne des concentrations théoriques (µmol/L)	30.013	60.027	180.080	240.106	300.133
Biais relatif (%)	-2.906	3.411	-5.455	-1.958	4.772
Biais relatif en valeur absolue	2.906	3.411	5.455	1.958	4.772
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)	26.826	12.176	4.576	9.023	5.201
ERREUR TOTALE (%)	29.732	15.587	10.030	10.981	9.973



#### Figure 39: Profil d'erreur totale relative de la Phénylalanine.

#### ✓ Tyrosine

## Tableau LIII: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration desstandards de validation de la tyrosine

Niveau	1	2	3	4	5
Moyenne des concentrations théoriques (µmol/L)	4.995	24.975	49.951	74.926	99.901
Biais relatif (%)	134.959	-18.570	-6.076	-3.650	-3.523
Biais relatif en valeur absolue	134.959	18.570	6.076	3.650	3.523
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)	32.037	20.484	19.609	13.659	8.397
ERREUR TOTALE (%)	166.996	39.054	25.685	17.309	11.920



Figure 40 : Profil d'erreur totale relative de la Tyrosine.

#### 2.14 Intervalle de tolérance

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

## Tableau LIV: Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration pour la Phénylalanine

Niveaux	1	2	3	4	5
<b>Concentration moyenne</b> <b>théorique</b> (μmol/L)	30.01	60.03	180.08	240.11	300.13
Nombre de séries (I)	3	3	3	3	3
Nombre de mesures (IJ)	9	9	9	9	9
Nombre de répétitions (J)	3	3	3	3	3
Rapport des variances (R)	0	0	0	0	0
Coefficient B <sup>2</sup>	1	1	1	1	1
Nombre de degrés liberté	7.714285714	7.714285714	7.714285714	7.714285714	7.714285714
Probabilité tolérance (bêta)	80%	80%	80%	80%	80%
t Student bas	1.414923928	1.414923928	1.414923928	1.414923928	1.414923928
t Student haut	1.39681531	1.39681531	1.39681531	1.39681531	1.39681531
Facteur de couverture	1.477826376	1.477826376	1.477826376	1.477826376	1.477826376
Ecart-type de tolérance	8.24037353	7.966740881	8.212247633	22.3883021	17.24072748
Intervalle de tolérance					
Limite intervalle tolérance basse	16.96337388	50.3005956	158.1206825	202.3182188	288.9748074
Limite intervalle tolérance haute	41.31905658	73.84751522	182.3932348	268.4902655	339.932411
Limite intervalle tolérance basse	-43.47	-16.21	-12.19	-15.74	-3.72
Limite intervalle tolérance haute	37.68	23.02	1.28	11.82	13.26

Tableau LV: Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration p	our
la Tyrosine	

Niveaux	1	2	3	4	5
<b>Concentration</b> <b>moyenne théorique</b> (µmol/L)	5.00	24.98	49.95	74.93	99.90
Nombre de séries (I)	3	3	3	3	3
Nombre de mesures (IJ)	9	9	9	9	9
Nombre de répétitions (J)	3	3	3	3	3
Facteur de couverture de l'intervalle de tolérance					
Rapport des variances (R)	0	0	0	0	0
Coefficient B <sup>2</sup>	1	1	1	1	1
Nombre de degrés liberté	7.714285714	7.714285714	7.714285714	7.714285714	7.714285714
Probabilité tolérance (bêta)	80%	80%	80%	80%	80%
t Student bas	1.414923928	1.414923928	1.414923928	1.414923928	1.414923928
t Student haut	1.39681531	1.39681531	1.39681531	1.39681531	1.39681531
Facteur de couverture	1.477826376	1.477826376	1.477826376	1.477826376	1.477826376
Ecart-type de tolérance	3.963370633	4.391291254	9.697210719	10.39382232	8.531424721
Intervalle de tolérance					
Limite intervalle tolérance basse	5.879195877	13.84783303	32.58493833	56.83087298	83.77394995
Limite intervalle tolérance haute	17.5935432	26.82696511	61.24652588	87.55140254	108.9898789
Limite intervalle tolérance basse	17.70	-44.55	-34.77	-24.15	-16.14
Limite intervalle tolérance haute	252.22	7.41	22.61	16.85	9.10

#### 2.15 Profil d'exactitude

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

Les deux profils d'exactitude obtenus en utilisant les fonctions choisies sont représentés cidessous :



#### ✓ Phénylalanine

Figure 41: Profil d'exactitude de la Phénylalanine

#### ✓ Tyrosine



Figure 42: Profil d'exactitude de la Tyrosine

#### 2.16 Linéarité

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



#### ✓ Phénylalanine

Figure 43: Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Phénylalanine

#### ✓ Tyrosine



Figure 44: Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Tyrosine

#### 2 Limites de quantification :

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

#### ✓ Phénylalanine

A partir du profil d'exactitude de la Phénylalanine on constate qu'il existe deux points d'intersection entre la borne supérieure et inférieure de l'intervalle de tolérance et les limites supérieure et inférieure d'acceptabilité, mais c'est le point supérieur qui est le premier et ceci entre le deuxième et le troisième niveau de concentration, ce point constitue la limite basse de l'intervalle de quantification (intervalle de dosage) et son calcule sera détaillé ci-dessous.

