

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.*  
*Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou*  
*Faculté de médecine*



*Département de pharmacie*  
*Laboratoire de toxicologie*

## **PROJET DE FIN D'ETUDE**

Présenté et soutenu :

**Le 15 juillet 2020**

En vue de l'obtention du diplôme :

**DOCTEUR EN PHARMACIE**

### Thème

Validation d'une méthode analytique de dosage du  
cuivre urinaire par Spectrométrie d'Absorption  
Atomique Flamme.

#### Réalisé par:

-M<sup>elle</sup> : BOUDEHANE Amira

-M<sup>elle</sup> : DELLOUL Sara

-M<sup>elle</sup> : HADDOUCHE Taous

-M<sup>elle</sup> : KOUCEM Katia

#### Encadrées par :

☞ Promotrice: Dr. SADOU Salima

☞ Co-promoteur : Dr. MATMAR Anis

#### Composition du jury :

Pr Mekacher L.R

MCA

Faculté de médecine UMMTO

Président

Dr Belkaid N

MAHU

Faculté de médecine UMMTO

Examinatrice

**ANNÉE UNIVERSITAIRE :**  
**2019/2020**

## Dédicace

☞ À mes chers parents **BOUDEHANE Nadia** et **BOUDEHANE Djamel**

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance pour tous vos sacrifices, votre amour, votre soutien et vos prières tout au long de mes études. Vous avez toujours guidé mes pas vers la réussite, vous avez su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie mais surtout les principes moraux et l'amour de savoir.

En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour vous, recevez ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime, je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir, je vous souhaite une longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.

☞ À mes chers frères, **BOUDEHANE Massinissa** et **BOUDEHANE Kouceila**,

Votre appui et encouragement permanents, votre patience sans fin et votre compréhension sont pour moi le soutien indispensable que vous avez toujours su m'apporter, vous êtes mes anges gardiens et mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats de cette vie.

☞ À la mémoire de ma grand-mère maternelle **BOUKEMICHE Zerfa**,

Qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, le symbole de la bonneté que je pleure à ce jour... qu'elle repose en paix.

☞ À ma tante, son mari, mes adorables cousines et mon oncle **BOUDEHANE Sameh**

Je vous estime beaucoup pour votre soutien moral et votre gentillesse et hospitalité sans égal, vous êtes ma deuxième famille, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon affection

☞ À mes chères copines **DELLOUL Sara**, **HADDOUCHE Taous** et **KOUCEM Katia**

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer mon estime et ma reconnaissance, vous êtes mes sœurs sur qui je peux compter à tout moment .En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

☞ À tous mes amis

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, malgré la distance, vous êtes toujours dans mon cœur, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite Merci à vous tous d'être toujours là pour moi.

B.Amira

## *Dédicace*

A la mémoire de ma mère **BENMOUSSA Saadia**,

J'aurai voulu que tu sois là pour admirer la réussite de tes efforts, le tout Puissant t'a rappelé à ses côtés. Tu resteras plus que jamais un repère et un exemple pour moi à travers non seulement tes conseils mais aussi et surtout le courage et l'amour qui t'ont toujours caractérisée. Qu'Allah t'accepte dans son vaste Paradis.

A mon père **DELLOUL Djamel**,

Mon exemple éternel, mon soutien moral et mon bonheur, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être, ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour ma formation. Que Dieu te préserve pour moi.

A mes chères sœurs **Hadjer** et **Salima** qui m'avaient toujours soutenue, vous avez rempli mes moments de joie et de bonheur. Je vous souhaite tout ce qu'il y a de meilleur.

A mes chers frères **Oussama** et **Aissam** et **Mehdi**

A mes tantes en particulier **Naima**, qui m'a donné la force à continuer toujours vers l'avant, vous avez toujours été présentes pour les bons conseils. Que Dieu vous préserve pour moi.

A mes grands-parents que Dieu vous garde pour nous.

A mon oncle **Saleh** Je te remercie pour tes encouragements et je te souhaite bonheur, santé et prospérité à toi et ton enfant.

A mon adorable tante **DELLOUL Leila**, merci pour ton soutien et encouragement.

A M<sup>elle</sup> **SAYAD Chaima**, j'apprécie vraiment ton soutien inconditionnel ; merci énormément.

A mes très chères copines **HADDOUCHE Taous**, **BOUDEHANE Amira** et **KOUCEM Katia** ; ma deuxième famille, merci pour votre soutien et encouragement, et pour tous les moments qu'on a passés ensemble. J'espère que le lien fort qu'on a pu tisser ensemble au cours de ces années, dures et longues sera durables. J'aurai besoin de toute une vie pour vous remercier et vous décrire combien je vous aime.

D. SARA

# Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes **parents** les plus chères à mon cœur, ma raison de vivre, mon exemple dans cette vie. Je vous remercie de m'avoir donné les moyens de réussir, de m'avoir encouragée et réconfortée au cours de toutes mes années d'études. Je tiens également à vous remercier pour la confiance que vous avez toujours eue en moi et pour les valeurs que vous m'avez imprégnées.

A mes chers frères (**Salim et Midou**) et sœurs (**Djawida, Houria, Sabrina et Lynda**) en particulier ma petite sœur **Kenza** la fleur de notre famille, merci pour votre encouragement qui m'a donné la force pour continuer toujours vers l'avant, que Dieu vous préserve pour moi.

A ma chère Grand-mère Oum Ikheir et mes chères tantes.

A mon oncle **Amar Daoui**, mon ami à qui je raconte tous mes secrets, ma force ; mon deuxième père ; et à sa femme Lamia et ses enfants **Aya, Zakaria, Imad**.

A mon oncle **Amara A**, merci pour votre présence tout au long de mes années d'études et merci d'être toujours présent pour moi.

A ma deuxième famille, les parents de mes copines **Katia K** et **Amira B** et **Sara D**, leurs sœurs en particulier **Salima D** et leurs frères en particulier **Aissam**.

A mes copines **Sara Delloul, Amira Boudehane, Katia Koucem**, la plus belle chose qui m'est arrivée pendant ces six ans. Sara, Amira, Katia, merci pour votre compréhension, votre aide, votre patience. Vous êtes mon monde où je fuis quand je m'angoisse et grâce à vous j'ai pu faire un nouveau départ, j'oublierai jamais ce qu'on a vécu ensemble, nos souvenirs restent gravés à jamais.

H. Taous

# Dédicace

Je dédie ce travail

A mon père **KOUCEM Achour**, et ma mère **KESSAL Malika**,

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant mon chemin.

A mon cher frère **Sofiane**, et ma douce sœur **Liza**

Je vous remercie pour tout, Merci pour votre amour, et pour vos encouragements. Que Dieu vous préserve pour moi.

A mes chères meilleures amies **Taous, Sara, Amira**

Mes conseillères, et amies fidèles, qui m'ont assistée dans les moments difficile et m'ont prise doucement par la main pour traverser des épreuves pénibles, je suis très reconnaissante, et je ne vous remercierai jamais assez pour votre amabilité et votre générosité.

Que Dieu vous protège et vous procure joie et bonheur et que notre amitié restera à jamais.

A mes chers amis **Sadril, Lyna, Lynda, Ouiza**

Merci pour toutes ces années passées ensemble. Je n'oublierai jamais les bons moments que l'on a partagés, ni ceux qui restent à venir.

*K.Katia*

# Remerciements

Avant tout, DIEU merci

En guise de reconnaissance, nous tenons à témoigner nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidées, de près ou de loin, à mener notre mémoire de fin d'étude à son terme.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promotrice **Dr. SADOU Salima** assistante en Toxicologie au CHU de Tizi Ouzou de nous avoir fait l'honneur d'encadrer notre mémoire, merci pour toute votre aide et vos orientations. Nous sommes ravies d'avoir travaillé sous votre guidance et en votre compagnie car outre votre appui scientifique et vos compétences pratiques, vous avez toujours été là pour nous soutenir et nous conseiller au cours de l'élaboration de ce travail. Nous espérons être dignes de votre confiance

Nous tenons à remercier chaleureusement notre Co-promoteur **Dr. MATMAR Anis** assistant en Toxicologie au CHU de Tizi Ouzou nous vous somme très reconnaissantes pour votre patience, votre disponibilité et vos judicieux conseils surtout au cours de la période de la pratique, qui ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Un grand merci aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions :

À **Pr. MEKACHER Lamine Redouane** maître de conférences hospitalo-universitaire et chef de service de Toxicologie au CHU de Tizi-Ouzou et président de la commission nationale anti dopage, nos sincères remerciements pour l'honneur que vous nous faites de bien vouloir présider le jury de notre soutenance, nous vous prions d'accepter notre profond respect.

À **Dr. BELKAID Nawal** maître-assistante en Biochimie et chef de département adjoint de pharmacie chargé de la poste graduation à la faculté de médecine Tizi-Ouzou, veuillez accepter nos sincères remerciements de bien vouloir juger ce travail et de l'enrichir par vos propositions et remarques.

Nous adressons également de sincères remerciements à / aux :

Personnel du laboratoire de toxicologie (au CHU et à la faculté) : **Dr. BELAZOUGUI, Dr. KACI, Dr. HEDHOUM, Dr. YAMANI, Dr. AGUINI, madame HADDAD** et tout le personnel ;

**Pr. MAMOU, Dr. BEN SI SAID** pour vos conseils, votre temps et votre attention, **Dr. BOURSOUTI**, et l'ingénieur pour leur disponibilité ;

**Dr. ETTAIB Errahmani** maître-assistant en toxicologie au CHU BEO et **Dr. CHEBLI** assistant au centre national de toxicologie pour leur aide à procurer quelques réactifs. Ingénieurs des laboratoires d'hémobiologie (**M<sup>me</sup> SADOU Naima**), laboratoire d'hydrobromatologie et le magasin pour leurs aides.

Merci infiniment

## ***SOMMAIRE***

Introduction	1
PARTIE I :RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE I : MONOGRAPHIE DU CUIVRE	4
1. Historique	5
2. Les composés du cuivre et ses alliages	5
3. Les propriétés du cuivre	6
4. Utilisation du cuivre	7
5. Apports et besoins en cuivre	7
6. La cinétique du cuivre	10
6.1 Absorption, transport	10
6.2 Distribution	11
6.3 Métabolisme	13
6.4 Elimination	14
7. Rôle du cuivre dans l'organisme	15
7.1 La protection contre les radicaux libres et le vieillissement cellulaire	16
7.2 La synthèse de neurotransmetteurs du système nerveux sympathique	17
7.3 Le maintien de la masse osseuse et l'élasticité du tissu conjonctif	17
7.4 Les mécanismes de défense anti-inflammation et immunité	17
7.5 L'érythropoïèse	18
7.6 Les propriétés rhéologiques du sang	18
7.7 La pigmentation	18
CHAPITRE II: PATHOLOGIES LIEES AU CUIVRE	
1. Pathologies liés à une carence en cuivre	20
1.1 Les carences génétiques (maladie de Menkes)	20
1.2 Les carences acquises en cuivre	21
2. Toxicité du cuivre	22
2.1 Les sources d'exposition au cuivre	22
2.2 Mécanisme d'action toxique	27
2.3 Toxicité liée au déficit génétique	32
2.4 Toxicité acquise du cuivre	53
2.5 Les méthodes de dosage du cuivre dans les matrices biologiques	59

## SOMMAIRE

---

PARTIE II :	64
PARTIE PRATIQUE	64
Objectifs du travail	65
CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODE	66
1. Présentation de l'étude	67
2. conditions de collecte de pools de la matrice	70
3. Matériel	71
3.1 Appareillage	71
3.2 Verrerie	72
3.3 Autres	69
3.4 Réactifs	69
3.5 Produit	69
4. Méthode analytique	69
4.1 Le procédé de concentration : Extraction par point de trouble (Cloud point extraction CPE)	70
4.2 Dosage par Spectrométrie d'absorption atomique flamme (SAAF)	71
5. Optimisation du procédé	71
6. Protocole opératoire	72
6.1 Préparation des solutions de travail	72
6.2 Procédure de dosage	73
6.2.1 Etape de préconcentration	73
6.2.2 Mise au point des conditions opératoires et analyse sur SAAF	74
CHAPITRE II: VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE.	86
1. Protocole de validation analytique.	87
1.1 Généralités	87
1.2 Critères de validation	87
1.3 Choix de procédure de validation	92
1.4 Validation analytique par le profil d'exactitude	94
1.5 Construction du profil d'exactitude	95
CHAPITRE III : RESULTATS	97
1. La recherche d'un éventuel effet matrice (étape de prévalidation)	98
1.1 Plan d'expériences	98
1.2 Conclusion	104
2. Validation de la méthode d'analyse	104

## SOMMAIRE

---

2.1	Fonctions de réponse	104
2.2	Calcul de la limite de détection et de quantification	110
2.3	Mesure de la justesse	112
2.4	Mesure de la fidélité	115
2.5	Etablissement du profil d'exactitude	117
3.	Applications	119
3.1	Détermination de la concentration en cuivre dans l'échantillon d'urines	119
CHAPITRE IV : DISCUSSION		122
1.	Discussion de la validation de méthode de dosage.	123
2.	Dosage de l'échantillon :	125
3.	Discussion du procédé d'extraction par point de trouble	125
4.	Contraintes	125
5.	Perspectives	126
CONCLUSION GENERALE.		128
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		130
ANNEXES		
RESUME		

## Liste des abréviations

---

- **ATOX1** : Antioxydant protein 1.
- **ATP7A** : Protéine Menkès.
- **ATP7B** : Protéine de Wilson
- **CCS**: Cytochrome C Oxydase.
- **CIRC** : Centre international de recherche sur le cancer.
- **Cp** : Céruloplasmine.
- **CPE** : Cloud Point Extraction.
- **CTR**: Copper regulated transporter member.
- **Cu** : Cuivre.
- **CuZnSOD** : Super oxyde dismutase à cuivre et zinc.
- **DCT1**: Dication transporter 1.
- **DIU** : Dispositif Intra-utérin.
- **ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène.
- **ESPGHAN**: European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition.
- **FAO** : Des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
- **GSH** : Glutathion réduit.
- **HAH1**: (Human ATX Homlog-1).
- **Heph**: Hephaestine.
- **IACS**: International Annealed Copper Standard.
- **ICH**: International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals.
- **ISO**: The International Organization for Standardization.
- **LPR1**: Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein1
- **MARS**: Molecular Adsorbents Recirculating System.
- **MT** : Métallothionéine.
- **MFF**: Metal fume Fever.
- **NGS** : Next Génération Sequencing.
- **OMS** : Organisation mondiale de la santé.
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction.
- **RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism.
- **SAA**: Spectrométrie d'Absorption Atomique.
- **SDR** : Syndrome de détresse respiratoire aiguë.
- **Se** : Sensibilité.

## Liste des abréviations

---

- **SFSTP**: Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques.
- **SLC31**: Solute carrier family 31.
- **SNIIR** : Système national d'information inter-régimes de l'Assurance maladie.
- **SOD**: Super oxyde dismutase.
- **Sp** : Spécificité.
- **SSCP** : Single Strand Conformation Polymorphism.
- **SV**: Standard de validation.
- **VLEP** : Valeurs limites d'exposition professionnelle.
- **VME**: Valeur Limite de moyenne d'Exposition Professionnelle.
- **U.S.EPA**: United States Environmental Protection Agency.

## LISTE DES FIGURES

- **Figure01** : Métabolisme du cuivre dans l'entérocyte.
- **Figure 02** : Distribution du cuivre dans l'organisme.
- **Figure 03** : Métabolisme du cuivre dans l'hépatocyte.
- **Figure 04** : Formation du Radical hydroxyle par en présence du Cation cuivreux.
- **Figure 05** : Schéma explicatif de la réduction du dioxygène et l'intervention du cuivre ( $\text{Cu}^+$ )
- **Figure 06**: Schéma résumant l'action du cuivre au niveau du cerveau.
- **Figure 07** : Oxydation des Protéines à fonction Thiol par le Cation cuivrique.
- **Figure8** : Anneau de kayser-Fleischer.
- **Figure 9** : Bilan cuprique chez le sujet sain et en cas de maladie de Wilson.
- **Figure 10** : Le score de Leipzig sur la maladie de Wilson.
- **Figure 11**: Schéma montrant les étiologies possible en cas du bilan cuprique perturbé.
- **Figure 12** : Schéma explicatif des étapes du diagnostic devant un bilan cuprique perturbé.
- **Figure 13** : Structure de la D-pénicillamine.
- **Figure 14** : Wilsonien traité par un chélateur du cuivre.
- **Figure 15** : Wilsonien traité par le zinc.
- **Figure 16** : Spectrométrie d'absorption atomique flamme du laboratoire de Toxicologie.
- **Figure 17** : Principe de l'extraction par point de trouble d'un ion métallique.
- **Figure 18** : Séparation des phases après le bain de glace.
- **Figure 19** : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.
- **Figure 20** : profil d'exactitude exprimé par le taux de recouvrement.
- **Figure 21**: Les courbes d'étalonnage du premier jour.
- **Figure 22** : Les courbes d'étalonnage du deuxième jour.
- **Figure 23**: Les courbes d'étalonnage du troisième jour.
- **Figure 24** : La courbe des résultats obtenus durant les trois jours.
- **Figure 25**: Courbe d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (1<sup>er</sup> jour).
- **Figure 26**: Courbe d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (2<sup>em</sup> jour).
- **Figure 27** : Courbe d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (3<sup>em</sup> jour).
- **Figure 28**: Courbe d'étalonnage moyenne des trois jours.
- **Figure 29** : Profil d'exactitude de la méthode de dosage de la cuprurie par SAA flamme.