Niveau de concentration	Niveau 2	Niveau 3	
Concentration moyenne théorique	60.03	180.80	
Limite intervalle tolérance haute	73.84751522	182.3932348	
Limite d'acceptabilité haute	69.03	207.92	
	Pente	Origine	
Droite de l'intervalle tolérance	0.898780488	19.8937225	
Droite d'acceptabilité	1.15	0.00000	
Limite de quantification BASSE	79.1886043 μmol/L		

#### Tableau LVI : Limites de quantification de la phénylalanine

En conclusion les limites de quantification validée de la Phénylalanine sont : **[79.19 ; 300]** µmol/l.

#### ✓ Tyrosine

D'après le profil d'exactitude, toutes les limites de l'intervalle de tolérance sortent des limites d'acceptabilité et la méthode analytique essayée n'est pas valide dans le domaine de concentration étudié et suivant les exigences fixées au préalable ( $\beta = 80\%$  et  $\lambda = \pm 15$ ).

## Discussion

#### 3 Discussion

Les concentrations sériques ou plasmatiques de Phe et Tyr sont habituellement mesurées par des méthodes HPLC pour les acides aminés totaux. L'inconvénient de ces méthodes est que la dérivation est nécessaire et qu'une analyse pourrait durer jusqu'à 85 min. Récemment plusieurs méthodes ont été créées qui sont basées sur la chromatographie liquide combinée à la spectrométrie de masse (LC / MS) et détection UV. Certaines de ces méthodes sont spécifiquement consacrées à l'utilisation de taches de sang séché adaptées au dépistage néonatal de la phénylcétonurie (PCU).

Toutefois, pour des études spécifiques, souvent seulement des concentrations de Phe et Tyr mais pas tous les autres acides aminés, sont intéressent à doser.

Par conséquent, nous avons développé une méthode HPLC en phase inverse sensible pour la détermination simultanée de Phe et Tyr basées sur une méthode créée plus tôt pour le tryptophane et l'analyse de kynurénine.

La Phe et Tyr, sont identifiés et quantifiés par leurs fluorescences naturelles, ce qui garantit une sensibilité élevée[58].

Après une de longues étapes d'optimisation du protocole original on a pu valider le dosage de la Phe et Tyr dans le plasma hépariné humain selon les recommandations de SFSTP 2006. Cependant les performances analytiques obtenues via cette technique sont meilleures pour la phénylalanine par rapport à la tyrosine.

#### ✓ Spécificité et effet matrice

#### • Comparaison des chromatogrammes :

Comme on a utilisé une matrice biologique qui contient déjà une quantité des deux acides aminés, on ne peut pas comparer les chromatogrammes obtenus à partir des standards d'étalonnage sans matrice avec ceux obtenus par les standards avec matrice.

Mais on peut confirmer que les pics obtenus sont bien ceux des deux substances étudiées en comparant les résultats du blanc Albumine (non chargé) avec ceux du standard d'étalonnage sans matrice, ainsi on a pu enregistrer les temps de rétentions spécifiques pour chaque acide aminé.

#### PARTIE PRATIQUE

 La Comparaison des deux pentes et des deux droites de régression a donnée les résultats suivants :

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

#### Tableau LVII : Résultats de comparaison des pentes des droites de régression

On peut dire qu'avec un risque de 20% (qui est un risque très acceptable en milieu biologique, statistiquement la méthode n'a pas d'effet matrice ni d'erreur systématique pour la Phe et la Tyr.

#### ✓ Le choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude élucidés et les intervalles de dosage calculés, le choix a été porté sur la fonction de réponse qui donne l'intervalle de dosage le plus élargi à savoir

-La fonction :  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  avec un étalonnage sans matrice pour la phénylamine.

-Pour la Tyrosine la fonction de réponse étudiée (y = bx + a avec matrice) n'est pas valide sur l'ensemble des concentrations testées, mais son choix est basé sur le fait qu'on peut obtenir des résultats meilleurs si on se limite à des conditions moins exigeantes ( $\beta = 67\%$  et  $\lambda = \pm 15\%$  ou  $\pm 20\%$ ) comme proposé dans la revue SFSTP pour les analyses biologiques.

#### ✓ Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérées comme étant la valeur de référence est assez étroit pour tous les niveaux de la Phénylalanine (biais relatif < 10%).

Mais on remarque que pour la Tyrosine que le premier et le deuxième niveau, la concentration moyenne prédite s'éloigne de la valeur de référence, compte tenu du fait que les biais relatifs sont inférieurs à10% (en valeur absolue) pour les trois niveaux supérieurs alors que pour les premiers niveaux, le biais relatif est supérieur à 10 %.

#### ✓ Fidélité

Le degré de dispersion des concentrations prédites obtenues de la Phénylalanine est assez étroit pour les niveaux 3,4 et 5 (CV < 10%) alors qu'il augmente pour le premier et le deuxième niveau (CV > 10%).

Pour la Tyrosine on constate que les coefficients de variation sont assez élevés (CV > 10%) pour tous les niveaux de concentration justifiant le manque de fidélité pour cet acide aminé.

Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, ils sont une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, en d'autre termes elles ne renseignent pas sur la qualité des résultats et ne permettent pas de prendre une décision sur la validité de la méthode.