## Liste des figures

---

- **Figure 30:** Schéma expliquant la méthode des ajouts dosés.
- **Figure 31 :** Les instruments de base pour la spectrométrie atomique.
- **Figure 32 :** Spectrométrie d'absorption atomique flamme.
- **Figure 33 :** Composition générale d'une lampe à cathode creuse.
- **Figure 34 :** Brûleur d'un appareil d'absorption atomique.
- **Figure 35 :** des courbes représentent les différents types d'interférence spectrale.
- **Figure 36:** Formule chimique du complexe cuivre- Pyrrolidine dithiocarbamate.
- **Figure 37 :** Présentation de formule de triton X-100 vs triton X 114.
- **Figure 38 :** Modèles géométriques d'un tensioactif et représentation de micelles.

## LISTE DES TABLEAUX

- **Tableau 1** : Les propriétés physiques du cuivre.
- **Tableau 2** : La teneur en cuivre dans quelques aliments.
- **Tableau 3** : Teneurs en cuivre dans quelques organe par ordre décroissant.
- **Tableau 4**: Rôle de protéines cuivre-dépendantes dans la physiologie cellulaire.
- **Tableau 5** : Les conséquences d'une carence en cuivre sur les défenses immunitaires.
- **Tableau 6** : Aptitude de quelques végétaux à accumuler le cuivre.
- **Tableau 7** : Les valeurs limites d'exposition professionnelle dans l'air pour le Cu.
- **Tableau 8** : Les principales expressions cliniques de la maladie de Wilson.
- **Tableau 9** : Les manifestations cliniques de la maladie de Wilson.
- **Tableau 10** : Valeurs de référence (<sup>5</sup><sup>ème</sup>-<sup>9</sup><sup>ème</sup> percentile) chez l'adulte sain.
- **Tableau 11** : Classification de la cancérogénécité du cuivre et ses dérivés.
- **Tableau 12**:Principales caractéristiques des différentes méthodes spectroscopiques .
- **Tableau 13**:Protocole de préparation des gammes d'étalonnage.
- **Tableau 14** : Protocole de la préparation des solutions standards de validation.
- **Tableau 15** : Récapitulatif des conditions opératoires à régler.
- **Tableau16** : Les différents types de fonctions de réponse.
- **Tableau17** : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation.
- **Tableau 18**: Résultats des gammes d'étalonnage du J1.
- **Tableau 19** : Résultats des gammes d'étalonnage du J2.
- **Tableau 20** : Résultats des gammes d'étalonnage du J3.
- **Tableau 21**: Les moyennes des résultats des trois jours.
- **Tableau 22** : Valeurs de la pente et des ordonnés à l'origine.
- **Tableau 23** : Comparaison des ordonnées à l'origine b1 et b2.
- **Tableau24** : Comparaison des pentes a1 et a2.
- **Tableau 25** : Gamme d'étalonnage de la solution du cuivre dans la matrice (1<sup>er</sup> jour).
- **Tableau 26** : Résultats de la gamme de standard de validation.
- **Tableau 27** : Gamme d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (2<sup>ème</sup> jour).
- **Tableau 28**: Résultats de la gamme de standard de validation (2<sup>em</sup> jour).
- **Tableau 29** : Gamme d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (3<sup>em</sup> jour) .

## Liste des tableaux

---

- **Tableau 30** : Résultat de la gamme de standard de validation 3<sup>em</sup> jour.
- **Tableau 31** : Absorbances moyennes obtenus pendant les trois jours de validation.
- **Tableau 32**: Absorbances d'une série de six blancs d'analyse.
- **Tableau 33** : Concentrations calculées des standards de validation.
- **Tableau 34** : Résultats de la justesse des standards de validations.
- **Tableau 35** : Récapitulatif des résultats de la justesse par niveau.
- **Tableau 37** : Résultats de la Fidélité par niveau.
- **Tableau 38**: Facteurs de couverture de l'intervalle de tolérance.
- **Tableau 39** : Limites de tolérance basse et haute pour les standards de validation.
- **Tableau 40** : Récapitulatif pour l'établissement du profil d'exactitude.
- **Tableau 41** : Résumé de la validation pour le cuivre urinaire.
- **Tableau 42**: Tableau explicatif de la méthode des ajouts dosés.



# INTRODUCTION

Le cuivre est un oligo-élément essentiel, dont l'homéostasie est finement régulée. De multiples enzymes, impliquées dans la synthèse de neurotransmetteurs, dans la formation du tissu conjonctif ou dans la chaîne respiratoire, l'utilisent comme cofacteur. Un déséquilibre de son métabolisme est à l'origine de maladies génétiques graves, en particulier les maladies de Menkès et de Wilson [1]. Par ailleurs, le cuivre est très utilisé dans l'industrie, d'où la possibilité de certaines intoxications professionnelles.

Nous nous sommes intéressés dans ce présent travail à la maladie de Wilson, une pathologie méconnue du grand nombre malgré ces complications potentiellement sévères. Le dosage du cuivre urinaire est indispensable au diagnostic de la maladie de Wilson.


En Algérie cette analyse se fait uniquement au CHU Mustapha-Bacha à Alger qui est équipé d'un spectromètre de masse couplé à une torche à plasma (ICP-SM), qui est la méthode de référence pour le dosage du cuivre urinaire. Cette méthode permet le dosage direct du cuivre dans les urines avec une sensibilité très élevée (des fractions de l'ordre de ppb ( $\mu\text{g/L}$ )).

La concentration de cuivre dans l'urine est un simple test préliminaire sensible pour le diagnostic et peut être utile non seulement pour le diagnostic de la maladie de Wilson, mais aussi pour le suivi du traitement. Plusieurs techniques analytiques ont été utilisées pour la détermination du cuivre dans l'urine humaine avec une sensibilité suffisante. Cependant, la détermination des ions de cuivre de traces dans l'urine humaine est difficile due à divers facteurs, en particulier les effets de faible concentration et de la matrice. La pré-concentration et la séparation peuvent résoudre ces problèmes et conduire à un niveau de confiance plus élevé et facile pour la détermination des oligo-éléments, certes avec une sensibilité moindre, mais avec une instrumentation plus accessible tel que la spectrométrie d'absorption atomique flamme (SAAF) [2].

Dans ce contexte, le but de notre projet de fin d'étude est de valider une nouvelle méthode de dosage du cuivre dans les urines par la SAA flamme en utilisant un procédé de pré-concentration liquide-liquide appelé l'extraction par point de trouble (Cloud point extraction CPE). La démarche de validation utilisée dans ce travail est celle du protocole SFSTP 2003-2006 basée sur le profil d'exactitude.

Le présent travail sera subdivisé en trois parties ;

- La première est consacrée à un aperçu sur les données de la littérature sur tout ce qui concerne le cuivre dans l'organisme. Nous étudierons la présentation clinique de la maladie de Wilson, des actualités concernant le diagnostic et le traitement de cette maladie.
- La deuxième partie s'attache à la validation analytique, définir ces critères et ces approches, et expliquer le principe du profil d'exactitude.
- Le dernier chapitre contient l'essentiel des résultats obtenus et leur interprétation.



**PARTIE I :**  
**RECHERCHE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**



CHAPITRE I :  
MONOGRAPHIE DU CUIVRE

## 1. Historique

Le cuivre a joué un rôle très important dans le développement des civilisations. Il a trouvé son origine dans plusieurs sites, et notamment à Chypre, qui lui a donné son nom : *Aes Cyprium*.

Il est difficile de situer exactement le moment d'apparition des premiers objets en cuivre, Il est vraisemblable que des outils et des armes de chasse en cuivre sont apparus dès l'époque néolithique, vers 5000 ans avant J.C., époque à laquelle ce métal existait dans la nature à l'état natif, c'est à dire pur de toute combinaison [3].

Ce métal rouge est utilisé depuis l'Antiquité pour combattre les maladies et infections par les grecs, les égyptiens. Ils fabriquaient alors des préparations à base de cuivre pour traiter les maux de gorge ou les éruptions cutanées. En mars 2008, l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (EPA) homologue le cuivre et ses alliages en tant qu'agents antibactériens [4].

En plus de son utilisation sous forme de métal, Le corps humain contient du cuivre à l'état de traces, sa très faible concentration dans l'organisme et nos besoins journaliers très faibles lui valent son appellation d'oligo-élément [4].

Une exposition à des concentrations élevées en cuivre provoque une intoxication à ce métal, d'ailleurs plusieurs cas d'intoxication sont relatés dans la littérature, exemple : en 1987 empoisonnement des sols de la ferme de Niederwyhl par des sels de cuivre [3,4].

## 2. Les composés du cuivre et ses alliages

Le cuivre est un élément métallique de symbole Cu, il appartient au groupe (IB) de la classification périodique des éléments, de couleur rougeâtre [5]. Se trouve rarement dans la nature à l'état natif. L'essentiel du minerai de cuivre est extrait sous forme de sulfures ou de roches à base de chalcopirite ( $\text{CuFeS}_2$ , avec une teneur en cuivre de 0,4 à 1,0 %) la covellite ( $\text{CuS}$ ), la chalcocite ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) ou la cuprite ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ).

Il est utilisé en métallurgie dans la fabrication des alliages, exemple: bronze (avec l'étain) laiton (avec le zinc) [7].

### 3. Les propriétés du cuivre

#### 3.1 Propriétés physiques

Le cuivre est un métal ductile, malléable aussi bien à froid qu'à chaud, excellent conducteur de chaleur et d'électricité, très résistant à la corrosion, peu oxydable à froid, mais donne CuO (oxyde cuivreux) noir à moyenne température et Cu<sub>2</sub>O (oxyde cuivrique) rouge à plus forte température [3].

Tableau 1 : Les propriétés physiques du cuivre [5,8]

Nombre atomique	29
Etat ordinaire	Solide
Masse atomique	63,54g/mol
Densité	8,93 g/cm <sup>3</sup>
Température de fusion	1083 C°

##### 3.1.1 Propriétés électriques

De tous les métaux, à l'exception de l'argent, le cuivre possède la meilleure conductivité électrique, cette dernière a été prise comme référence par la Commission Électrotechnique Internationale en 1913 (La conductibilité du cuivre est, par définition, égale à 100 % IACS) [8].

##### 3.1.2 Conductibilité thermique

Le cuivre étant le métal usuel conduisant le mieux la chaleur, cette propriété est mise à profit pour chauffer ou refroidir rapidement un liquide ou un gaz [9].

#### 3.2 Propriétés chimique

➤ Le cuivre métal est peu réactif. Au contact de l'atmosphère, il s'oxyde pour former une couche protectrice constituée de carbonate de cuivre basique connu sous le nom de « vert de gris ».

➤ Le cuivre métal ne réagit pas avec les solutions acides non oxydantes comme l'acide chlorhydrique.

➤ Les solutions d'ammoniaque, de sels ammoniacaux ou de cyanures formant des complexes très stables avec le cuivre produisent une corrosion rapide du métal [9].

### 3.3 Propriétés biologiques

- Le cuivre est un oligoélément indispensable à la vie sur terre.
- Il élimine naturellement les microorganismes et les bactéries.
- Ces caractéristiques confèrent au cuivre et à certains de ses alliages, comme le cupro-nickel, des propriétés anti-fouling, qui consistent à empêcher la fixation d'algues et d'organismes marins.
- Les sels de cuivre, comme le sulfate, ou l'oxychlorure, présentent des propriétés fongicides mises à profit pour la viticulture et l'agriculture [10].

## 4. Utilisation du cuivre

Le cuivre et ses composés ont de nombreuses applications industrielles [11] :

- Utilisation dans la fabrication de matériels électriques.
- Industrie pétrolière : agents désodorisants, désulfurant, agents de flottation.
- Fabrication de produits biocides : produits antisalissure, produits de protection du bois désinfectants non en contact avec les denrées alimentaires.
- Fabrication de produits phytopharmaceutiques : herbicides, fongicides (anti-mildiou).
- Usages médicaux : ex : dans la contraception : pour la fabrication de dispositifs Intra-utérin (DIU) ou stérilet, agit sur les spermatozoïdes en les rendant moins viables dans.

## 5. Apports et besoins en cuivre

Les besoins journaliers en oligoéléments sont définis par la dose minimale requise afin de prévenir l'installation d'une carence, ils diffèrent d'un individu à un autre, et dépendent des facteurs nutritionnels, génétiques et environnementaux [12].

### 5.1. Apports alimentaires

Le cuivre est présent à l'état de trace dans tous les aliments, dont certains en contiennent des quantités plus importantes.

D'après une étude (INCA2), les plus gros contributeurs aux apports cupriques sont les pains et produits de panification **14,1 %**, les légumes **7,8 %**, les abats **7,4 %**, les fruits **6,1 %** et les pommes de terre **5,5 %** [13].

**Tableau 2: la teneur en cuivre dans quelques aliments [13].**

Aliments	Teneur en cuivre en mg pour 100 g d'aliment
Foie de veau cuit	20.1
Foie d'agneau cuit	8.5
Noix de cajou	1.8 à 2
Blé cuit	0.3
Haricot blanc, haricot rouge, pois chiche ou lentille cuit	<b>0.25</b>

### L'eau potable :

La teneur en cuivre dans l'eau (notamment l'eau de robinet et de ressources superficielles) fait l'objet d'un contrôle bien règlementé, la limite de qualité en cuivre est de 2 mg/L. Cette valeur proposée par l'OMS (et qui prend en compte l'ingestion de 2 à 3 L de l'eau par jour) est proche des seuils de perception gustative et de coloration dans l'eau de boisson [14].

### 5.2 Les apports conseillés en cuivre

➤ **Moins de 6 mois ->0.4 mg/jour** : Au stade fœtal, l'apport assuré par la mère augmente au fur et à mesure de la maturation hépatique et la synthèse de la céruloplasmine, la cuprémie est physiologiquement basse à la naissance et augmente progressivement avec l'âge (cela dépend encore de la capacité du foie à synthétiser la céruloplasmine) [15]. Après la naissance, le cuivre est apporté essentiellement par le lait, celui de la mère en contient 250 µg/L environ, sa concentration diminue progressivement au cours de la lactation [16].

Le cuivre est présent dans tous les laits infantiles dont la composition doit répondre aux besoins des nourrissons, selon l'ESPGHAN (European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition), la teneur en cuivre recommandée est : Préparations pour

nourrissons (Laits premier âge) et les préparations de suite (laits deuxième âge) : [21-70 µg/100MI] [10].

*Remarque* : l'apport est doublé chez les nouveaux nés prématurés [17] ils sont déficitaires en cuivre et nécessitent souvent une supplémentation (en cas d'apparition de signes de carence) [15].

➤ **De 6 à 12 mois ->0.6 mg/jour** : À partir de cet âge, le début d'alimentation diversifiée de nourrisson (à base de farines, fruits, légumes ... etc.) en plus du lait, est responsable de l'augmentation des apports [18].

➤ **De 1 à 3 ans ---->0.8 mg/jour.**

➤ **De 4 à 6 ans --->1 mg/jour.**

➤ **De 7 à 9 ans --->1.2 mg/jour.**

➤ **De 10 à 19 ans --->1.5 mg/jour.**

➤ **Hommes adultes : 2 mg/jour.**

➤ **Femmes adultes : 1.5 mg/jour.**

➤ **Femmes enceintes et allaitantes : 2 mg/jour**

➤ **Personnes âgées de plus de 75 ans : 1.5 mg/jour** [19].

➤ **Chez le sportif**, l'apport en cuivre doit être majoré, il est de **2.6 mg/jour** pour l'homme et de **2.1 mg/jour** pour la femme, afin de compenser les pertes dans la sueur [20].

## 5.3 Les valeurs physiologiques

### 5.3.1. La cuprémie

Elle est définie comme la concentration du cuivre dans le sang, chez le nouveau-né elle est faible par immaturité hépatique qui limite la synthèse de céruloplasmine [21].

- Jusqu'à 3 mois : **1.4 - 7.2 µmol/L** soit **88.9 – 457.5 µg/L.**
- De 4 à 6 mois : **3.9 – 17.3 µmol/L** soit **247.8 – 1099.3 µg/L.**
- De 7 à 12 mois : **7.9 – 20.5 µmol/L** soit **502 – 1302.7 µg/L.**
- De 1 à 5 ans : **12.6 – 23.6 µmol/L** soit **800.7 – 1499.7 µg/L.**
- De 6 à 9 ans : **13.2 – 21.4 µmol/L** soit **838.8 – 1359.9 µg/L.**
- De 10 à 13 ans : **12.6 – 19 µmol/L** soit **800.7 – 1207.4 µg/L.**
- Hommes de 14 à 17 ans : **10.1 – 18.4 µmol/L** soit **641.8 – 1169.2 µg/L.**
- Femmes de 14 à 17 ans : **11.3 – 25.2 µmol/L** soit **718.1 – 1601.4 µg/L.**

- Hommes et femmes de plus de **18 ans** : **10.1 – 25.2  $\mu\text{mol/L}$**  soit **641.8 – 1601.4  $\mu\text{g/L}$** .
- Femmes enceintes : **18.5 – 47.4  $\mu\text{mol/L}$**  soit **1175.6 – 3012.1  $\mu\text{g/L}$** .

### 5.3.2 La cuprurie

Elle est définie comme la concentration du cuivre dans les urines, elle doit être inférieure 0.6  $\mu\text{mol/L}$  soit 38.1  $\mu\text{g/L}$  dans les urines de 24 H [21].

Remarque :  $\mu\text{g/L} = \mu\text{mol/L} * 63.546$  (masse molaire g/mol).

## 6. La cinétique du cuivre

### 6.1 Absorption, transport

L'absorption de cuivre est possible par toutes les voies mais elle s'effectue de manière prépondérante par voie orale [22].

#### 6.1.1. Par voie pulmonaire

L'absorption pulmonaire de Cu sous forme de poussières ou de fumées est possible mais le taux d'absorption par cette voie chez l'homme n'est pas déterminé mais doit dépendre du composé [22].

#### 6.1.2 Par voie cutanée

La biodisponibilité par voie cutanée n'est pas connue [22].