#### ✓ Validité de la méthode analytique

#### • Erreur totale

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

Pour la Phénylalanine : les premiers niveaux de concentration (30 et 60umol/L) présentent une erreur totale relative dépassant les 10%, cependant les autres niveaux ont une erreur totale assez acceptable (<10%). Et ceci est confirmé par l'erreur maximale observée pour les premiers niveaux lors du calcul d'exactitude relative.

Pour la Tyrosine : on constate une erreur totale qui dépasse les 10% pour les quatre premiers niveaux.

Les résultats obtenus en termes de justesse, de fidélité et d'erreur totale pour le premier niveau de concentration peuvent être expliqués par le fait que l'erreur sur les prises d'essai et les dilutions est d'autant plus grande que la concentration du niveau est faible.

#### ✓ Profil d'exactitude

- Phénylalanine : Avec la fonction d'étalonnage choisit on peut dire que la méthode analytique étudiée est valide dans des limites de quantification entre [79.19; 300] μmol/L et que dans cette intervalle, 80% des futures résultats se situeront dans les limites d'acceptabilité de λ = ±15.
- Tyrosine : le profil d'exactitude montre que la méthode n'est pas valide avec les objectifs fixés au préalable ( $\beta = 80\%$  et  $\lambda = 15\%$ ) mais la validité peut être

obtenue si on fixe des objectifs proposé par la revue de SFSTP à savoir la règle de 4/6/15 qui veut dire que dans les cas des analyses biologiques, on peut accepter que 4 mesures sur 6 ( $\beta = 67\%$ ) se situeront dans des limites d'acceptation de 15%.On peut ainsi calculer les limites de quantification qui vont s'étaler entre [70.48 ; 100] µmol/L



Figure 45: Profil d'exactitude de la Tyrosine avec ( $\beta = 67\%$  et  $\lambda = 15\%$ ). Et si on prend  $\lambda = 20\%$  (ce qui est acceptable en milieux biologique), l'intervalle de dosage devient [68.85 ; 100] µmol/L:



Figure 46: Profil d'exactitude de la Tyrosine avec ( $\beta = 67\%$  et  $\lambda = 20\%$ ).

#### ✓ Linéarité

- Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est acceptable ( $R^2 = 0,94$  pour la Phénylalanine et 0.93 pour la Tyrosine).
- Bien que ce coefficient ne renseigne que très peu sur la qualité de la régression, sa valeur peut nous orienter, et le fait qu'elle est proche de 1 pour les deux acides aminés on peut conclure que la linéarité de la méthode est acceptable.

#### En conclusion :

- ✓ La validation des méthodes analytique en milieux biologique présente des difficultés énormes en terme d'application des protocoles de dosage, de la complexité des matrices et la nécessité de matériel adéquat et adapté... et ceci sans parler du temps et d'effort qu'il faut pour procéder à une validation.
- ✓ La méthode analytique proposée est valide pour la Phénylalanine dans un intervalle de dosage allant du domaine des valeurs biologiques normales vers les valeurs pathologiques, ce qui permet détecter les hyperphénylalaninémie orientant ainsi les cliniciens pour ce type de pathologie.
- ✓ Pour l'utilisation en routine de cette méthode, et vu le choix de la racine carré comme fonction de réponse, il ne faut pas oublier de calculer à chaque fois les concentrations par transformation inverse de la racine carrée (puissance 2) des résultats obtenus.
- ✓ Notre choix du protocole V4 avec deux types d'étalonnage (avec et sans matrice) a permet d'acquérir beaucoup d'information sur le dosage des acides aminés aromatiques dans le plasma par HPLC, à savoir la non existence d'effet matrice et nous donne ainsi un large choix des fonctions de réponse en suivant les objectifs fixés au préalable.
- ✓ Les résultats non valides de la Tyrosine nous laisse penser à proposer des recommandations afin d'améliorer la méthode de dosage et d'obtenir de meilleurs résultats à savoir :
  - l'utilisation d'une précolonne qui permet d'éliminer les interférences dues à la complexité de la matrice.
  - l'essai d'un plan d'expérience qui permet d'optimiser le protocole opératoire.
  - Procéder à une étape de pré validation pour améliorer le mieux le protocole de validation.

#### Fiche technique de la méthode de dosage

#### Principe de dosage :

La méthode consiste à séparer la Tyr et la Phe présentes dans un plasma hépariné par HPLC et les quantifier par un détecteur fluorimétrique en présence d'un étalon interne la N- méthyl L-phénylalanine hydrochloride.

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

La méthode de dosage de la Phe est valide dans l'intervalle [79.19 ; 300]  $\mu$ mol/L où 80% des futures résultats se situeront dans les limites d'acceptabilité de  $\lambda = \pm 15\%$ .

Pour la Tyr les limites de quantification sont de [68.85 ; 100]  $\mu$ mol/L et dans cette intervalle, 67% des futures résultats se situeront dans les limites d'acceptabilité de  $\lambda = \pm 20\%$ .

Au-delà de ces intervalles nous devons faire des dilutions de sorte à être dans l'intervalle de validité de la méthode.

#### **Réactifs utilisés :**

- ► KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- ► TCA

#### Mode opératoire :

Le mode opératoire est résumé comme suit :

#### PARTIE PRATIQUE



Figure 47: Mode opératoire de la méthode.