#### 6.1.3 Par voie orale

L'absorption gastro-intestinale du cuivre ( $\text{Cu}^{++}$ ), l'espèce chimique la plus abondante du Cuivre et la plus toxique, se fait principalement au niveau du duodénum et secondairement dans le reste de l'intestin grêle. Le taux d'absorption par voie orale est très variable, Entre 40 et 60 %, Le reste non assimilable, est éliminé directement dans les selles [22].

Chez l'Homme, le cuivre n'est actif que sous forme ionisée, soluble dans l'eau. L'absorption est diminuée par l'oligo-élément tel que le zinc et par un pH alcalin (l'état d'ionisation de l'élément) [23].

Dans l'entérocyte, le cuivre est soit complexé à la métallothionéine, soit lié à des aminoacides. La métallothionéine joue un grand rôle dans l'homéostasie du cuivre en régulant son passage à

travers la paroi intestinale [24]. En cas d'excès de cuivre, elle accroît son élimination dans les fèces lors de la desquamation de la muqueuse [25].

Il a été évoqué que le passage de la barrière intestinale s'effectuerait par simple diffusion, mais aussi par un transport associé à celui des acides aminés [22].

Le cuivre est acheminé via un transporteur passif (la protéine ATP7A ou protéine de Menkès), dans la circulation portale, lié à l'albumine et à des acides aminés. Sa fraction libre est très faible. La captation hépatique est ensuite très rapide [26,27].

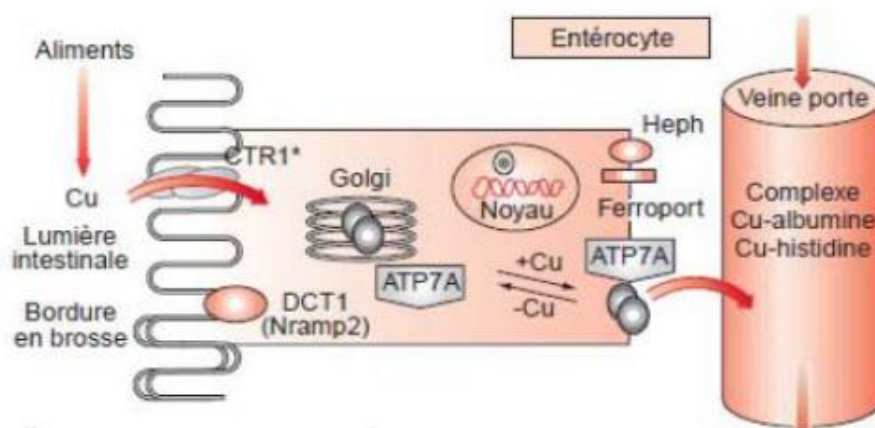


Figure 1 : métabolisme du cuivre dans l'entérocyte [27].

*-ATP7A* : protéine Menkès ; *CTR1* : protéine de transport du cuivre ; *DCT1* : dication transporter ; *Heph* : hephaestine ; *Ferroport* : ferroportine

## 6.2 Distribution

### 6.2.1 Dans le sang

Après absorption, le cuivre sanguin est partagé entre les érythrocytes (La pénétration du cuivre est très rapide (0,34 % de cuivre)) et le plasma où le cuivre n'existe jamais libre mais lié aux :

➤ acides aminés : Forme diffusible du cuivre résultant d'une complexation préférentielle par l'histidine, la thréonine ou la glutamine. Cette fraction quantitativement limitée est qualitativement très importante puisqu'elle permet les échanges de cuivre notamment avec le foie [23].

➤ protéines : L'albumine (2%) et la céruloplasmine principalement (cette dernière est majoritairement synthétisée par le foie, c'est une alpha<sub>2</sub>-glycoprotéine dont la concentration normale est comprise entre 0.2 g/l et 0.4 g/l, contenant approximativement 95% du cuivre présent dans le sérum, chaque molécule de céruloplasmine fixant fortement six à huit atomes du cuivre non interchangeable) [23].

Dans le sang, le Cu<sup>2+</sup> sous forme complexée aux protéines, est réduit en cation Cu<sup>+</sup> et est immédiatement capté par le Glutathion (G-SH) qui le transfère à la Métallothionéine [23].

On peut observer une augmentation de la céruloplasmine et du cuivre dans le plasma au cours de diverses maladies infectieuses ou tumorales [23]. La céruloplasmine circulante, contrairement à la transferrine, n'échange pas le cuivre. Elle ne le libère qu'après avoir pénétré par endocytose à l'intérieur des cellules [28].

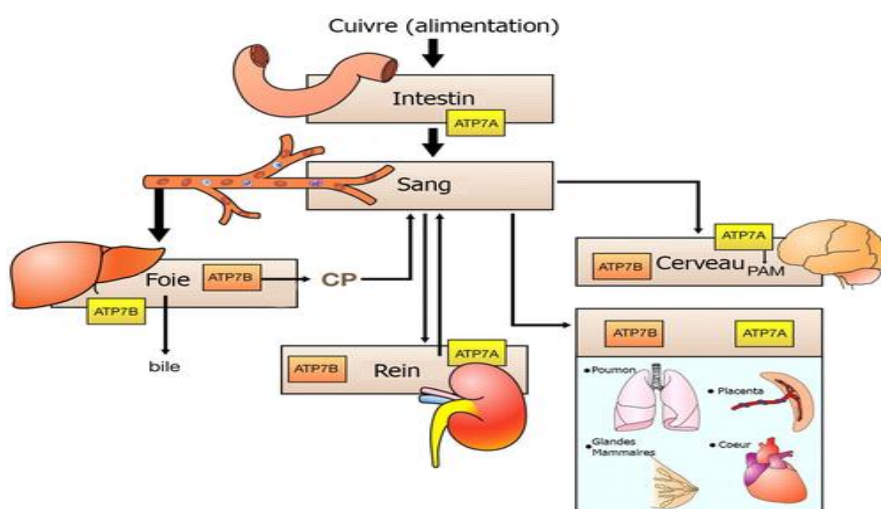
### 6.2.2 Dans les autres tissus

Présent dans le cytoplasme, le noyau et les mitochondries de l'ensemble des cellules de l'organisme [30]. La quantité dans chaque tissu est en rapport avec le nombre et le genre de processus métaboliques. Pour cette raison il est intéressant de noter que le cerveau, le cœur et les reins contiennent, par ordre décroissant (tableau 3) plus de cuivre que tous les autres tissus (os, muscles ... etc.) à l'exception du foie, organe qui tient en réserve la plus grande quantité du cuivre lié aux métallothionéine (8% de la quantité totale du cuivre dans l'organisme) [28].

Au stade précoce du développement fœtal, la quasi-totalité du Cu est contenue dans le foie (principalement dans les lysosomes). Au cours de la vie fœtale cette quantité décroît progressivement, car il sera redistribué à d'autres organes, mais représente encore 30 à 60 % du cuivre total à la naissance [26]. Sa répartition dans l'organisme devient identique à celle de l'adulte dès l'âge de 3 mois [25].

**Tableau 3 : Teneurs en cuivre dans quelques organe par ordre décroissant[27].**

Organes	Quantité en mg / 100 g de tissu sec
Foie	0,71
Cerveau	0,40
Cœur	0,19
Rein	0,166
Muscle	0,125
Intestin	0,11
Poumon	0,11
Rate	0,085

**Figure 2 : Distribution du cuivre dans l'organisme [27].**

## 6.3 Métabolisme

### 6.3.1 L'étape hépatique

Le cuivre est ensuite acheminé vers le foie via la circulation portale. Dans l'hépatocyte, il est incorporé à l'apocéruloplasmine (au niveau de l'appareil de Golgi), et forme la céruloplasmine. L'incorporation du cuivre à l'apocéruloplasmine dépend de l'action d'une protéine ATPase de type P, localisée dans le trans Golgi, appelée *ATP7B*. Le Cu lié à la céruloplasmine est dit « non échangeable ». Il est alors transporté, très fortement lié, jusqu'aux cellules des tissus périphériques [29].

Au niveau de la membrane de l'hépatocyte, un autre transporteur du cuivre le CTR1 (Copper regulated transporter member 1) permet son passage intracellulaire. Dans l'hépatocyte, l'élément est fixé par plusieurs molécules chaperonnes chargées de son transport cytosolique

pour le distribuer ensuite vers les cuproprotéines effectrices (super oxyde dismutase [SOD] où le cuivre est envoyé par Copper chaperone of SOD : le CCS, cytochrome C Oxydase où le cuivre est transporté par le COX17)[29].

L'expression tissulaire: ATP7A (23 exons, 1500 acides aminés) est ubiquitaire à l'exception du tissu hépatique. L'ATP7B (22 exons, 1465 acides aminés) est présent principalement au niveau hépatique, rénal et placentaire mais il est également faiblement exprimé au niveau du cerveau, du cœur et des poumons. Ces deux protéines sont très proches structurellement : leurs séquences ont 57% d'homologie et elles présentent cinq grands domaines communs avec de motifs caractéristiques [30,31].

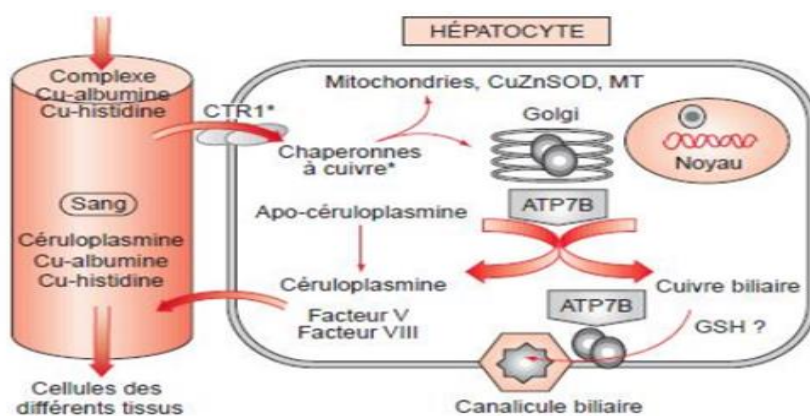


Figure 3 : métabolisme du cuivre dans l'hépatocyte [27].

### 6.3.2 L'étape poste hépatique

Une partie du cuivre quitte l'hépatocyte pour se retrouver dans la circulation sanguine, liée dans le plasma pour une grande part à la céruloplasmine, mais aussi à l'albumine et à des acides aminés dont l'histidine [25]. L'holocéruloplasmine (céruloplasmine lié au cuivre) a une activité ferroxidasique qui le désigne plutôt comme cofacteur essentiel à la transferrine [31].

Une partie du cuivre sanguin se trouve dans les érythrocytes, lié à la SOD et à des acides aminés mais seul le cuivre plasmatique transporté par l'albumine et les acides aminés est échangeable et distribué aux Tissus périphériques [27].

### 6.4 Elimination

La principale voie d'excrétion du cuivre est biliaire (25 mol/jour soit 1 mg) c'est 80 % du cuivre capté par le foie, il s'agit d'un processus actif mettant en jeu les lysosomes et se faisant

contre un gradient de concentration : il en résulte une concentration biliaire vingt fois supérieure à la concentration plasmatique [32].

Dans la bile, les formes du cuivre sont discutées : le cuivre n'y est pas libre mais serait lié à des acides aminés ou aux acides biliaires. Le cuivre biliaire n'est pas réabsorbable. Il est éliminé directement dans les selles [32]. La protéine ATP7B joue là encore un rôle majeur en permettant l'acheminement du cuivre vers la bile.

Une faible partie est filtrée par les glomérules rénaux, la cuprurie physiologique atteint 2  $\mu\text{mol}/\text{jour}$ , soit 0.5 à 3 % du cuivre absorbé. Une quantité négligeable est éliminée par les cheveux et la sueur [32].

Chez le sujet normal, la balance cuprique est négative ; ça veut dire une cuprurie très basse puisque le cuivre est éliminé le plus normalement possible via la bile. En effet, une augmentation d'apport en cuivre engendre une augmentation de l'élimination biliaire. Une anomalie de l'excrétion biliaire du cuivre provoque l'installation d'une balance Cuprique positive (cuprurie très élevée)[22] .

## **7. Rôle du cuivre dans l'organisme**

Reconnu dès 1973 par l'OMS comme oligo-élément essentiel. Dans de nombreuses réactions enzymatiques, il est courant d'observer les constants allers retours de cet ion métallique de l'état oxydé ( $\text{Cu}^{2+}$ ) à l'état réduit ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Cette propriété du cuivre en fait un excellent cofacteur. Des activités cellulaires comme la respiration, le transport du fer et la protection contre le stress oxydatif sont dépendants d'un apport adéquat [32].

Le tableau 4 recense les principales cuproenzymes localisées dans les cellules humaines, leurs fonctions biologiques, ainsi que la nature des troubles associés à une perturbation de leur activité [1,32].

**Tableau 4 : Rôle de protéines cuivre-dépendantes dans la physiologie cellulaire [32].**

Nom	Fonction biologique	Conséquence si déficiente ou *surexprimée ou **agrégée
Amine oxydase	Utilisation des amines ; homéostasie du glucose ; trafic des leucocytes	*L'hyperactivité de l'enzyme est détectée chez les patients atteints de diabète et par des maladies cardio-vasculaires
Angiogénine	Formation des vaisseaux sanguins	Malformation des vaisseaux sanguins
ATP7A (Menkes)	Maturation cuproprotéines et excrétion du cuivre des cellules (sauf hépatiques)	Maladie de Menkes
ATP7B (Wilson)	Maturation cuproprotéines et excrétion du cuivre des cellules hépatiques	Maladie de Wilson
Céruleplasmine	Activité ferroxidase requise lors du transfert du fer à la transferrine présente dans la circulation sanguine	Anémie
Cytochrome c oxydase	Génération d'ATP via la phosphorylation oxydative (respiration)	Acidose lactique congénitale
Dopamine $\beta$ -hydroxylase	Production de catécholamines ; synthèse de norépinéphrine	Déséquilibre hypothalamique : chute de tension ; déshydratation ; somnolence ; abaissement de la température corporelle
Facteurs V et VIII	Coagulation sanguine	Saignements
Hephaestine	Activité ferroxidase requise lors du passage du Fe des cellules intestinales dans la circulation sanguine	Anémie microcytique hypochromique
Lysyl oxydase	Pontage du collagène et de l'élastine aux matrices	Fragilité des tissus et vaisseaux ; emphysème ; dilatation anormale de la peau
Métallothionéine	Séquestration du cuivre excédentaire	Toxicité cellulaire
Peptidylglycine- mono-oxygénase	Bioactivation de peptides hormonaux	Déséquilibres hormonaux causant une rupture cardiaque et la mort embryonnaire
Précurseur de la $\beta$ -amyloïde	Rôle physiologique inconnu	Forme familiale de la maladie Alzheimer
Protéine Prion PrP	Rôle physiologique inconnu	Encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles
Superoxyde dismutase 1	Annihilation des anions superoxydes	Domages cellulaires causés par des produits réactifs dérivés de l'oxygène ; **agrégats - sclérose latérale amyotrophique
Tyrosinase	Production de mélanine	Albinisme

Son rôle physiologique découle implicitement des systèmes enzymatiques cupro-dépendant cités dans le tableau 4, ainsi que le cuivre intervient dans :

### 7.1 La protection contre les radicaux libres et le vieillissement cellulaire

Antioxydant puissant, il permet de lutter contre le stress oxydatif et le vieillissement cellulaire par son incorporation à :

#### 7.1.1 Le superoxyde dismutase 1 (SOD1)

Elle présente un élément- clé du processus de défense contre le stress oxydatif. Cette enzyme de faible masse moléculaire forme des homodimères. Chaque monomère contient un ion de zinc qui joue un rôle structural et un ion de cuivre qui agit en tant que cofacteur catalytique. Elle catalyse la dégradation des anions superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène [31].

### 7.1.2 Cytochrome C- oxydase

C'est le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale nécessite deux atomes de cuivre pour un assemblage et un fonctionnement corrects. Un déficit en Cytochrome C oxydase entraîne des syndromes variés tous liés à un déficit énergétique dans la cellule (myopathie, cardiopathie, encéphalopathies ...) [31,33].

### 7.2 La synthèse de neurotransmetteurs du système nerveux sympathique

Le cuivre intervient dans la synthèse des neurotransmetteurs du système nerveux sympathique en raison de son rôle de cofacteur de la dopamine- $\beta$ -hydroxylase, enzyme indispensable dans la synthèse de deux catécholamines : l'adrénaline et la noradrénaline [31,34].

### 7.3 Le maintien de la masse osseuse et l'élasticité du tissu conjonctif

Le cuivre intervient dans la croissance, la minéralisation et l'entretien de la masse osseuse et des cartilages. Il agit comme un anti-inflammatoire naturel. Par son rôle cofacteur de la lysyl-oxydase, il intervient dans la réticulation du collagène et des molécules d'élastine et donc dans leurs maturation [34,35].

### 7.4 Les mécanismes de défense anti-inflammation et immunité

Une carence nutritionnelle en cuivre se traduit par une altération de l'immunité innée (non spécifique) et acquise (spécifique) [36].

**Tableau 5: les conséquences d'une carence en cuivre sur les défenses immunitaires de l'organisme. [11]**

Effet d'une carence en cuivre sur l'immunité	Auteur
✎ Nombre, maturation et fonction des Neutrophile	Perceval (19981) ; Hira-se (1992) <u>Karimbakas (1998)</u>
✎ Fonction macrophages	de <u>Babu (1990)</u>
✎ Sécrétion de cytokines pro-inflammatoire TNFa, IL-1, IL-6 et des prostaglandines PGE2	Huang (2000); Hopkins & Failla (1997) ; Iwaki ri (1998)
✎ Prolifération lymphocytes T	Bala & al (1992) ; Hopkins & al. (1997)
Atrophie thymique ✎	<u>Lukasewycz (1990)</u>
Effet pro-inflammatoire en favorisant la migration des neutrophiles vers les tissus pulmonaires à travers la paroi vasculaire	<u>Schuscke (2002) ; Lominadze (2004)</u>

### 7.5 L'érythropoïèse

Le cuivre intervient dans le métabolisme du fer, étant donné qu'il rentre dans la composition de la céruloplasmine. Cette enzyme est responsable de l'oxydation du fer ferreux  $Fe^{2+}$  en fer ferrique  $Fe^{3+}$  dans le plasma. Cette réaction d'oxydation étant indispensable pour la liaison du fer à la transferrine (protéine de transport plasmatique), la céruloplasmine est donc indispensable au transport du fer dans l'organisme [34].

### 7.6 Les propriétés rhéologiques du sang

Le cuivre participe dans la synthèse de certaines fibres du tissu conjonctif (collagène et élastine) qui entrent dans la composition de la paroi des vaisseaux sanguins [36].

### 7.7 La pigmentation

Le cuivre a un rôle essentiel dans la pigmentation puisqu'il est nécessaire à l'activité de la tyrosinase. Par l'intermédiaire de cette enzyme, il intervient dans la synthèse de la mélanine dans les mélanocytes uvéaux et cutanés. Une carence peut entraîner des troubles de la pigmentation et des cheveux prématurément blancs [37].



**CHAPITRE II :**  
**PATHOLOGIES LIEES AU**  
**CUIVRE.**

## 1. Pathologies liés à une carence en cuivre

Le cuivre fait partie du groupe relativement restreint des éléments métalliques essentiels, ces métaux sont indispensables aux processus métaboliques. Cependant, le corps ne peut pas les synthétiser de sorte qu'ils doivent être pris et absorbés par l'alimentation ; donc une carence en cuivre, d'origine acquise ou héréditaire peut engendrer de sérieux problèmes de santé.

### 1.1 Les carences génétiques (maladie de Menkes)

La maladie de Menkes est une encéphalopathie dégénérative décrite pour la première fois en 1912 Par John Menkes, chez un enfant présentant une détérioration mentale, des cheveux blancs, tordus et fragiles. C'est une maladie familiale qui apparaît dans les premiers mois de vie [41]. Elle est aussi appelée « Kinky hair disease » ou encore trichopolydystrophie. C'est une maladie héréditaire récessive liée au chromosome X due à un défaut du transport intracellulaire du cuivre. Ce désordre métabolique est dû à une mutation du gène ATP7A codant une protéine du transport du cuivre. Elle apparaît pendant la période néonatale, son évolution est fatale en absence de traitement efficace [38,45].

#### 1.1.1 Incidence

En général, l'incidence de la maladie de Menkes est de 1 pour 40 000 à 1 pour 350 000. Elle est diagnostiquée dans tous les groupes ethniques [39].

#### 1.1.2 Mortalité et morbidité

La forme classique de la maladie de Menkes est souvent mortelle vers l'âge de 3 ans ; pourtant, la survie vers l'âge de 20 ans a été rapportée. Les infections respiratoires et urinaires récidivantes sont décrites au cours de cette affection [40].

#### 1.1.3 La symptomatologie

Cette maladie est multi symptomatique, elle se manifeste souvent par un retard de croissance intra utérin et principalement des troubles neurologiques: crise d'épilepsie, hypotonie et retard mentale .Un changement d'aspect des cheveux chez l'enfant (garçon dans la majorité des cas) est assez évocateur , cheveux rares, raides et cassants, accompagné souvent d'une hyper laxité ligamentaire ; une hypo pigmentation et une hypothermie du fait d'un développement anormale de la paroi des vaisseaux, des anévrismes artériels en particulier cérébrales peuvent se former et se complique d'hémorragie.

Du fait que la maladie de Menkès est liée à X, les femmes hétérozygotes n'ont pas de complications neurologiques, mais elles peuvent parfois présenter des cheveux d'aspect particulier (cassant, spiralé, dépigmenté) [40].

#### 1.1.4 Diagnostic

Est posé soit par le pédiatre soit par un neuropédiatre sur la base d'un examen clinique face à un déficit psychomoteur important et d'une prise de sang avec un dosage du cuivre et de céruloplasmine. Ces dosages montrent des taux effondrés, ainsi que le taux de cuivre urinaire est abaissé. L'analyse génétique est faite ensuite pour éventuellement valider le diagnostic. Malheureusement le diagnostic est souvent posé tardivement [41].

#### 1.1.5 Traitement

Un traitement par perfusion du cuivre sous forme de cuivre-histidine est proposé, mais ce traitement n'est efficace que sur certaines anomalies génétiques et s'il est administré de manière très précoce, dans les 3 premières semaines de vie. Or, même instauré précocement, l'efficacité est transitoire sauf exception [41].

### 1.2 Les carences acquises en cuivre

Si les mécanismes génétiques qui contrôlent le métabolisme du cuivre sont normaux, une carence alimentaire est rarement responsable d'une carence en cuivre cliniquement significative.

#### 1.2.1 Cause

- ❖ Une alimentation entérale ou parentérale prolongée [42].
- ❖ Une malabsorption, qui peut être liée à une chirurgie digestive antérieure (gastrectomie, résection de l'intestin grêle...) ou à une pathologie digestive (maladie coéliqua, maladie inflammatoire digestive...) [42].
- ❖ Les diarrhées infantiles persistantes [42].
- ❖ Une origine médicamenteuse : une carence en cuivre peut s'observer à la suite d'un traitement prolongé par des sels de zinc [42].

#### 1.2.2 La symptomatologie et diagnostic

Essentiellement par des troubles neurologiques : comparables à ceux de la maladie de Menkes. Au niveau biologique : la cupremie et le taux de céruloplasmine sont effondrés. Des troubles

hématologiques sont parfois observés, principalement une anémie (qui peut être normo, micro ou macrocytaire) et une leucopénie. Le diagnostic repose sur le dosage de la cuprémie et de la céruloplasmine [43].

### 1.2.3 Traitement

Administration de cuivre, *per os* ou par voie parentérale, jusqu'à normalisation de la cuprémie [43,44].

## 2. Toxicité du cuivre

### 2.1 Les sources d'exposition au cuivre

#### 2.1.1 Exposition de la Population générale (extra-professionnelle)

La population générale peut être exposée au cuivre par l'alimentation, l'eau potable, l'air, le sol et les produits de consommation.

##### 2.1.1.1 Exposition alimentaire

La contamination peut être à l'origine d'une bioaccumulation. Les aliments d'origine aquatique (coquillages, crustacés et poissons) constituent des apports relativement importants, principalement en raison de l'activité humaine (agriculture avec l'usage de sulfate de cuivre comme fongicide, activités nautiques) [45,46].

Une étude écotoxicologique a été faite sur un animal aquatique comestible *littorina littorea* a confirmé l'existence d'une bioaccumulation du cuivre (CuS) par le milieu extérieur, par conséquent, il y'aura une intoxication par le sulfate de cuivre qui va provoquer des lésions graves [47].

Les végétaux réagissent aux éléments-trace de différentes façons selon les variétés. Certains, peu ou pas tolérants aux métaux, meurent à leur contact, d'autres leur sont tolérants et peuvent parfois les concentrer (généralement dans les feuilles), constituant de véritables bio-indicateurs de pollution des sols. On parle alors de plantes métallophiles ou « hyper accumulatrices » [48] (tableau 6).

**Tableau 6 : Aptitude de quelques végétaux à accumuler le cuivre [31].**

Aptitude à accumuler le cuivre	végétaux
<b>Fortement accumulateurs</b>	carotte
<b>Moyennement accumulateurs</b>	Laitue, betterave
<b>Faiblement accumulateurs</b>	Chou, épinards
<b>Très faiblement accumulateurs</b>	Pomme de terre

### 2.1.1.2 Expositions environnementales

Le caractère polluant du cuivre est établi essentiellement selon deux paramètres Physico-chimiques:

- ❖ Sa stabilité chimique se traduisant par une faible biodégradabilité ;
- ❖ Sa solubilité : un polluant liposoluble est plus « biodisponible » puisqu'il traverse mieux les membranes biologiques lipoprotéiques des organismes vivants.

Cependant, sa mobilité à partir des sols ainsi que les phénomènes de bioabsorption et de bioaccumulation décrits chez certains végétaux et animaux sont des paramètres qui rentrent également en compte [45].

#### a- Exposition par eau de boisson

Elle se produit principalement par l'ingestion des concentrations élevées des sels de cuivre contenus dans l'eau potable qui contribue habituellement entre 23 et 100% de l'apport quotidien adéquat en métal dans les habitations dont la tuyauterie n'est pas en cuivre ou qui ne sont pas alimentées par une eau corrosive ne dépasse que rarement (0.9mg par jour lorsque la concentration dans l'eau varie entre 0.1et 1 mg/l ).Alors que si l'eau distribuée est corrosive ,cet apport peut excéder plusieurs mg par jour. La solubilité du cuivre est en fonction du pH et de la teneur en carbone inorganique .Un pH acide ou une eau riche en carbonates augmente la concentration de cuivre dans l'eau [49].

Bien qu'il existe des techniques de traitement capables d'éliminer efficacement le cuivre à la station de traitement, le traitement par les municipalités ne constitue généralement pas une

stratégie efficace, car le cuivre est considéré comme une matière acceptable pour les installations de plomberie [50,51].

Selon l’OMS, « La consommation d’eau stagnante ou partiellement purgée à partir de systèmes d’alimentation en eau potable, dont la tuyauterie et ses raccords sont en cuivre, peut accroître considérablement l’exposition quotidienne au cuivre ».

### **b- Exposition via le sol**

Le cuivre est présent naturellement dans la croûte terrestre, il représente plus de 70% du cuivre total, ce métal y est adsorbé, mais peut être transporté par désorption et peut changer de forme par diverses réactions chimiques et selon son affinité. La contamination peut être par des processus naturels, comme le vieillissement climatique des sols, ou par l'activité humaine (comme l'agriculture, l'exploitation minière et la fabrication ou par les produits phytosanitaires (la bouille bordelaise)) [52].

Dans le sol, le cuivre s'adsorbe fortement sur des particules, en plus d'avoir une faible mobilité, avec une rétention maximale à un pH neutre. Le cuivre appliqué persiste habituellement dans la terre végétale, s'accumulant dans les couches supérieures ( $\approx 15$  cm). Son devenir et sa disponibilité dans les sols dépendent de nombreuses caractéristiques : type de sols (mobilité plus grande dans les sables que les argiles), pH (une acidité et une capacité élevée de réduction favorisent la libération des complexes d'oxydes), pouvoir d'échange cationique, teneur en eau, teneur en matières organiques et inorganiques, potentiel d'oxydoréduction, et présence d'oxydes (p. ex. oxyde de fer, de manganèse, d'aluminium) et d'argile [53,54].

### **c- Exposition atmosphérique**

L’air contribue également, mais faiblement, à l’exposition au cuivre, (la concentration atmosphérique moyenne varie de 5 à 200 ng/m<sup>3</sup>, mais peut dans certaines régions être plus élevée). Ces faibles concentrations de cuivre dans l'air ambiant permettent de supposer que l'apport provenant de l'air est négligeable par rapport à celui provenant d'autres sources [43,44].

### 2.1.1.3 Empoisonnement criminel

Les principales formes toxiques chez l'homme et l'animal sont les formes solubles du cuivre c'est-à-dire les sels du cuivre divalents II (acétate, carbonate, chlorure, hydroxyde, nitrate, oxyde, oxychlorure et sulfate...). La toxicité des sels de cuivre commence timidement à être démontrée scientifiquement depuis la fin du XXe siècle où des cas d'empoisonnement criminels ont été décrits [41].

#### *L'exemple de la ferme de Niederwyhl*

En 1987, des acheteurs ont repris une ferme située en Alsace et abandonnée depuis plus de 10 ans. Or, dès l'arrivée dans cette ferme, de nombreuses manifestations d'empoisonnement ont eu lieu : mort des animaux de ferme (sur les 850 moutons, cette espèce est très sensible au cuivre, ânes et des animaux de compagnie...), pathologies intestinales des habitants de la ferme, pas de pousse des végétaux. Des dosages de cuivre et une expertise judiciaire ont finalement montré la présence en excès de cuivre dans les sols.

Selon la propriétaire de la ferme, il s'agirait d'un empoisonnement intentionnel du site de la ferme effectué plusieurs dizaines d'années auparavant par épandage de sels de cuivre, une pratique ancienne rurale ; classiquement, ce mode d'empoisonnement apparaît très difficile à prouver. Sur ce dossier, la procédure judiciaire est ouverte depuis 2002 et une expertise de septembre 2012 établit un lien de causalité entre le cuivre, le décès d'un des habitants de la ferme et les problèmes de santé des autres personnes[46].

### 2.1.1.4 Tentatives de suicide

L'intoxication volontaire par l'ingestion d'une quantité massive de sels de sulfate de cuivre est devenue l'une des méthodes choisies pour l'autolyse par les gens. Cette intoxication engendre plusieurs symptômes qui peuvent être grave ; on note des vomissements et de la diarrhée avec fièvre ; une gastro-entérite aiguë, hémolyse et méthémoglobinémie ; un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) 4 heures après l'empoisonnement [55,56].

### 2.1.1.5 Exposition médicamenteuse

❖ Toxicité en oligothérapie : Compléments alimentaires en cuivre : la toxicité est liée à la posologie, une cure qui dépasse 1.25 mg par jour peut être une source de contamination [57,58].

❖ Les dispositifs intra –utérin au cuivre: Des cas d’allergie au stérilet en cuivre ont été déclarés [59].

#### 2.1.1.6 *Autres*

##### a- **Intoxication accidentelle**

Elle est fréquente chez les enfants qui portent tout dans leurs bouches ou par confusion (produits phytosanitaires transvasés dans des récipients qui portent à confusion).

##### b- **Bijoux en cuivre**

Le cuivre réagit avec la peau, c’est pourquoi la peau fonce après le contact avec ce métal. Le cuivre peut provoquer les réactions d’allergie, mais en général il est un métal favorable pour notre organisme. Ce métal est recommandé en cas de la fièvre. Par ex., si les bijoux en cuivre provoquent des tâches bleues sur la peau, cela peut signifier que la sueur contient un excès d’azote. Ce symptôme peut être signe des maladies des reins. Ces dernières années plusieurs études scientifiques ont été menées, l’une des plus célèbres a été conduite en Australie par les docteurs Struthers et Scott. Leurs résultats mettent en évidence la diminution des douleurs arthritiques chez les patients ayant portés des bracelets en cuivre [60].

##### c- **Les ustensiles**

Les casseroles en cuivre et en laiton vendues sont recouvertes d’un autre métal pour empêcher tout contact entre le cuivre et l’aliment. De petites quantités du revêtement peuvent se dissoudre au cours des usages répétés, surtout si l’aliment est acide [61].

#### 2.1.2 Exposition professionnelle

L’exposition professionnelle au cuivre est très fréquente dans de nombreux métiers (mines, soudage, fonderies, bijouteries, serrureries, tôleries, traitements de surface, ...) avec notamment l’augmentation importante de l’utilisation de ce métal dans. Cette exposition se fait par différentes voies :

➤ Inhalation des sels ou des fumées de cuivre (lors du soudage, extraction, la fusion et le raffinage des minerais de cuivre) peut provoquer la fièvre des métaux (voire exposition chronique au cuivre); la pénétration de particules dans les poumons en milieu professionnel dépend du diamètre de la particule « Lors du moulage d’alliages à base du cuivre dans une

fonderie, 55 à 96% des aérosols collectés contenaient des particules d'un diamètre aérodynamique  $>10\mu\text{m}$ , plus de 85% des expositions au cuivre se faisant à des particules non respirables » [62].

➤ De rare cas d'exposition au cuivre par voie cutanée chez des travailleurs qui manipulent ce métal ; des solutions concentrées des sels hydrosolubles du cuivre - dont le sulfate de cuivre- ayant des propriétés caustiques qui peut provoquer des dermites de contact [62].

**Tableau 7 : les valeurs limites d'exposition professionnelle indicatives dans l'air des lieux de travail pour le cuivre et ses composés [61].**

Substance	Pays	VME (ppm)	VME (mg/m <sup>3</sup> )
Cuivre (fumées)	France (VLEP indicative)	-	0,2
Cuivre (fumées), en Cu	Etats-Unis (ACGIH)	-	0,2
Cuivre (poussières), en Cu	France (VLEP indicatives)	-	1
Cuivre (poussières et brouillards) en Cu	Etats-Unis (ACGIH)	-	1
Cuivre et ses composés inorganiques	Allemagne (valeurs MAK)	-	0,1 (fraction inhalable)

## 2.2 Mécanisme d'action toxique

Le mode d'action toxique du cuivre est loin d'être totalement élucidé, cependant des études ont parvenu à mettre en évidence certains de ses effets toxiques.

Le cuivre métallique n'est pas nocif alors que certains de ses sels (tel que les sulfates) sont très dangereux, les effets toxiques apparaissent dans quinze à trente minutes, ils sont similaires à ceux des métaux lourds [63].

Tout dysfonctionnement au niveau du foie, de la vésicule biliaire ou des glandes surrénales altère la fonction excrétrice du cuivre et même son utilisation, il va ensuite se déposer au niveau hépatique, ce qui va perturber encore plus son excrétion et par conséquent augmenter sa rétention, et aussi au niveau du cerveau, des poumons et des articulations, de ce fait, la structure et la fonction de ces tissus se trouvent détériorées [63].

Une déficience des protéines liant le cuivre tel que la céruloplasmine et les métallothionéines est observée lors de dysfonctionnement hépatique et surrénalien ce qui permettra au cuivre libre de se déposer [63].