#### **Conditions chromatographiques :**

Le tableau suivant résume les conditions chromatographiques de la méthode de dosage

Colonne	Longueur 15cm, C8
Détection	$\lambda_{\text{émission}} = 302 \text{nm}$
	$\lambda_{\text{excitation}} = 210 \text{nm}$
Volume d'injection	10µl
Débit	0.8ml/min
Température	Ambiante

Tableau LVIII: Conditions chromatographique de la méthode

#### **Expressions des résultats**

Les résultats obtenus pour la Phe sont sous la forme racine carré des airs de pic /airs de pic EI et par extrapolation sur la courbe d'étalonnage on obtient la racine carré de la concentration plasmatique de l'échantillon puis faire le carré de cette racine pour obtenir la concentration plasmatique recherchée.



Figure 48:Droite d'étalonnage de la phénylalanine.

Pour la tyrosine vue que la fonction d'étalonnage choisi est Y=bx+a donc il suffit d'extrapoler le rapport des aires de pics sur la courbe d'étalonnage pour avoir la concentration plasmatique recherché



Figure 49:Droite d'étalonnage de la tyrosine

#### Les valeurs de références :

Les valeurs de référence n'étant pas établis nous allons utiliser comme références les valeurs physiologiques international à savoir [Phe] <80µmol/l et [Tyr] <120µmol/l.

## Conclusion

#### CONCLUSION

#### Conclusion

La PCU et la tyrosinémie sont deux aminoacidopathies congénital parmi plusieurs d'autres qui regroupent un ensemble de désordres affectant le métabolisme des acides aminés, et leur dépistage a bas âge permet de réduire les séquelles et d'offrir une meilleure qualité de vie. Leur diagnostique requière le dosage des AA impliqués ou de leurs métabolites.

Plusieurs techniques sont développées dont le rapport d'analyse qu'il délivre aux prescripteurs (Cliniciens) constitue un élément précieux d'aide à la prise de décision sur le plan diagnostique et thérapeutique A cet égard, la qualité du rapport d'analyse ainsi que la fiabilité demeurent inéluctables. Pour ce faire, les biologistes utilisent des méthodes analytiques qui doivent être valides.

Le but de cette thèse est de mettre au point et de valider une méthode de dosage simultané de la phénylalanine et de la tyrosine dans le plasma par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outils de décision de validation ; démarche harmonisée proposée par une commission SFSTP publiée en 2006 dans le guide STP Pharma Pratique.

La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible, et exact dans l'intervalle [79.19 ; 300]  $\mu$ mol/l pour la phénylalanine avec un risque d'avoir au maximum 20% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-15% ; +15%].

Concernant la tyrosine, la méthode est valide dans l'intervalle [68.85 ; 100]  $\mu$ mol/l avec un risque d'avoir au maximum 33% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-20% ; +20%].

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

La méthode atteint deux objectifs qui la distinguent des autres méthodes HPLC actuellement utilisées pour le dosage des acides aminés ; elle est en effet rapide « résultat en 15 mn » et La sensibilité élevée garantie par la détection de fluorescence dont l'intensité est considérablement plus importante pour la Tyr par rapport à la Phe qui est d'environ 5 à 10 fois moins sensible.

#### CONCLUSION

En raison de la nature fluorescence de Phe et Tyr, aucune étape de dérivatisation n'est requise. La technique révèle des chromatogrammes propres avec des pics parasites rarement apparents.

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

Limites et recommandations :

Les résultats non valides de la Tyrosine nous laisse penser à proposer des recommandations afin d'améliorer la méthode de dosage et d'obtenir de meilleurs résultats à savoir :

- L'utilisation d'une pré-colonne qui permet d'éliminer les interférences dues à la complexité de la matrice.
- L'essai d'un plan d'expérience qui permet d'optimiser le protocole opératoire.
- Procéder à une étape de pré validation pour améliorer le mieux le protocole de validation.

# Bibliographie

#### Les références bibliographiques

1. Thioulouse E, Berthe M-C, Couderc R. Les aminoacidopathies héréditaires (AAH). Revue Francophone des Laboratoires. 2010;2010(425):53–64.

Feinberg M. Approche globale et harmonisée de la validation. Spectra analyse.
 2006;35(249):16.

3. Moussard C. Biochimie structurale et métabolique. Boeck Supérieur; 2006.

4. Audigié C, Zonszain F. Biochimie métabolique.pdf. Doin; 259 p.

5. Jacotot B, Campillo B. Nutrition humaine. Paris: Masson; 2007. 311 p.

6. Vaubourdolle M. Biochimie Hématologie, tome 2, Pharmacie-biologie. 3 éme. 2007. 1116 p.

7. Lonlay P de. Prise en charge des maladies metaboliques. Paris: Springer; 2010.

8. Thioulouse E, Berthe M-C, Couderc R. Les aminoacidopathies héréditaires (AAH). Revue Francophone des Laboratoires. 2010;2010(425):53–64.

9. Dhondt J-L. Phénylalanine.

10. KAMOUN Pierre, FREJAVILLE Jean-Pierre. Guide des examens de laboratoire [Internet]. 4e éd. [cité 11 juin 2017]. Disponible sur: https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/guide-des-examens-delaboratoire-4-ed/kamoun/descriptif-9782257142450

 Wurtman RJ, Ritter-Walker E, éditeurs. Dietary Phenylalanine and Brain Function [Internet].
 Boston, MA: Birkhäuser Boston; 1988 [cité 11 juin 2017]. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-9821-3

12. Heylen E, Scherer G, Vincent M-F, Marie S, Fischer J, Nassogne M-C. Tyrosinemia Type III detected via neonatal screening: Management and outcome. Molecular Genetics and Metabolism. nov 2012;107(3):605-7.