Au niveau cellulaire, un excès de cuivre sous forme ionisée ( $\text{Cu}^+ / \text{Cu}^{2+}$ ) va entraîner une cascade d'évènements qui peuvent aboutir à la dégradation progressive de la structure de la cellule [64]. Les principaux mécanismes de toxicité du cuivre sont:

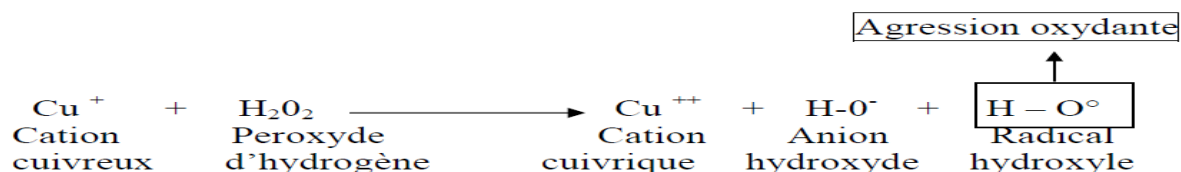
## 2.2.1 Action oxydoréductrice

### 2.2.1.1 Action par production d'ERO

Le cuivre intervient surtout comme un couple oxydo-réducteur, avec formation progressive d'Espèces Réactives d'Oxygène (ERO) responsables de l'oxydation des lipides, protéines, acides nucléiques, et des membranes [64].

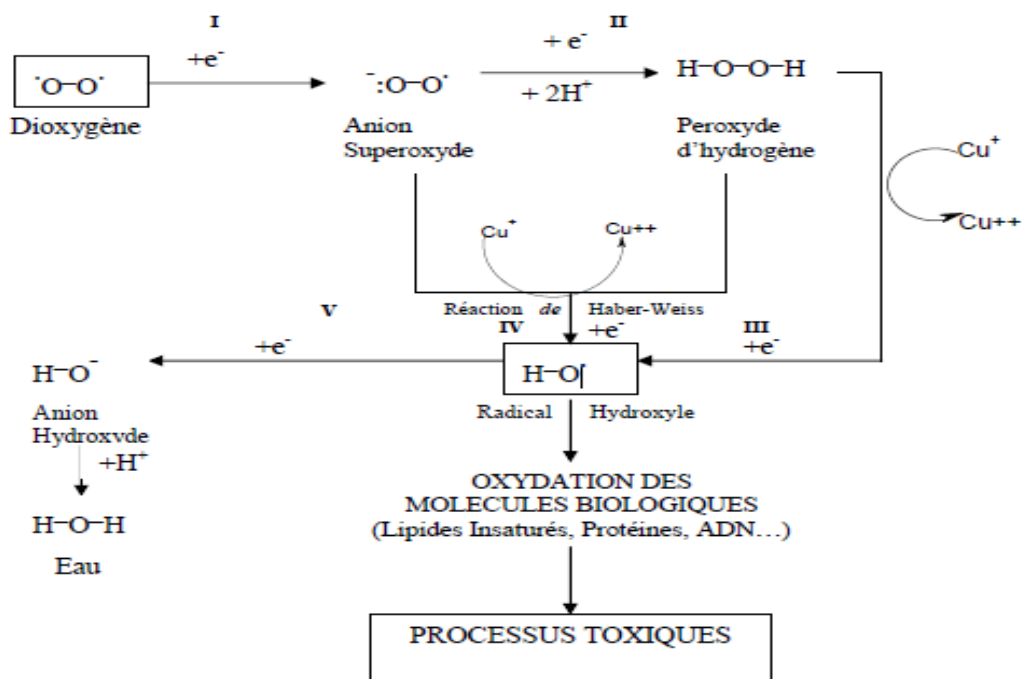
Les ERO engendrées activent l'acide sphingomyélinase ceci induit la production de céramide qui constitue un signal apoptotique, il induit aussi l'exposition de la phosphatidylsérine sur la membrane externe érythrocytaire donnant lieu à l'hémolyse [65].

Le cuivre cuivreux peut intervenir dans la production du radical hydroxyle ( $\text{HO}^\circ$ ) par réduction du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) selon la Réaction de Fenton (figure 04) [64].



**Figure 4 : Formation du Radical hydroxyle par réduction du Peroxyde d'hydrogène en présence du cation cuivreux [64].**

Le schéma suivant résume le cycle de réduction du dioxygène ( $\text{O}_2$ ) en eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (pris comme exemple), en mettant en évidence l'intervention du cuivre dans ce processus [64].



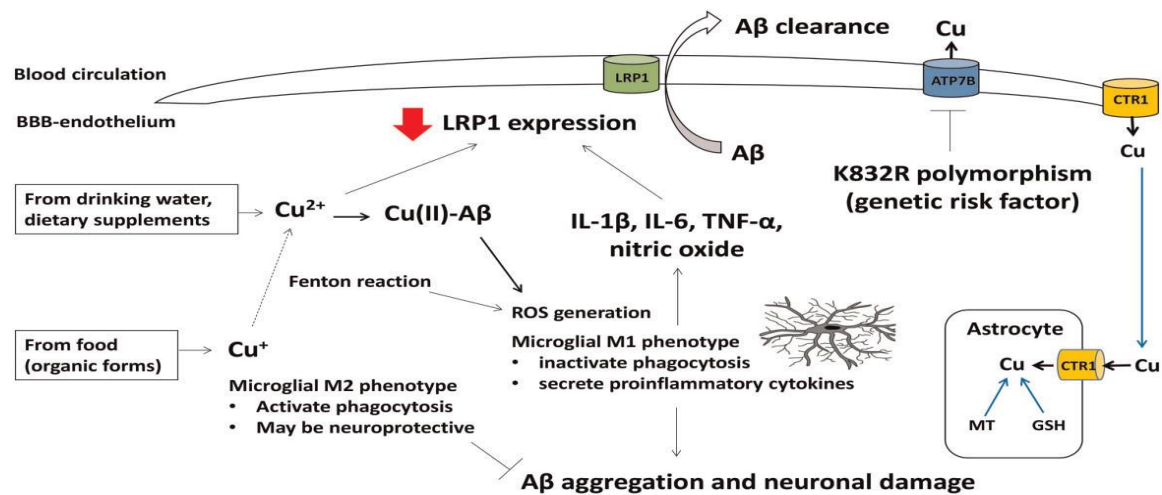
**Figure 5 : schéma explicatif de la réduction du dioxygène et l'intervention du cuivre ( $Cu^+$ ) dans ce processus [64].**

Le cuivre ionique en excès s'accumule au niveau des lysosomes et des mitochondries, il va accentuer la production des radicaux libres par les mitochondries. Au début, ces dommages mitochondriaux provoquent une oxydation lipidique excessive, ensuite une stéatose hépatocytaire constante, cette dernière va évoluer vers une cirrhose micronodulaire [66].

Au niveau central, le cuivre se trouve en extracellulaire car il n'est pas absorbé par les neurones, les noyaux gris centraux constituent la principale cible et parfois même ceux de la base [66].

Au niveau du cerveau, le  $Cu^{2+}$  forme un complexe  $Cu-A\beta$  par réaction d'oxydoréduction, ce complexe va s'agréger et subir des changements de conformation et va conduire à l'accumulation de la  $A\beta$  (La  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) est un peptide de 40 à 42 acides aminés, localisé au niveau du cerveau principalement, elle provient d'une glycoprotéine : La protéine précurseur de l'Amyloïde (APP), qui est impliquée dans la maladie d'Alzheimer) [33].

Le complexe  $Cu-A\beta$  est impliqué dans la génération des EROs et de l'inflammation, comme illustre le schéma suivant [33].



**Figure 6: Schéma résumant l'action du cuivre au niveau du cerveau [33]**

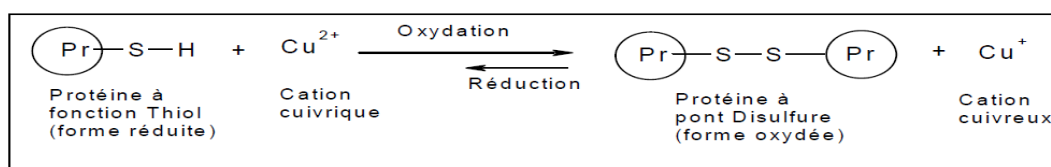
**Remarque :** Les astrocytes captent l'excès du cuivre via le récepteur CTR1 et le séquestrent avec le glutathion et la métallothionéine afin de protéger les cellules des dommages oxydatifs [67].

### 2.2.1.2 Action thioloprive

➤ Par désorganisation des protéines contenant le soufre. Il agit par compétition au niveau des groupes sulfhydriles des protéines du système pyruvate-oxydase notamment la glucose-6-phospho-déshydrogénase et de la glutathion réductase [68,69].

➤ Inactivation enzymatique notamment la glutathion réductase (protectrice contre le stress oxydatif) ou bien une action directe sur la membrane érythrocytaire responsable de l'hémolyse [63].

➤ Le  $\text{Cu}^{2+}$  interfère avec les fonctions thiols ( $\text{Pr-SH}$ ) des protéines, en formant des ponts disulfures ( $\text{Pr-S-S-Pr}$ ), le complexe ainsi formé est insoluble, cette interaction entraîne l'inhibition de l'activité des protéines, le schéma suivant illustre ce mécanisme d'inactivation [64].



**Figure7 : Oxydation des Protéines à fonction Thiol par le Cation cuivrique [64].**

L'action oxydante du cuivre se produit au niveau des acides nucléiques et des protéines riches en groupements thiols attachées à la membrane cellulaire ainsi qu'au cytosquelette [70].

### 2.2.1.3 Action méthémoglobinisante

Les ions du cuivre oxydent le fer de l'hème en fer ferrique en formant la méthémoglobine, les pigments de l'hème ainsi que le cuivre libérés lors de l'hémolyse sont toxiques pour les tubules rénaux [63].

## 2.2.2 Action sur l'inflammation

Le  $\text{Cu}^{2+}$  est responsable l'inactivation des phagocytes et la sécrétion des cytokines suite à une présentation du phénotype M1 (pro-inflammatoire) micro-glial [67].

Le  $\text{Cu}^+$  est plutôt neuro-protectif en présentant le phénotype M2 (anti-inflammatoire) micro-glial (voir la figure 3) [67]. Ainsi le cuivre est un puissant oxydant qui va déclencher le phénomène inflammatoire [38] (augmentation des protéines-C réactives, CRP) [64].

### 2.2.3 Autres mécanismes

❖ Action caustique : Les sels de cuivres (principalement acétate, carbonate, chlorure, et sulfate..... hydrosolubles) sont irritants [71] et causent des nécroses au niveau des muqueuses. [68]. La toxicité des sels de Cuivre, sous leurs formes ionisées hydrosolubles, entraîne une dégradation progressive de la structure de la cellule, ils sont donc cytotoxiques.

❖ Il a été démontré qu'une élévation du Cuivre intracellulaire va entraîner une élévation du taux de Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) qui va à son tour diminuer la concentration de l'ATP et ainsi diminuer le potentiel énergétique de la cellule, qui de ce fait, se fragilise [39]. Le cuivre inhibe la synthèse de la plupart des protéines cellulaires en affectant la machinerie de la traduction. Des études ont démontré que l'élévation des concentrations tissulaires en cuivre est associée à une perturbation des polysomes (un complexe comportant des ribosomes fixés sur un ARN messenger, dont le rôle est la traduction de l'ARNm en une chaîne peptidique) du foie et de l'endomètre, et que le cuivre peut avoir une action indirecte sur l'état de phosphorylation de certains facteurs de traduction [72].

❖ un dysfonctionnement du métabolisme du fer, lequel est très lié à celui du cuivre (modification du taux de la ferritine plasmatique) [64].

## 2.3 Toxicité liée au déficit génétique

La maladie de Wilson (MW) ou la dégénérescence hépato lenticulaire progressive est une toxicose cuprique héréditaire, de transmission autosomique récessive due à une mutation, une insertion ou une délétion du gène ATP7B entraînant un déficit fonctionnel de cette dernière provoquant ainsi une diminution ou une absence d'excrétion du cuivre dans la bile et son accumulation toxique dans l'organisme essentiellement dans le foie, le système nerveux central et la corné [73].

La prévalence de la MW est estimée à 1/25 000 ; Elle se révèle chez environ 45 % des patients par des symptômes hépatiques, chez 35 % des patients par des signes neurologiques et chez 10 % des patients par des troubles psychiatriques. Dans les autres cas, les premières manifestations sont hématologiques, rénales ou ostéo articulaires [74].

C'est l'une des rares maladies génétiques à pouvoir être traitée efficacement.

### 2.3.1 Historique

La Maladie de Wilson est signalée dès 1860 par Frerichs dans son livre « traité sur la maladie de foie ». Elle est décrite par Westphal en 1883, dans sa forme tremblante : désordre neurologique progressif avec dysarthrie tremor intentionnel, rigidité, ataxie, sialorrhée et labilité émotionnel, qui était nommée pseudo-sclérose. Strumpell en 1898 souligne la coexistence de ce syndrome avec une cirrhose.

Keyser en 1902 et Fleischer en 1903, rapportent l'anneau vert péri cornéen. Le neurologue S.A.K Wilson, dans sa monographie Brain en 1912, décrit la forme hypertonique de la maladie, appelée « dégénérescence hépato lenticulaire progressive » ; pour désigner une affection rare et constamment mortelle caractérisée par une cirrhose et une atteinte neurologique avec dystonie, une dysarthrie, une dyskinésie survenant chez les sujets jeunes.

En 1913, Rumpel envisage que la maladie est due à un trouble du métabolisme cuprique, et en 1921, Hall propose une transmission autosomique récessive.

En 1929 Vogt montre que la maladie est liée à une surcharge en cuivre. L'ère thérapeutique de la maladie débute en 1951, quand Cumings propose un traitement chélateur par le british *anti-lewisite* (BAL ou dimercaptopropanol) injectable en IM. En 1956, Walsh propose un traitement chélateur per os, la D-pénicillamine, dérivé de la pénicilline, ce médicament devient alors le traitement de référence. En 1961, Schouwink celle des sels de zinc comme

agents décuprifiants. En 1984, Schein berg et Stemlieb soulignent l'intérêt du dépistage des formes pré symptomatiques.

En 1985, les études de liaison permettent de localiser le gène défectueux sur le chromosome 13. Le gène ATP7B de la maladie de Wilson est indépendamment identifié par trois équipes au cours de l'année 1993, Bull, Tanzi et Yamaguchi. En 1995 Le produit du gène est identifié [73,75].

### 2.3.2 Génétique

Le gène responsable de la maladie de Wilson est situé sur le chromosome 13, dans la région 13q14.3-q21.1, s'étend sur 78 826 paires de bases (Pb) et comprend 21 exons. Deux acides ribonucléiques messagers (mARN) ont été caractérisés : l'iso forme a (6644 Pb) qui correspond à la protéine ATP7B complète (1465 AA, 157 kD) et l'isoforme b (6001 Pb) à une protéine tronquée de 1258 AA. La protéine complète est retrouvée surtout dans le foie, le cerveau et le rein [76].

Les hétérozygotes composites sont prédominants dans la MW, rendant les corrélations phénotype/génotype difficiles. De plus dans certaines familles, la forme clinique de la maladie peut être très différente entre frères et sœurs. Ceci peut s'expliquer, en partie, par des facteurs environnementaux et en particulier nutritionnels (taux de cuivre ingéré quotidiennement), ainsi que le génotype de l'apolipoprotéine E [77]. L'existence d'une grande variabilité des signes cliniques et aucune corrélation génotype et phénotype, suggère l'existence de gènes modificateurs pouvant entraîner une certaine capacité individuelle de tolérance ou de stockage du cuivre [75].

### 2.3.3 Épidémiologie

Il s'agit d'une maladie rare puisque l'incidence est estimée de 1/30000 à 1/100000 nouveau cas par an [74]. Cette incidence augmente considérablement dans les pays où les mariages consanguins sont courants.

En Algérie, une cinquantaine de cas sont diagnostiqués annuellement au CHU Mustapha-Bacha, estima le *Dr Réda Belbouab*, pédiatre dans le même établissement. Dont 25 malades et 25 autres cas asymptomatiques. Cependant, les estimations demeurent non fiables du fait que plusieurs citoyens ne se déplacent pas pour s'informer ou confirmer une suspicion de cas [78].

La prévalence clinique mondiale de la maladie est estimée à 30 par million avec un portage hétérozygote 1/90 [78].

### 2.3.4 Rappels de physiopathologie

Les principaux régulateurs du métabolisme cellulaire du cuivre sont deux protéines sœurs du transport du cuivre : les Cu-ATP ases (ATP7A et ATP7B). Ces deux protéines interviennent dans l'homéostasie du cuivre: fournir le cuivre aux cuproenzymes et réguler la concentration du cuivre libre intracellulaire en exportant le cuivre hors des cellules. L'expression de ces Cu-ATPase dans les organes est hétérogène. Quelques organes expriment préférentiellement une seule Cu-ATPase, comme la glande surrénale pour l'ATP7A et l'hépatocyte pour l'ATP7B. D'autres tissus comme le cerveau, l'intestin, le rein, le placenta, la glande mammaire, l'œil ou le poumon, expriment les deux Cu-ATPase, mais parfois différemment. Dans les cellules épithéliales intestinales, les deux Cu-ATPase sont exprimées, l'ATP7B ne compense pas le défaut de fonction de l'ATP7A, à l'origine de la maladie de Menkès (mutation du gène de l'ATP7A entraînant une carence sévère en cuivre) [75].

Après ingestion le métal est transporté dans la circulation porte lié à l'albumine ou des acides aminés notamment l'histidine. Il est internalisé dans les hépatocytes par le transporteur CTRL1. Une fois dans le cytoplasme, il se lie aux métallothionéines ou aux protéines chaperonnes spécifiques du cuivre (CCS, ATOX 1 et COX 17). Ainsi les cellules sont protégées de l'effet toxique du cuivre libre. CCS et COX 17 guident le cuivre vers la mitochondrie et ATOX 1 vers l'appareil de Golgi. La protéine membranaire ATP7B permet son transport à travers la membrane du réseau trans-Golgi et ainsi dans la voie sécrétoire de l'hépatocyte où il est incorporé dans la céruloplasmine [76].

Lors d'une élévation du taux de Cu dans la cellule, la protéine ATP7B est transférée aux membranes des canalicules biliaires pour une excrétion du cuivre excédentaire dans la bile. Une fois dans la bile, il n'est plus réabsorbé et est excrété dans les selles [75].

Au cours de la MW, le déficit fonctionnel en ATP7B entraîne un défaut d'élimination du Cu dans la bile; celui-ci s'accumule dans le foie, lié aux MT et sous forme libre. Des réactions d'oxydation secondaires avec notamment création de radicaux libres vont entraîner l'activation de voie de mort cellulaire avec libération du Cu dans la circulation sanguine et une élimination urinaire plutôt que biliaire [79]. Le Cu libre dit « échangeable » va alors se distribuer dans l'organisme et notamment dans le cerveau, mais aussi dans d'autres organes comme la cornée et les reins. La perte de la fonction de la protéine ATP7B conduit également à une perte d'incorporation du Cu dans la dans l'apocéruloplasmine ce qui entraîne une diminution de l'holocéruloplasmine sérique [75]. Elle demeure alors une apoprotéine dénuée

de Cu, enzymatiquement inefficace. Sa dégradation est ainsi rapide et ses taux circulants abaissés [76].

### 2.3.5 Manifestations cliniques

La maladie se révèle exceptionnellement avant l'âge de 3 ans, reflétant probablement les capacités considérables du foie à stocker l'excès de cuivre. Elle devient symptomatique dans la majorité des cas entre 5 et 35 ans. Dans une expérience portant sur 428 patients atteints de MW, 12 % ont révélé leur maladie après 30 ans. Dans la littérature ont été rapportés des cas de maladie de Wilson diagnostiqués dès l'âge de 2 ans et d'autres à 72 ans par la découverte d'un anneau de Kayser-Fleischer [75].

**Tableau 8 : Les principales expressions cliniques de la maladie de Wilson [81]**

Tableau 1 / Principales expressions cliniques de la maladie de Wilson.				
Présentation initiale	Pourcentage* (%)	Age d'apparition (années)	Expressions cliniques	Anneau de Kayser-Fleischer (% de cas)
Hépatique	50	6 à 40	Foie : +++ Tissu nerveux : ± Signes psychiatriques : ±	50
Neurologique	45	15 à 55	Foie : + Tissu nerveux : +++ Signes psychiatriques : ±	90
Psychiatrique	5	Adolescent et adulte jeune	Foie : ± Tissu nerveux : ± Signes psychiatriques : +++	90
Hémolyse	rare	Adolescent et adulte jeune	Foie : +++ Tissu nerveux : 0 Signes psychiatriques : 0	rare

\* Chiffres moyens car variables selon les auteurs.

Les manifestations cliniques de la MW peuvent se présenter sous plusieurs formes, les plus fréquentes étant une atteinte hépatique, des troubles neurologiques ou même psychiatriques.

**Tableau 9: les manifestations cliniques de la maladie de Wilson [75]**

Maladie	Les principales formes de la maladie
Découverte fortuite	Anomalies biologiques : cytolyse, thrombopénie, anémie hémolytique (Coombs négatif)
	Hépatomégalie isolée
	Splénomégalie isolée
Manifestations hépatiques	Hépatite aiguë de degré variable (voire fulminante)
	Hépatite chronique
	Cirrhose compensée ou décompensée

Manifestations neurologiques	Dysarthrie
	Tremblement d'attitude, en battement d'aile, de repos
	Dystonie focale, de fonction, généralisée
	Troubles de la marche
	Syndrome extrapyramidal
	Stéréotypies gestuelles ou verbales
	Troubles du comportement
	Comitialité
Manifestations psychiatriques	Dépression sévère
	Maladie bipolaire
Manifestations oculaires	Anneau de Kayser-Fleischer quasi constant dans les formes neurologiques
	Cataracte en fleur de tournesol
	Anomalie de l'oculomotricité
Manifestations endocriniennes	Aménorrhée
	Fausses couches à répétition
	Hypoparathyroïdie
Manifestations rénales	Lithiases
	Aminoacidurie
	Insuffisance rénale
Manifestations rhumatologiques	Ostéoporose
	Ostéomalacie
Manifestations cardiaques	Troubles du rythme
	Cardiomyopathie

### 2.3.5.1 *Manifestation hépatiques*

L'hépatopathie est constante et son spectre est large, allant d'une cytolyse asymptomatique à l'insuffisance hépatique aiguë. Aussi, les présentations cliniques de la maladie sont nombreuses. Il peut s'agir, chez des patients asymptomatiques de la découverte fortuite [75] :

- ❖ D'une élévation des enzymes hépatiques ou d'une anémie hémolytique ;
- ❖ D'une hépatomégalie ;
- ❖ D'une splénomégalie et/ou d'une thrombopénie liée à une cirrhose cliniquement silencieuse avec hypertension portale.

### 2.3.5.2 Manifestations neurologiques

Les premiers symptômes des formes neurologiques apparaissent insidieusement ; il s'agit très souvent d'une dysarthrie, parfois associée à de discrets troubles de la déglutition et à une hyper salivation. Des modifications de l'écriture, de discrets mouvements involontaires tels un tremblement, une maladresse inhabituelle voire des troubles du comportement peuvent être les premiers symptômes. Ces symptômes neurologiques dépendent de la localisation des lésions cérébrales [75].

### 2.3.5.3 Troubles neuropsychologiques

Les manifestations d'allure psychiatrique, transitoires ou durables, sont fréquentes. Une étude récente rapporte des troubles psychiatriques chez 24 % des wilsoniens : affection bipolaire (18 %), dépression majeure (4%). Bouffées anxieuses, syndromes dépressifs, voire états mélancoliques avec tentatives de suicide, délires ou hallucinations peuvent être observés. Il est important d'évoquer la MW chez un adolescent présentant des troubles du caractère ou des modifications de l'humeur (tendance anxiodépressive ou hypomaniaque) et de ne pas les considérer comme banals. *Cartwright a proposé d'évoquer la MW devant tout symptôme psychiatrique survenant avant 35 ans afin d'éviter par exemple d'administrer des neuroleptiques accentuant un syndrome extrapyramidal [75].*

### 2.3.5.4 Manifestations ophtalmologiques

L'anneau de Kayser-Fleischer est un dépôt marron, gris ou doré localisé à la périphérie de la cornée, initialement aux pôles supérieurs et inférieurs, reflètent la surcharge en cuivre.



**Figure 8 : Anneau de kayser-Fleischer**

Même si l'anneau n'est pas spécifique de cette maladie, puisqu'il peut être exceptionnellement observé au cours d'hépatopathie chole statiques non wilsoniennes, il est un élément fondamental du diagnostic [75].

Chez l'enfant, dont l'atteinte du système nerveux est plus rare, est en général absent lorsque l'atteinte hépatique est modérée ; en revanche dans les formes graves avec cirrhose du foie et/ou insuffisance hépatique, il est le plus souvent présent [75].

Une cataracte en tournesol due à la surcharge cuprique cristalline, sans retentissement visuel, est plus rare [75].

### 2.3.6 Diagnostic

Le diagnostic de la maladie de Wilson se base sur un faisceau d'arguments épidémiologiques, cliniques, para cliniques, radiologiques et histologiques [75].

Il est difficile à établir à cause des manifestations cliniques multiples, un diagnostic précoce permet d'avoir un meilleur pronostic de la maladie [80].

#### 2.3.6.1 Diagnostic clinique

L'anamnèse et la recherche des antécédents familiaux doivent être systématiques et faites d'une façon rigoureuse [75].

Tout individu de trois à cinquante-cinq ans présentant des anomalies hépatiques inexplicées, psychiatriques ou neurologiques et une hémolyse est susceptible d'être atteint de la maladie de Wilson [82].

Les données épidémiologiques (notamment la consanguinité des parents ainsi qu'un décès dans la fratrie non expliqué dont les tableaux cliniques se ressemblent) s'ajoutent aux symptômes précédemment décrits pour le diagnostic [83].

#### 2.3.6.2 Diagnostic biologique

##### Bilans non spécifiques

La numération formule sanguine (FNS) met en évidence l'hémolyse provoquée lors de la maladie de Wilson, complétée par le test de Coombs qui permettra d'éliminer une étiologie immunologique quand il est négatif (orientation vers une cause toxique probable : action toxique du cuivre qui est responsable de l'hémolyse) [73].

Le bilan hépatique, l'ammoniémie, électrophorèse des protéines ainsi qu'un bilan d'hémostase (temps de prothrombine) permettent de déceler une atteinte hépatique et d'en mesurer la sévérité voire envisager une éventuelle transplantation du foie [73].

L'ionogramme et la recherche d'une protéinurie de 24 heures pour apprécier le degré de l'atteinte rénale [73].

#### a- Dosage de l'élément (bilan cuprique)

Il est nécessaire et demandé en première intention, sauf pour la biopsie hépatique à cause de sa morbidité plus au moins importante [73].

La triade (**hypocuprémie, hypercuprurie et hypocéruleplasminémie**) est souvent corrélée au diagnostic de la maladie de Wilson, cependant elle est absente dans certains cas où seule la biologie moléculaire peut trancher [79].

L'âge, une imprégnation oestrogénique, la présence d'une inflammation aiguë et une possible hétérozygotie sont pris en compte lors de l'interprétation du bilan cuprique [84].

	Sujet sain	Maladie de Wilson
Céruleplasminémie	0,2 à 0,4 g/l	< 0,10 g/l 0,15 g/l voire normal dans 10% des cas
Cuprémie	13 à 22 $\mu\text{mol/l}$	< 10 $\mu\text{mol/l}$ Normale voire élevée en cas d'hépatite aiguë et d'hémolyse
Rapport cuivre échangeable/cuivre total	< 18,5 %	> 18,5 %
Cuprurie	< 0,8 $\mu\text{mol/24 h}$	> 1,6 $\mu\text{mol/24 h}$ Normal dans certaines formes hépatiques
Cuivre hépatique	< 0,9 $\mu\text{mol/g tissu sec}$	4 $\mu\text{mol/g tissu sec}$ Un taux normal n'exclut pas le diagnostic

**Figure 9 Bilan cuprique chez le sujet sain et en cas de maladie de Wilson [75]**

Le dosage repose sur des méthodes spécifiques notamment la spectrophotométrie d'absorption atomique type four (électrothermique) ou flamme, ICP, spectrophotométrie UV-Visible ...etc. (voir chapitre II : les méthodes de dosage du cuivre dans les matrices biologiques).

#### a-1 Cuprémie

La cuprémie totale étant constituée du cuivre lié à la céruloplasmine (92%) et le cuivre libre ionique (8%), elle est basse mais non effondrée (c'est la fraction liée à la céruloplasmine qui se trouve effondrée tandis que le cuivre libre augmente) [80].

Ce dosage donne des valeurs fluctuantes au cours de la maladie, du coup il est peu utile en pratique sauf pour l'estimation de la concentration en cuivre libre qui est potentiellement toxique, cette dernière peut être déduite par calcul de la différence entre le cuivre total et le cuivre fixé à la céruloplasmine [80].

### a-2 Cuprurie

Au cours de la maladie de Wilson le cuivre s'élimine principalement par voie urinaire, du fait de déficit fonctionnel de l'ATP7B qui ne permet plus l'élimination normale du cuivre par la bile dans les selles [75].

Le dosage de la cuprurie est indispensable au diagnostic, il est de même pour le suivi thérapeutique, il s'effectue sur des échantillons urinaires de 24 heures, répété une ou deux fois (variabilités d'un jour à l'autre influencées essentiellement par l'alimentation), recueillis dans des flacons exempts du cuivre [73,80, 83].

Chez les patients symptomatiques, le taux est systématiquement élevé ( $>100 \mu\text{g/L}$ ) sur la totalité des urines de 24 h et en absence de toute sorte de contamination par le cuivre [83].

Si le taux de cuivre urinaire est normal c'est-à-dire  $<40\mu\text{g}/24\text{h}$ , le diagnostic est pratiquement exclu (voir figure 9) [83].

Hors que dans certaines formes hépatiques la cuprurie est normale, dans ce cas un test de provocation à la D-pénicillamine est demandé et cela permet de diagnostiquer la maladie de Wilson. Ce test consiste à une administration de deux doses de la D-pénicillamine : une le matin à jeun et l'autre après 12 heures, les urines de 24 heures sont collectées depuis la prise de la première dose pour être analysées, l'excès du cuivre est alors éliminé est détecté sous forme de complexes [85].

Si la valeur du cuivre urinaire est comprise entre 40 et  $100 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ , des examens complémentaires sont demandés, ceci n'exclut pas le diagnostic de la maladie [83].

Des valeurs à la limite supérieure de la normale (proche à  $100 \mu\text{g}/24\text{h}$ ) chez des sujets pré symptomatiques ne doivent pas exclure le diagnostic, y compris dans la fratrie des patients affectés. L'élévation de la cuprurie peut être observée chez les hétérozygotes simples asymptomatiques, elle est constante et survient tardivement chez les malades symptomatiques. Une cuprurie très élevée, perturbe de façon durable la balance cuprique [73,75, 83].

### a-3 Le cuivre échangeable relatif (REC)

Le cuivre échangeable relatif (REC) constitue un excellent outil pour confirmer le diagnostic de la maladie de Wilson et reflète la fraction toxique du cuivre sanguin chez les wilsoniens. Il est peu perturbé par la D-pénicillamine [83,86].

Le cuivre échangeable (Cu EXC) est constitué de la fraction du cuivre liée à l'albumine [83].

$$\text{Le ratio (REC)} = \text{Cu échangeable} / \text{Cu total}$$

Doit être supérieur à **18,5%** (C'est l'équipe de Dr El Balkhi de l'hôpital Lariboisière qui a mis en place ce dosage avec une sensibilité (Se) et une spécificité (Sp) de 100%, il se fait actuellement en routine [79,83].

Le REC permet de différencier :

- ✓ les hépatopathies wilsoniennes des hépatopathies d'autre origine ;
- ✓ les porteurs hétérozygotes des sujets sains.

Il est donc utile dans le screening familial ainsi que dans le diagnostic différentiel [79,83].

Le cuivre échangeable est un marqueur de l'atteinte extra-hépatique et de sa sévérité (il n'est pas corrélé avec la sévérité de l'atteinte hépatique). Une valeur > 2,08 mmol/L oriente vers une atteinte de la cornée et du cerveau, l'atteinte étant d'autant plus sévère cliniquement et diffuse à l'IRM cérébrale et que la valeur est élevée. Il faut donc être prudent dans l'instauration du traitement chélateur pour ne pas risquer d'aggraver les signes neurologiques [79].

**Tableau 10 : valeurs de référence (5<sup>ème</sup>-95<sup>ème</sup> percentile) chez l'adulte sain [86].**

Cuivre total (µmol/l)	11,5 – 28,8
Cuivre échangeable (µmol/l)	0,62 – 1,23
REC (% du cuivre total)	3,4 – 8,3

Ces valeurs ne sont pas valables pour la femme enceinte ceci est probablement dû à l'augmentation de la synthèse de la céruloplasmine durant la grossesse, cette augmentation est consécutive à l'augmentation des apports cupriques visant à satisfaire les besoins de la femme ainsi que ceux du fœtus (voir apports et besoins de la femme enceinte chapitre I) [86].

#### a-4 Le cuivre hépatique

Le dosage du cuivre hépatique est indiqué en cas de suspicion de la maladie de Wilson et en absence de l'association d'une céruloplasminémie basse avec l'anneau de Kayser-Fleischer, il se fait sur biopsie au niveau du parenchyme du foie [73].

La biopsie permettra une étude histologique de l'organe pour apprécier la magnitude des lésions, elle est pratiquée sous anesthésie locale [83, 87].

Le taux du cuivre hépatique est supérieur à 250µg/g de tissu chez les wilsoniens, alors qu'il varie entre 50 µg/g – 250 µg/g de tissu chez les hétérozygotes. On retrouve habituellement des valeurs supérieures à dix fois les valeurs normales [73, 83].

#### a-5 La céruloplasmine

Le taux de céruloplasmine constitue un facteur de suspicion de la maladie de Wilson. Son dosage repose sur des méthodes immunologiques qui mesurent l'apocéruloplasmine et l'holocéruloplasmine [75].

La céruloplasminémie est diminuée voire effondrée (< 0.1g/L) chez 80% des wilsoniens et 20% des hétérozygotes asymptomatiques, ou intermédiaire dans 10 à 15 % des cas, comme elle peut être normale chez 10% des wilsoniens [83, 75].

Il faut tenir compte des variations physiologiques (état physiologique, âge, sexe...) devant une hyper ou une hypo céruloplasminémie [80].

Ainsi, devant une suspicion de la maladie de Wilson ou lors du dépistage familial, il est impératif d'effectuer trois tests nécessaires :

- ❖ *Le cuivre échangeable.*
- ❖ *Le dosage de la céruloplasmine.*
- ❖ *La cuprurie des 24 h.*

Des résultats anormaux permettront au clinicien de prescrire un traitement chélateur sans délai en attendant la confirmation définitive par la biologie moléculaire [79].

#### 2.3.6.3 Diagnostic génétique

Le bilan cuprique seul n'est pas suffisant pour poser le diagnostic de certitude du fait qu'il n'évoque pas toujours la maladie, ceci s'observe dans les cas suivants :

- Bilan cuprique normal chez certains hétérozygotes symptomatiques ;
- Cuprémie et céruloplasminémie basses chez certains hétérozygotes indemnes.

Pour cela, la biologie moléculaire est en faveur de rendre des résultats complémentaires plus fiables pour le diagnostic, deux stratégies sont utilisées [80] :

#### **a- Le diagnostic familial indirect par analyse d'haplotypes**

Le diagnostic est posé avec certitude, sans qu'il y ait des précisions concernant la nature de l'anomalie génétique, il doit être systématique pour les formes pré symptomatiques dans la fratrie des sujets atteints dont le but est le dépistage [80].