13. Beaumont S. Biochimie-UE1: 1re année santé. ÉdiScience : Dunod; 2015.

14. Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique (2e ed.) - GAZENGEL Jean-Marie, ORECCHIONI Anne-Marie - Google Livres [Internet].

15. Williamson D, éditeur. Phenylalanine: dietary sources, functions and health effects. New York: Nova Publishers; 2015. 100 p. (Chemistry research and applications).

16. Weinman S. Toute la biochimie. Paris: Dunod; 2004.

17. Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. The Journal of nutrition. 2007;137(6):1539S–1547S.

18. Degroot LJ, Niepomniszcze H. Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. Metabolism. 1977;26(6):665–718.

19. Turakulov YK, Gagel?gans AI, Salakhova NS, Mirakhmedov AK, Gol?ber LM, Kandror VI, et al. Thyroid Hormones [Internet]. Turakulov YK, éditeur. Boston, MA: Springer US; 1975.

20. Métabolisme normal des hormones stéroïdes et des hormones thyroïdiennes [Internet]. [cité 30 juill 2017]. Disponible sur: http://www.scom.ups-tlse.fr/pharma/texte.html

21. Ma X-P, Sun X-X, éditeurs. Melanin: biosynthesis, functions, and health effects. [Hauppauge] N.Y: Nova Science Publishers; 2012. 255 p. (Dermatology--laboratory and clinical research).

22. Pigmentation de la peau [Internet]. [cité 16 juill 2017]. Disponible sur: http://sciences-physiques.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille/PIGMENTDELAPEAU.html

23. Haute Autorité de Santé. Phénylcétonurie Protocole national de diagnostic et de soins. 2010.

24. Feillet F. Phénylcétonurie. La Presse Médicale. 2006;35(3):502–508.

25. Parker JN, Parker PM. Phenylketonuria: a Bibliography and Dictionary for Physicians, Patients, and Genome Researchers. [Internet]. ICON Group International Inc.; 2007.

26. B. Toussaint, Fadila Laanan, T. Pereira, Ph. Goyens, H. Laeremans, M.F. Vincent, et al. Le dépistage néonatal des anomalies métaboliques. 2013.

27. Symptômes de la Phénylcétonurie [Internet]. News-Medical.net. 2012 [cité 16 juill 2017]. Disponible sur: http://www.news-medical.net/health/Symptoms-of-PKU-(French).aspx

28. l'Europe C de. Pharmacopée européenne 6ème Édition. Conseil de l'Europe; 2007. 3538 p.

29. Cheillan D, Cognat S, Vianey-Saban C, Maire I, Dorche C. La spectrométrie de masse en tandem appliquée au dépistage néonatal des maladies héréditaires du métabolisme: le point sur les utilisations actuelles. In: Annales de Biologie Clinique [Internet]. 2004.

30. Cournarie A. La phénylcétonurie, du dépistage aux nouvelles thérapeutiques. UNIVERSITE DE LIMOGES; 2011.

31. Chabrol B, de Lonlay P. Maladies métaboliques héréditaires [Internet]. Doin; 2011.

32. Feillet F, Bonnemains C. La phénylcétonurie : nouveaux traitements. Archives de P?diatrie. oct 2013;20(10):1165-8.

33. Abadie V, Berthelot J, Feillet F, Maurin N, Mercier A, Ogier de Baulny H, et al. Consensus national sur la prise en charge des enfants dépistés avec une hyperphénylalaninémie. Archives de Pédiatrie. mai 2005;12(5):594-601.

34. Laflamme N, Jacob R, Institut national de santé publique du Québec, Direction systèmes de soins et services. Rapport d'évaluation du Programme québécois de dépistage sanguin des maladies génétiques chez le nouveau-né. Québec: Direction systèmes de soins et services, Institut national de santé publique du Québec; 2006.

35. Parker JN, Parker PM. Tyrosinemia: a Bibliography and Dictionary for Physicians, Patients, and Genome Researchers. [Internet]. ICON Group International Inc.; 2007.

36. RESERVED IU--AR. Orphanet: Tyrosinemia type 1 [Internet]. [cité 11 juin 2017]. Disponible sur: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\_Exp.php?Lng=GB&Expert=882

37. Orphanet: Tyrosinémie type 1 [Internet].

38. Couce ML, Aldámiz-Echevarría L, Baldellou A, Blasco J, Bueno MA, Dalmau J, et al. Recomendaciones y manejo de la tirosinemia hereditaria Tipo I o Tirosinemia hepatorrenal. Anales de Pediatría. nov 2010;73(5):279.e1-279.e4.

39. Cyr D, Giguère R, Villain G, Lemieux B, Drouin R. A GC/MS validated method for the nanomolar range determination of succinylacetone in amniotic fluid and plasma: An analytical tool for tyrosinemia type I. Journal of Chromatography B. févr 2006;832(1):24-9.

40. de Laet C, Dionisi-Vici C, Leonard JV, McKiernan P, Mitchell G, Monti L, et al. Recommendations for the management of tyrosinaemia type 1. Orphanet journal of rare diseases. 2013;8(1):8.

41. Dreyfus JC. Un nouveau traitement médical de la tyrosinémie de type I. 1992.

42. AI B, MA B. LA TYROSINEMIE TYPE II. A PROPOS D'UN CAS. Bull Soc belge Ophtalmol. 2005;296:57–61.

43. Szymanska E, Sredzinska M, Ciara E, Piekutowska-Abramczuk D, Ploski R, Rokicki D, et al. Tyrosinemia type III in an asymptomatic girl. Molecular Genetics and Metabolism Reports. déc 2015;5:48-50.

44. Jean-Claude BOUVIER. Validation globale d'une méthode d'analyse quantitative a partir de son profil d'exactitude.

45. Feinberg M. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. 2013.

46. ANSES. Guide de validation des méthodes d'analyses. 2015.

47. M F. Labostat – Guide de validation des méthodes d'analyse. Lavoisier; 2009. 387 p.

48. Hubert P, Nguyen-Huu J, Boulanger B, Chapuzet E. Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches.PARTIE I ; Généralité.

49. Guideline IHT, others. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1) [Internet]. 2005.

50. Validation des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches Partie II - Statistiques - Editions de santé [Internet].

51. Feinberg M. (2010a) Principes et vocabulaire in Validation des méthodes d'analyse.pdf.

52. Rozet E, Hubert C, Ceccato A, Dew? W, Ziemons E, Moonen F, et al. Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results. Journal of Chromatography A. juill 2007;1158(1-2):126-37.

53. Feinberg M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. Journal of Chromatography A. juill 2007;1158(1-2):174-83.

54. Michel Laurentie. Compléments sur la quantification des résultats pondération et transformation.pdf.

55. Pinguet I. Validation analytique : application de la proc\_edure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. 2015.

56. Gustavo Gonz?lez A, ?ngeles Herrador M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. TrAC Trends in Analytical Chemistry. mars 2007;26(3):227-38.

57. Guideline IHT, others. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1) [Internet]. 2005.

58. Neurauter G, Scholl-Bürgi S, Haara A, Geisler S, Mayersbach P, Schennach H, et al. Simultaneous measurement of phenylalanine and tyrosine by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Clinical Biochemistry. déc 2013;46(18):1848-51.

59. Skoog DA, West DM. Chimie analytique. De Boeck Superieur; 2015. 1174 p.

60. Mahuzier G, Hamon M. Abrégé de chimie analytique: Méthodes de séparation. tome II. Masson; 1997. 262 p.

61. Rouessac F, Rouessac A. Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes. Paris: Dunod; 2004.

62. Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen - HPLC Principe et appareillage [Internet].

63. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. Hoboken, N.J: Wiley; 2010. 912 p.

64. Vogel AI, Jeffery GH, Vogel AI. Vogel's textbook of quantitative chemical analysis. 5th ed. Harlow, Essex, England : New York: Longman Scientific & Technical ; Wiley; 1989. 877 p.

65. Vogel, Mendhman, Denney, Barnes, Thomas. Analyse chimique quantitative de VOGEL. 6eme éd. 2000.

## Annexes

La chromatographie est une méthode analytique qui est largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques des mélanges complexes.[59]

#### 1 Généralité sur la chromatographie

#### **1.1** Principe de la chromatographie

La séparation d'un mélange en ses différents constituants est le but de toute chromatographie. Le phénomène ou les procédés utilisés varient selon les types de méthodes choisies, mais, toutes ont un certain nombre de points en commun.

 Les composés se répartissent dans deux phases non miscibles jusqu'à l'établissement d'un équilibre. Celui-ci dépend des propriétés de chaque composé vis-à-vis des phases considérées et se caractérise par un coefficient de partage K<sub>S</sub>

$$K_S = \frac{C_S}{C_M}$$

 $C_{S:}$  concentration du soluté dans la phase stationnaire  $C_{M:}$  concentration du soluté dans la phase mobile

- Le renouvellement continu de la phase mobile déplace cet équilibre et entraine une migration de chaque substance tout au long de la phase stationnaire.
- La séparation d'un mélange en ses composés tient au fait que chacun présentant une répartition entre les deux phases qui lui est propre, migre avec une vitesse différente.
   [60]

#### 1.2 Théories de base de la chromatographie

#### 1.2.1 Théorie des plateaux

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

Une colonne est constituée de N plateaux théoriques (de même hauteur).La taille des plateaux, H, est appelée Hauteur équivalente à un plateau théorique HEPT[60]

$$HEPT = L/N$$

#### ANNEXES

#### 1.2.2 Théorie cinétique :

Dans la théorie cinétique l'aspect dynamique de la phase mobile est pris en considération ainsi que l'influence de facteurs tels que la température et la pression[60].

#### 1.3 Chromatogramme et grandeurs de rétention

#### ✓ Chromatogramme

Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. Le temps (ou très rarement le volume d'élution) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée.[61]

Le chromatogramme est caractérisé par certain paramètre :

 $T_0 = temps mort$ 

**T**<sub>**R**</sub>= temps de rétention

**h**= Hauteur du pic

 $\omega$ = Largeur du pic

δ= largeur du pic à mi-hauteur

#### ✓ Temps mort T<sub>m</sub>

Est le temps nécessaire pour qu'une espèce non retenue traverse une colonne chromatographique.