#### **b- Le diagnostic direct par recherche de mutations**

Il consiste à identifier les mutations au niveau des deux allèles du chromosome « 13 » par [80]:

- Recherche des principales mutations décrites à l'aide de la PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ;
- Criblage SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) des 21 exons du gène suivi d'un séquençage des exons anormaux.

Ces techniques sont longues, lourdes et fastidieuses. Le diagnostic est difficile du fait du nombre important des mutations et de leur diversité, une recherche sur la partie codante du gène n'aboutit à l'identification des deux mutations que chez 60 à 70% des patients [80].

### *2.3.6.4 Diagnostic radiologique*

#### **a- Imagerie par Résonance Magnétique**

C'est un outil important de diagnostic, pourtant les anomalies détectées sont peu spécifiques, les patients avec des formes neurologiques ou hépatiques ainsi que certains patients asymptomatiques présentent des anomalies de signal dans le parenchyme cérébral [73].

L'atteinte, qui est habituellement symétrique, concerne essentiellement la substance grise et rarement la substance blanche. Les localisations principales sont les noyaux gris centraux, le noyau dentelé, et la substance noire. Les corrélations entre lésions IRM et signes neurologiques sont difficiles à interpréter [80].

Remarque : Actuellement, l'IRM cérébrale est recommandée en première intention. Le scanner est réservé en cas de contre-indication à l'IRM [87].

#### **b- Tomodensitométrie**

Révèle une hypodensité des noyaux lenticulaires et une atrophie corticale dans les formes neurologiques [73].

#### **c- Échographie hépatique**

Elle a pour objectif de mettre en évidence les lésions hépatiques dont la cirrhose, qui sont responsables de toute modification morphologique [73].

#### **d- Radiologie osseuse**

Elle révèle les anomalies du squelette tel que l'ostéomalacie, l'ostéochondrose, l'arthrose etc.[73].

### *2.3.6.5 Autres examens complémentaires*

#### **a- Examen anatomo-pathologique**

**Biopsie hépatique** :Les lésions histologiques apparaissent dès l'enfance, on observe une stéatose macro vésiculaire visibles au microscope optique, une fibrose portale et péri portale à des stades avancés de la maladie, une nécrose des hépatocytes. La fibrose évolue souvent vers la cirrhose micro ou macronodulaire sans qu'il y ait une infiltration inflammatoire ou une installation d'une nécrose [73].

#### **b- Electrophysiologie**

- ❖ Un électrorétinogramme montre des ondes A photopiques et scotopiques prolongées et à moindres amplitudes [73] ;
- ❖ l'électroencéphalogramme (EEG) est anormal dans 84% des cas [73].

#### **c- Fibroscopie œsophagienne**

Permet de percevoir les signes d'hypertension portale et d'en apprécier la sévérité [87].

#### **d- Dépistage familial**

Bien qu'il ne soit pas un examen de diagnostic, il doit être systématique pour la fratrie du patient, il permet de déceler et de traiter les formes pré symptomatiques de la MW, ce dépistage comprend une céruloplasminémie, une cuprémie, une cuprurie des 24 heures et une analyse moléculaire à partir de l'âge de trois ans. En absence de consanguinité, l'analyse moléculaire chez le conjoint du patient n'est pas recommandée [87].

### 2.3.6.6 *Diagnostic différentiel*

La MW peut avoir plusieurs manifestations cliniques, biologiques ou radiologiques similaires à celles d'autres pathologies, d'où l'intérêt du diagnostic différentiel. On note :

- Pathologies hépatiques comme : l'hépatite virale (A, B ou C), l'hépatite auto-immune, l'hépatite médicamenteuse, la cirrhose biliaire primitive, etc. Un bilan biologique et éventuellement une biopsie permettra de poser le diagnostic [83] ;
- Les manifestations neurologiques peuvent être confondues avec celles de la dystonie héréditaire, l'ataxie héréditaire, la maladie de parkinson, la maladie de Huntington, etc. Avec notamment des maladies neuro dégénératives comme la sclérose en plaque, une intoxication au manganèse, une nécrose putaminale, la maladie de Niemann pick [73] ;
- Les troubles psychiques sont ainsi confondus avec la schizophrénie, trouble de personnalité ou une encéphalopathie hépatique [73] ;
- L'anneau de Kayser – Fleischer n'est pas spécifique de la maladie de Wilson, il peut être observé dans les maladies hépatiques cholestatiques, la cirrhose biliaire primitive, l'hépatite chronique active et les cholestases intra- ou extra-hépatiques, comme il peut être absent [83] ;
- La céruloplasminémie est abaissée dans l'insuffisance hépatique aigüe, lors d'une cirrhose décompensée et dans l'hypocéruloplasminémie héréditaire autosomique récessive qui peut avoir des signes cliniques similaires à celles de la maladie de Wilson [83] ;
- Un dosage de cuivre libre, urinaire et hépatique permet de poser le diagnostic différentiel des maladies de Menkès et de Wilson [83].

#### **Synthèse :**

Le diagnostic de la MW n'est pas facile à établir car le tableau clinique, les circonstances diagnostiques, l'âge de l'apparition de la pathologie (de quatre à trente-cinq ans) et même les résultats biologiques ne sont pas toujours typiques et évocateurs [83, 87].

En 2001, lors de la huitième conférence internationale sur la MW et la maladie de Menkès à Leipzig, en Allemagne, un score pour le diagnostic de maladie de Wilson (score de Leipzig) a été discuté. Le tableau suivant regroupe les différents items, il prend en compte la symptomatologie clinique, les marqueurs biologiques et le génotypage. [83]

<b><u>Anneau KF :</u></b>		<b><u>Cuivre hépatique (en absence du choléstase) :</u></b>	
- Présent	2	- >5 x N (>250 µg/g)	2
- Absent	0	- 50-250 µg/g	1
<b><u>Signes neurologiques :</u></b>		- N<25 µg/g	-1
- Sévères	2	- Granulome à coloration Rhodamine positive	1
- Modérés	1	<b><u>Cuprurie de 24h (en absence d'hépatite aigue) :</u></b>	
- Absents	0	- Normal	0
<b><u>Céruleplasminé :</u></b>		- 1-2 x N	1
- Normal (> 0.2 g/l)	0	- 2 x N	2
- 0.1- 0.2 g/l	1	- Normal mais 5 x N après la D-pénicillamine	2
- < 0.1 g/l	2	<b><u>Etude des mutations :</u></b>	
<b><u>Anémie hémolytique à test de Coombs négatif :</u></b>		- Mutations dans les 2 chromosomes	4
- Présente	1	- Mutation dans un seul chromosome	1
- Absente	0	- Pas de mutation	0

**Figure 10: le score de Leipzig développé à la 8<sup>ème</sup> conférence internationale sur la maladie de Wilson en 2001.**

- ❖ Ce score est en faveur d'une MW lorsqu'il est supérieur à quatre [83] ;
- ❖ Les patients avec un score total de deux à trois ont été considérés comme « susceptibles d'avoir la maladie de Wilson, encore plus d'investigations peuvent être effectuées » [83] ;
- ❖ Le diagnostic de la maladie de Wilson a été jugé improbable pour les évaluations entre zéro et un [83].

Le diagnostic met en moyenne deux ans pour être posé quand les troubles neurologiques ou psychiatriques apparaissent en premier [87].

Remarque : le dosage de la cuprurie n'est pas demandé en routine en cas d'intoxication aigue au cuivre, surtout en cas d'insuffisance rénale.

Les deux figures suivantes illustrent des démarches à suivre en cas d'un bilan cuprique anormal

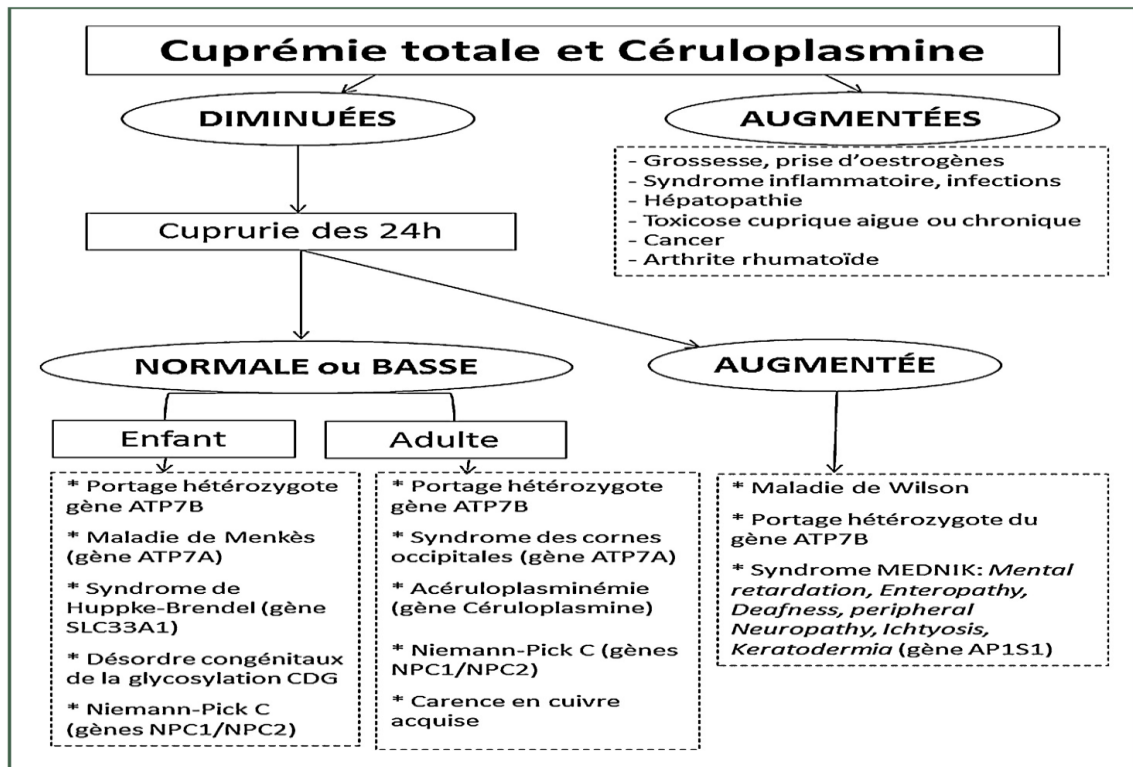


Figure 11 : schéma montrant les étiologies possible en cas du bilan cuprique perturbé

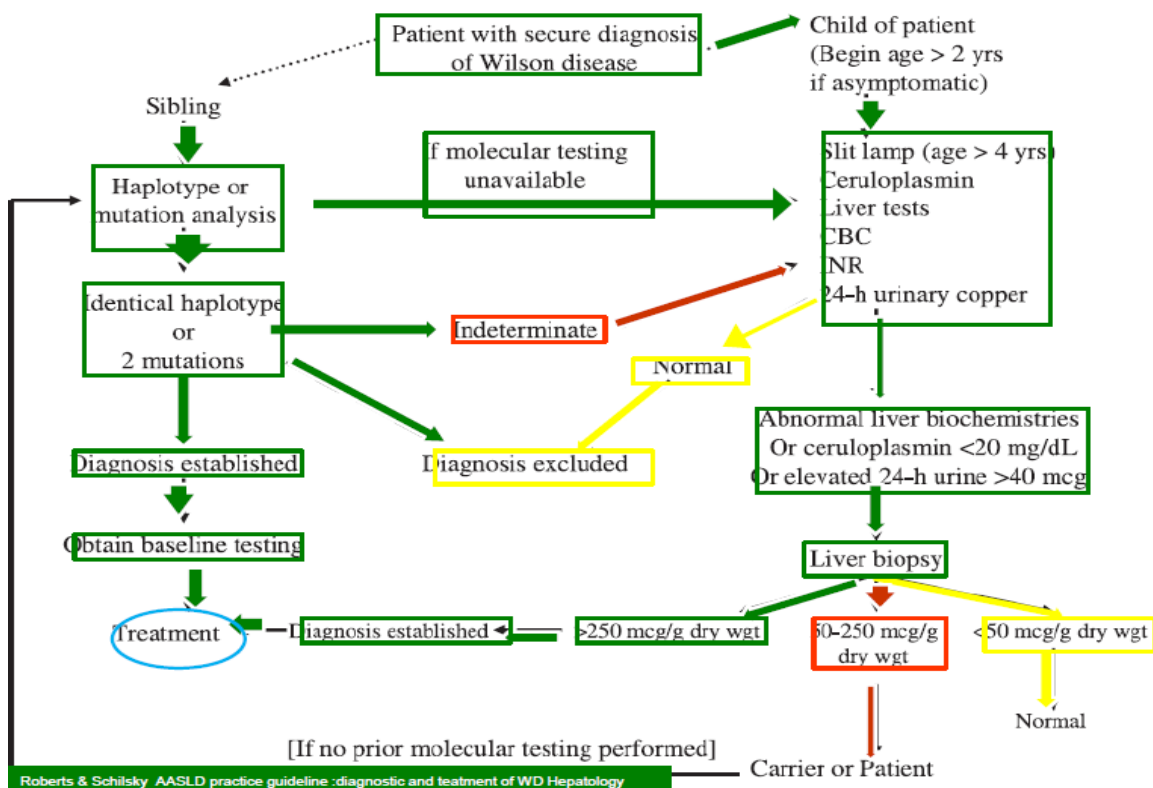


Figure 12:schéma explicatif des étapes du diagnostic devant un bilan cuprique perturbé [82].

### 2.3.7 Traitement, la prise en charge et la prévention de la maladie de Wilson

Le traitement de la MW doit être introduit dès que le diagnostic est retenu. Le but de traitement de fond de cette anomalie génétique est de faire diminuer le stock global du cuivre dans l'organisme pour éviter l'accumulation toxique de ce métal, donc la stratégie thérapeutique consiste dans un premier temps à éliminer la quantité de cuivre en excès dans le foie et les organes cibles, y compris le cerveau, puis de prévenir l'accumulation à nouveau, en administrant un chélateur du cuivre à vie (formant un complexe stable avec lui) et un régime bas en cuivre .

#### 2.3.7.1 Les moyens thérapeutiques

##### a- L'éducation thérapeutique

Elle consiste à la bonne compréhension du malade atteint de l'anomalie et de ses proches. L'information doit porter sur [88]:

- La maladie : Ses symptômes, en précisant les signes d'alarme qui doivent conduire à une consultation ;
- Les traitements prescrits et leurs éventuels effets indésirables ;
- L'importance du suivi thérapeutique à vie et les risques d'aggravation éventuellement irréversible de la maladie à l'occasion d'une rupture thérapeutique ;
- La planification des examens de routine ou de dépistage des complications ;
- Les conseils diététiques.

##### b- Le régime alimentaire

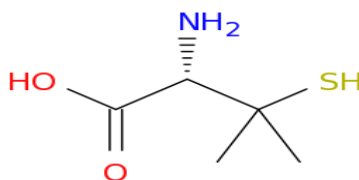
En pratique, un régime alimentaire pauvre en cuivre ne peut être mis en place, tant celui-ci est présent dans de nombreux aliments. Les spécialistes recommandent un régime contenant moins de 1 mg /j de cuivre chez l'adulte et moins de 0.5 mg chez l'enfant en début de traitement (les 6 premiers mois lors de la phase de mobilisation du cuivre) [88].

##### c- Traitement médicamenteux

###### *c-1) D-pénicillamine : TROLOVOL*

Découvert par WALSH en 1956, Cette molécule est considérée comme le traitement de choix dans la MW (molécule de première intention).La présence d'un groupement Sulfhydrile

SH confère à la D-pénicillamine ses principales propriétés [89]. Elle existe sous deux formes isométriques : la forme dextrogyre (D) seule utilisée en clinique, la forme lévogyre (L) ayant des effets plus toxiques [90].



**Figure 13 : Structure de la D-pénicillamine.**

✚ *Pharmacocinétique :*

Rapidement absorbée dans l'intestin avec une courbe à double pic pour l'absorption intestinale. Diminuée avec la prise de repas de 50%. Sa biodisponibilité totale est estimée à 40 à 70%. Une fois absorbé, 80% de la pénicillamine circule liée aux protéines plasmatiques, car elle forme des dimères inactifs ou se lie à la cystéine. Son temps de demi-vie est de 7 H. Elle est métabolisée dans le foie. La voie d'élimination est principalement rénale, seulement 30% sous forme inchangée et libre, la majorité étant excrétée comme des bisulfures qui représentent les composés principaux trouvés dans l'urine [89,91].

✚ *Mécanisme d'action :*

Elle agit essentiellement en formant des complexes stables avec le cuivre ionique en excès grâce à ses groupements thiols ; **elle forme des complexes avec le cuivre associé à l'albumine *in vitro*, en réduisant le cuivre et libérant [D-pénicillamine - cuivre]**. La capacité du médicament de réduire Cu II à Cu I (qui est moins fermement complexé à la protéine ligand) peut être essentielle à sa capacité de mobiliser du plasma le cuivre attaché à la protéine. Ces complexes seront sécrétés dans l'urine [82].

Par ailleurs, il a été aussi suggéré que la molécule réduirait la toxicité cellulaire du cuivre intra hépatique en facilitant sa séquestration sous forme non toxique et la formation des complexes cupriques ou bien en induisant la formation de métallothionéine qui facilitent la séquestration du cuivre intra-entérocytaire et intrahépatique [92].

La D-pénicillamine entraîne une diminution du cuivre libre sérique (non céruloplasmine), en liant ce dernier et le rend disponible pour la filtration glomérulaire.