#### ✓ Temps de rétention T<sub>R</sub>

Est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition d'un pic de soluté sur le détecteur d'une colonne chromatographique.



Figure 50 : Chromatogramme

#### ✓ Facteur de capacité

Facteur de capacité k'<sub>A</sub>est le rapport des quantités (ou des masses) de A présentes a l'équilibre dans les deux volumes de phases stationnaire et mobile adjacentes. La vitesse de progression du soluté A dans une colonne est liée au facteur de capacité. Peut être exprimé par :

$$\begin{split} \mathbf{K}_{\mathrm{A}}' &= \frac{\mathbf{C}_{\mathrm{S}}\mathbf{V}_{\mathrm{S}}}{\mathbf{C}_{\mathrm{M}}\mathbf{V}_{\mathrm{M}}} = \mathbf{K}_{\mathrm{A}}\frac{\mathbf{V}_{\mathrm{S}}}{\mathbf{V}_{\mathrm{M}}}\\ \\ \mathbf{K}_{\mathrm{A}}' &= \frac{\mathbf{T}_{\mathrm{R}} - \mathbf{T}_{\mathrm{M}}}{\mathbf{T}_{\mathrm{M}}} \end{split}$$

#### 1.4 Qualité de la séparation

#### ✓ Facteur de sélectivité :

Le facteur de sélectivité a d'une colonne pour les deux espèces A et B est défini par :

$$\alpha = \frac{\mathbf{K}_{\mathbf{B}}}{\mathbf{K}_{\mathbf{A}}} = \frac{\mathbf{K}_{\mathbf{B}}'}{\mathbf{K}_{\mathbf{A}}'}$$

Où  $K_B$  est le coefficient de distribution de l'espèce B qui est la plus retenu, et  $K_A$ la coefficient de distribution de A, l'espèce la plus rapidement éluée. Cette définition implique que  $\alpha$  est toujours supérieur à l'unité.

#### ✓ Résolution de la colonne

La résolution  $\mathbf{R}_{\mathbf{S}}$  d'une colonne chromatographique est une mesure quantitative de son aptitude à séparer les analytes A et B. exprimé par la relation suivante :

$$\mathbf{R}_{S} = \frac{2\Delta z}{\omega_{A} + \omega_{B}} = \frac{2[(\mathbf{T}_{R})_{B} - (\mathbf{T}_{R})_{A}]}{\omega_{A} + \omega_{B}}$$

Rs<1 : mauvaise résolution

 $1 < \mathbf{Rs} < 1,4$ : résolution acceptable

 $1,4 < \mathbf{Rs} < 1,6$ : résolution optimale

**R**<sub>s</sub>> 1,6 : résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé

#### ANNEXES

#### 2 Chromatographie liquide haute performance

#### 2.1 Principe et relation de base

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

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

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic[62].

On admet qu'il existe pour chaque pic du chromatogramme une relation linéaire entre son aire (ou sa hauteur) et la quantité du composé responsable de ce pic dans l'échantillon injecté.

Exprimé par la relation suivante :

#### $\mathbf{m_i} = \mathbf{K_i}\mathbf{A_i}$

mi : masse du composé i injectée dans la colonne

Ki : coefficient de réponse absolu du composé i

 $A_i$ : aire du pic d'élution du composé i

#### 2.2 Appareillage

Une installation de CLHP comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement.



Figure 51 : Différents modules de l'HPLC

#### 2.2.1 Réservoir de la phase mobile

Les réservoirs de phase mobile sont des parties simples mais essentielles du système HPLC.

Pour les applications isocratiques utilisant une phase mobile prémélangée, seul un réservoir unique est nécessaire. Lorsque les phases mobiles isocratiques sont mélangées en ligne ou pour les applications en gradient, plus d'un réservoir est utilisé.

Les phases mobiles doivent être exemptes de particules, donc une filtration en phase mobile peut être nécessaire avant de remplir le réservoir[63].

#### 2.2.2 Canalisation

Les différents modules de l'HPLC sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK (ou polyéther-éthérketone), un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels, même sous des pressions élevées (350 bars)[61].

#### 2.2.3 Pompe

La pompe d'un chromatographe a pour rôle de provoquer dans la colonne un écoulement de la phase mobile compatible avec la séparation chromatographique. Ces pompes doivent être très puissantes car la viscosité des solvants et les très fines granulométries des phases stationnaires entrainent une différence de pression ou perte de charge entre le sommet et l'extrémité des colonnes.

On distingue deux sortes de pompes : les pompes à pression constante et les pompes a débit constant[60].

#### 2.2.4 Injecteurs

L'introduction de l'échantillon dans la colonne exige l'ajout d'une quantité exacte d'échantillon à la phase mobile sous pression. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne. Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 30 000 kPa.[63]

Elle fonctionne en deux temps :

- Dans la position chargement, où seule la communication entre pompe et colonne est assurée, l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle.
- Dans la position injection, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60 ° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle[61].

#### 2.2.5 Colonnes

La colonne le cœur de tout système HPLC, se présente comme un tube le plus souvent en acier inoxydable, les dimensions typiques ayant une longueur de 10 à 30 cm et 4 à 5 mm de diamètre intérieur. Ces colonnes sont remplies de phase stationnaire, maintenue entre deux disques poreux situés aux extrémités et dont la taille des particules varie de 5 à 10µm [59,62]

#### 2.2.6 Détecteurs

Le détecteur chromatographique est un transducteur qui convertit une propriété physique ou chimique d'un analyte élué en un signal électrique qui peut être lié à la concentration de l'analyte.(moderne) Chaque détecteur doit réunir un certain nombre de qualités : donner

pour chaque composé détecté une réponse proportionnelle à sa concentration instantanée,

être sensible et avoir peu de bruit de fond et être stable dans le temps.

Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés

: absorption, fluorescence et indice de réfraction[61].
# ANNEXES

### • Détecteurs spectrophotométriques

La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer :  $\mathbf{A} = \boldsymbol{\varepsilon}_{\lambda} \mathbf{l} \mathbf{c}$ 

L'absorbance Ade la phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde  $\lambda$ ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV ou le visible. La phase mobile ne doit pas, ou très peu, absorber par elle-même[61].

### • Détecteur spectrofluorimétrique

Ces dispositifs permettent de détecter les composés fluorescents présents dans la phase mobile en faisant passer l'effluent de la colonne à travers une cellule irradiée avec de la lumière ultraviolette et en mesurant tout rayonnement fluorescent résultant[64].

### • Détecteur réfractométrique

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

Pour cela un faisceau lumineux (mono- ou polychromatique) passe à travers une cellule

comportant deux compartiments dont l'un est rempli avec la phase mobile seule et l'autre

avec l'effluent en sortie de colonne. La différence d'indice entre les deux liquides,

qui apparaît lorsqu'un composé est mélangé à l'éluant, se traduit par un déplacement angulaire du rayon réfracté. Dans la pratique, le signal correspond à la mesure en continu de la rétroaction qu'il faut fournir à un élément optique pour compenser la déviation du faisceau

réfléchi[61].

## • Détecteur électrochimique

Le terme «détecteur électrochimique» en HPLC se réfère habituellement à des détecteurs ampérométriques ou coulométriques, qui mesurent le courant entre les électrodes polarisables et les électrodes de référence qui varie en conséquence de l'oxydation ou de la réduction des solutés[63,65].

























































min






















## TABLE DE STUDENT

La table donne la probabilité α pour que t égale ou dépasse, en valeur absolue, une valeur donnée, en fonction du nombre de degrés de liberté (ddl).

α. ddl	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,142	0,816	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,718	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,706	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1.356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2.080	2,518	2.831	3,819
22	0,127	0,686	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,681	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,678	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,416
120	0,126	0,677	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
œ	0,126	0,675	1,037	1,282	1,645	1,960	2,327	2,577	3,293

Exemple : avec ddl = 10, pour t = 2,228, la probabilité est  $\alpha$  = 0,05

## Résumé

Objectifs :optimiser et valider une méthode HPLC a été développée pour quantifiersimultanément les concentrations plasmatiques dela phénylalanine et de la tyrosine en utilisant la détection par fluorescence sans dérivatisation.

Méthodes : Les protéines plasmatiques sont précipitées avec de l'acide trichloroacétique, la solution de dihydrogénophosphate est utilisée pour la séparation par HPLC en phase inverse « C8 ». Les deux acides aminés sont détectés et quantifiés en utilisant leur fluorescence naturelle à une excitation de 210 nm et des longueurs d'onde d'émission de 302 nm. Un protocole de validation est appliqué suivant la démarche harmonisé de validation proposé par le SFSTP en 2006.

Résultats : La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, et exact dans l'intervalle [79.19 ; 300] µmol/l pour la phénylalanine et [68.85 ; 100] µmol/l pour la tyrosine avec un risque d'avoir au maximum 20% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-15% ; +15%] pour la phénylalanine et33% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-20% ; +20%] pour la tyrosine. Cela atteste la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine pour le diagnostic des PCU et des Tyrosinémie.

Conclusion : La nouvelle méthode HPLC permet un dosage rapide et très sensible de la phénylalanine et de la tyrosine

Mots clés : phénylcétonurie, tyrosinémie, fluorimétrie, HPLC, C8

## Abstract

Objectives: to optimize and validate an HPLC method was developed to simultaneously quantify plasma concentrations of phenylalanine and tyrosine using fluorescence detection without derivatization.

Methods: Plasma proteins are precipitated with trichloroacetic acid, the dihydrogen phosphate solution is used for separation by reverse phase HPLC "C8". Both amino acids are detected and quantified using their natural fluorescence at 210 nm excitation and emission wavelengths of 302 nm. A validation protocol is applied following the harmonized validation approach proposed by the SFSTP in 2006.

Results: The technique developed was specific, linear, and exact in the interval [79.19; 300]  $\mu$ mol/l for phenylalanine and [68.85; 100]  $\mu$ mol/l for tyrosine with a risk of having a maximum of 20% of the measurements outside the acceptance limits set at [-15%; + 15%] for phenylalanine and 36% of measurements outside the acceptance limits set at [-20%; + 20%] for tyrosine. This confirms the validity of the method used and its suitability for routine use in the diagnosis of PCU and Tyrosinemia.

Conclusion: The new HPLC method allows rapid and very sensitive determination of phenylalanine and tyrosine.

Key words: phenylketonuria, tyrosinemia, fluorimetry, HPLC, C8