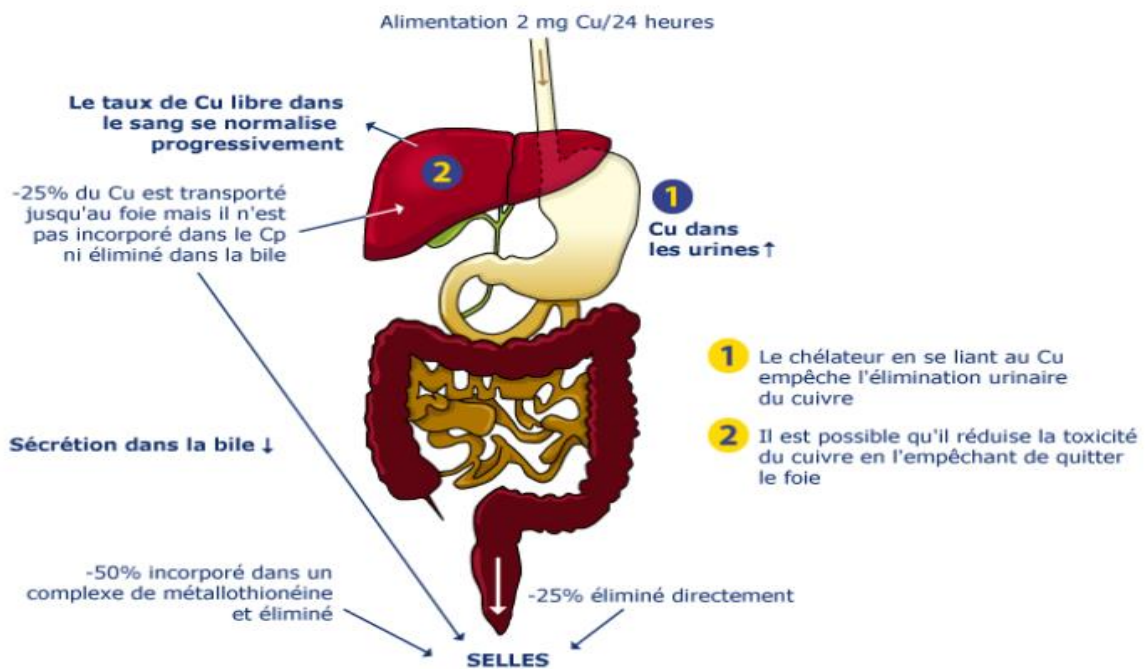


Figure 14 : wilsonien traité par un chélateur du cuivre [93].

#### ⚠ Effets secondaires et contre-indication

Une aggravation des symptômes peut survenir chez 10 % des patients (20 à 30 % en cas d'anomalies neurologiques) en début de traitement durant les 6 à 8 premières semaines, résultant de la mobilisation et de la redistribution des stocks de cuivre, avec une augmentation des taux de ce dernier dans le plasma et le cerveau, et peut nécessiter de baisser les doses.

Des effets tératogènes ont été décrits, avec une déposition de fer dans le foie et le placenta du fœtus. Lors de l'arrêt du traitement sans remplacement pendant la grossesse, des formes fulminantes d'hépatopathie ont été décrites. Le lait maternel contient moins d'éléments traces.

La pénicillamine peut aussi entraîner une carence en cuivre, en pyridoxine (et causer une poly neuropathie, une neuropathie optique et des crises épileptiques) [89,91].

#### c-2) Tri éthylène-tétramine dihydrochlorate (Trientine)

Une molécule de deuxième intention, instaurée en cas d'intolérance à la pénicillamine, ce médicament est moins bien absorbé que la D-pénicillamine par voie intestinale, elle est aussi facilement métabolisée sous forme d'acétyl trienne qui est un moins bon chélateur et il faut aussi noter que la perte des symptômes neurologiques est plus lente. Cette molécule, peut être utilisée au début du traitement, mobilise le cuivre tissulaire, entre en compétition avec la fraction lié à l'albumine, augmente l'excrétion urinaire et diminue l'absorption intestinale [93].

### c-3) Sulfate de zinc (les sels de zinc)

Dans le schéma thérapeutique de la MW, les sels de zinc constituent un traitement alternatif pour la pénicillamine et la trientine, ou constituent une thérapie prophylactique chez les frères et sœurs asymptomatiques d'un malade nouvellement diagnostiqué .Ils agissent en bloquant l'absorption du Cu dans l'intestin, aussi en induisant la MT qui se lie au Cu et l'empêche d'atteindre le sang et le foie, mais leur action est plutôt lente [93].

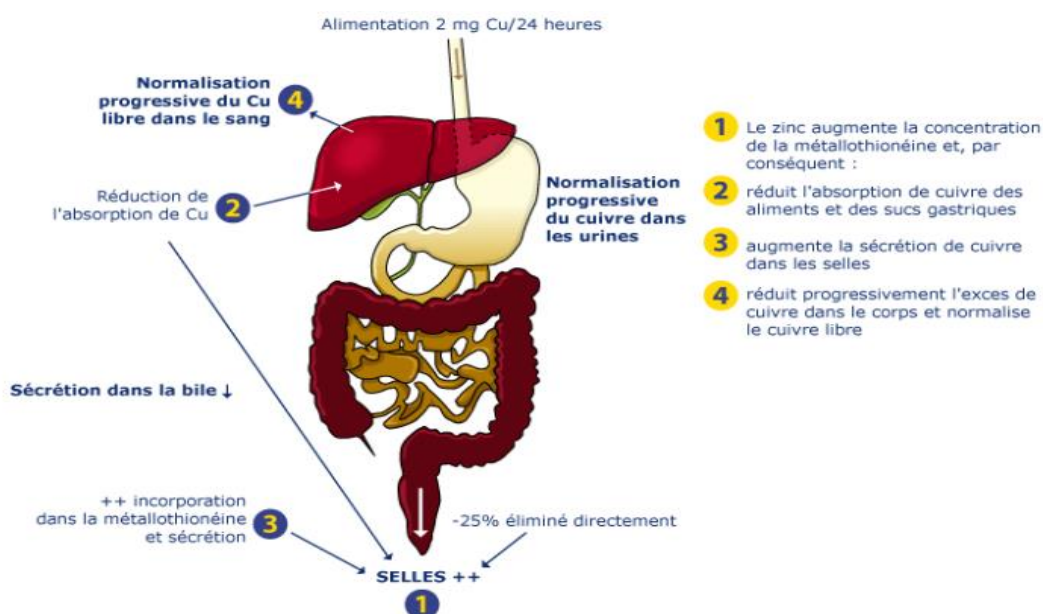


Figure 15 wilsonien traité par le zinc [93].

### c-4) Dimercaprol : (B.A.L. ®)

Le premier agent chélateur utilisé. Cette thérapie avec le Dimercaprol a été abandonnée à cause des effets indésirables sauf pour les malades ayant une intolérance au pénicilline et trientine [93].

### ***c-5) Traitement symptomatique***

#### **- Toxine botulique**

Elle améliore la qualité de vie en limitant les rétractions tendineuses et peut permettre d'éviter une chirurgie lourde. Elle a une action antalgique sur les dystonies et hypertonies douloureuses. Mais ce traitement symptomatique est coûteux à forte dose, et ne doit être utilisé qu'à titre provisoire pour surmonter les périodes difficiles [94].

#### **- Rééducation motrice et orthophonique**

Très importante dans les formes neurologiques [94].

#### **- Antidépresseurs et antiparkinsoniens**

- Il faudrait préférer les antidépresseurs imipraminiques.
- Les Benzodiazépines peuvent avoir une efficacité contre les tremblements.
- Les anticholinergiques peuvent aider à lutter contre le syndrome parkinsonien et notamment avoir une efficacité sur l'hyper salivation [94].

### **c-6) Traitement adjuvant**

Différents traitements peuvent être associés [94] :

- ❖ la Pyridoxine 25 mg/ jour en prévention de l'épilepsie induite par D-Pénicillamine.
- ❖ le Sulfite de potassium qui diminuerait l'absorption du cuivre.
- ❖ la Vitamine C qui préviendrait la survenue d'effets secondaires sous D-Pénicillamine.
- ❖ la Vitamine E comme antioxydant.

### **c-7) Transplantation hépatique**

La plus grande majorité des patients répond favorablement aux traitements conventionnels. La transplantation permet de traiter la maladie hépatique et de normaliser définitivement le métabolisme du cuivre. La première opération réussie dans ce cadre fut réalisée en 1969 [94].

### **d) La prévention**

Une enquête génétique est faite dans la famille du patient atteint, et le dosage régulier de la céruloplasmine et du cuivre sanguin et urinaire, de façon à dépister le plus tôt possible une éventuelle maladie de Wilson [94].

### 2.3.8 Pronostic

Le pronostic de la maladie dépend étroitement de la précocité du diagnostic et de l'administration rapide du traitement [79].

- ✓ Un traitement efficace permet de normaliser les signes cliniques et biologiques, cette amélioration est lente et peut prendre un à deux ans [79] ;
- ✓ La cirrhose, une fois constituée, est irréversible ; cependant, son évolution peut être stabilisée [79] ;
- ✓ Une amélioration de l'atteinte neurologique peut s'observer au bout de trois à six mois, voire même une guérison totale, mais souvent les patients conservent une monotonie de la voix, un sourire dystonique et une hyperémotivité. Cependant, des rechutes à évolution fatales peuvent être observées non influencées par le traitement [79] ;
- ✓ Le tremblement, l'hypertonie des membres, l'akinésie, les épisodes psychotiques répondent souvent mieux au traitement que les dystonies axiales, la dysarthrie et les troubles de comportement [79] ;
- ✓ L'anneau de Kayser-Fleischer commence à disparaître à partir de ses bords latéraux, puis complètement au bout de trois à quatre ans (chez 90% des Wilsoniens) [79] ;
- ✓ Les formes psychiatriques sont améliorées si le traitement est instauré à temps [79] ;
- ✓ Dans les formes asymptomatiques découvertes par l'enquête familiale, le traitement prévient complètement le développement de la cirrhose et l'apparition de manifestations neuropsychiatriques [79].

## 2.4 Toxicité acquise du cuivre

La toxicité du cuivre est sa capacité à produire des effets délétères (troubles cliniques, biologiques ou fonctionnels) sur l'organisme après interaction avec la matière vivante. Elle est dépendante de la dose de ce métal, de la fréquence et de la durée d'exposition et du temps d'apparition des signes cliniques. Il convient de distinguer deux formes de sa toxicité :

### 2.4.1 L'intoxication aigue

Le cuivre et ses dérivés présentent des niveaux de toxicité aiguë différents mais rares. La plupart sont nocifs par voie orale (par accident ou tentative de suicide), nocifs ou toxiques par inhalation des fumées de cuivre et irritants pour les yeux.

### 2.4.1.1 Par ingestion

La dose létale du cuivre est mille fois plus importante que l'apport alimentaire quotidien en cuivre (Des doses létales orales ( $DL_{50}$ ) de 15 à 1 600 mg Cu/kg pour diverses formes de cuivre ont été rapportées chez plusieurs espèces; par exemple, pour les rats la  $DL_{50}$  était de 120 à 300 mg/kg pour le sulfate de cuivre(II) et de 15 à 90 mg/kg pour le chlorure de cuivre(II)) [95]. Les sels solubles déclenchent généralement des réponses plus fortes que les formes insolubles [85]. Il ne faut pas banaliser les ingestions importantes de sels de cuivre, car elles pourraient s'avérer fatales [96].

#### a- Symptômes :

**a-1 Une forme typique :** Elle s'observe après l'ingestion aiguë de sels de cuivre, elle est représentée par une symptomatologie bruyante initialement et essentiellement digestive: syndrome dysentérique (irritation et inflammation sévère du tractus gastro-intestinal) avec nausées, céphalées, diarrhées et vomissements qui peuvent présenter une coloration bleu-vert, en fonction de la quantité de sels de cuivre ingérée, hématuries et melæna. Des douleurs rétro sternales et un goût métallique dans la bouche sont également des manifestations fréquentes. Des symptômes tels que, l'ulcération et la perforation gastrique sont moins courants [96,97].

**a-2 Une forme systémique :** En cas d'ingestion des quantités supérieures à 1 g, des effets systémiques sont généralement décrits[96,98]. Une gastroentérite avec ulcération et saignement, anémie profonde liée à une hémolyse intra vasculaire, nécrose hépatique et nécrose rénale tubulaire aiguë, une déshydrations et hypotension, choc, tachycardie et une polypnée aussi une léthargie convulsion et éventuellement une rhabdomyolyse [99].

### 2.4.1.2 Par inhalation

L'inhalation des particules de sels de cuivre en milieu professionnel peut engendrer une intoxication sévère [100]. Elle engendre des irritations des voies respiratoires ; Un syndrome pseudo grippal similaire à la fièvre des fondeurs de laiton (fièvre des métaux) et une irritation des voies supérieures par l'inhalation de fumées de cuivre (par exemple : le soudage) [96].

*La fièvre des métaux (MFF : metal fume Fever) :* considérée comme bénigne est due à l'inhalation de fumées de certains métaux (Zn, Cu, Al, Ag, Sn, Fe, Cd, Hg, Mn). Les

symptômes apparaissent 4 à 8 h après le début de l'exposition (généralement lors du travail à chaud), ils ne sont pas spécifiques, mais généralement analogues à ceux de la grippe [101] :

- ❖ Céphalées, asthénie.
- ❖ Myalgies, arthralgies.
- ❖ Hyperthermie (39 à 40°C), frisson et hypersudation.
- ❖ Sensation d'irritation respiratoire.
- ❖ +/- Nausées, douleurs abdominales.

❖ Un goût douceâtre ou métallique dans la bouche qui altère le goût de la nourriture et des cigarettes est également signalé, ainsi qu'une sécheresse ou une irritation de la gorge qui provoque une raucité de la voix [102,103].

Le diagnostic et le traitement de la MMF :

- ❖ Auscultation thoracique : normale.
- ❖ Radiographie pulmonaire : normale.
- ❖ Hémogramme : Polynucléose neutrophile.
- ❖ Fièvre et hyperleucocytose culminent à : H9 à H 12.
- ❖ Guérison en 24 à 48 heures.

Aucun traitement n'est nécessaire.

#### 2.4.1.3 La Chalose (irritation des yeux)

C'est la coloration verdâtre de l'iris de l'œil ou plus rarement, le cristallin, le corps vitré et la cornée, par une particule de cuivre intraoculaire [96,103].

#### 2.4.1.4 Voie cutanée

Les solutions concentrées des sels hydrosolubles ont des propriétés caustiques pour les muqueuses, quelques rares cas de dermatites de contact ont été décrits chez des travailleurs exposés au cuivre métallique et à ses composés [104].

Plusieurs études ont montré que les réactions de sensibilisation au cuivre sont extrêmement rares. Les patients qui réagissent positivement étaient également sensibilisés au nickel ou à d'autres métaux. Un grand nombre de tests positifs n'ont pas de pertinence clinique et correspondent plutôt à de faux positifs [104].

### 2.4.2 Diagnostic

Le diagnostic d'intoxication est basé sur l'interrogatoire, en particulier l'occupation du patient, et par la mesure du cuivre sérique, bien que les concentrations ne sont pas en corrélation avec la sévérité du tableau clinique mais en corrélation avec la gravité des symptômes et peuvent prédire le pronostic avec plus de précision [105]. Le diagnostic est confirmé par :

- Dosage de la cuprémie (normale = 0,8-1,5 mg/L)
- En cas d'intoxication sévère, la concentration plasmatique dépasse 5 mg/L [106].
- Une biopsie hépatique, qui peut montrer des corps hyalins de Mallory [106].

### 2.4.3 Traitement

La prise en charge de l'intoxication aiguë repose sur trois axes [101,107]:

#### 2.4.3.1 Un traitement symptomatique

Qui est administré pour prendre en charge les désordres hydro-électrolytiques et les troubles digestifs. Un remplissage vasculaire est effectué si cela s'avère nécessaire.

#### 2.4.3.2 Un traitement épurateur

Qui est réalisé à l'aide d'émétisants, dans le cas où le patient ne présente pas de vomissements spontané ou par lavage gastrique avec alimentation parentérale avec des inhibiteurs de la pompe à protons par voie injectable. Le traitement épurateur par hémodialyse n'est justifié que si l'insuffisance rénale aiguë est mal tolérée, aucune donnée n'affirmant l'intérêt de l'épuration extrarénale pour éliminer le cuivre uniquement.

#### 2.4.3.3 Un traitement spécifique

Qui repose sur l'administration d'un agent chélateur dans le but d'augmenter l'excrétion urinaire du cuivre. La D-pénicillamine (TROLOVOL®) constitue le chélateur de première intention, elle est administrée par voie orale, à forte dose. Si la voie per os n'est pas possible à cause des troubles digestifs, le Dimercaprol (BAL®) est administré par voie intramusculaire.

- D-Pénicillamine orale 250 mg q 6 h à 750 mg q 12 h (1000 à 1500 mg/jour en 2 à 4 doses).
- Dimercaprol 3 à 5 mg/kg IM q 4 h pendant 2 jours, puis q 4 à 6 h).

La fonction rénale s'améliore avec la prise des chélateurs de cuivre.

En cas de Projections cutanées ou oculaires ; un lavage abondant à l'eau, aussi précoce que possible.

La prise en charge des cas d'intoxication aiguë nécessite un suivi régulier et adapté en milieu de soins intensifs et ce afin d'éviter le recours aux alternatives thérapeutiques invasives notamment l'hémodialyse et éventuellement une épuration avec le système MARS pour certains praticiens [107].

#### 2.4.4 Toxicité chronique

La toxicose cuprique chronique est rencontrée principalement en cas d'exposition professionnelle à long terme, à la suite d'une exposition répétée au cuivre, que ce soit par inhalation de poussières ou de fumées ou par contact direct avec des particules de cuivre métal ou avec des sels de cuivre.

##### 2.4.4.1 Les manifestations de la toxicité chronique du cuivre

###### ❖ Effets systémiques [107]

➤ *Des effets locaux et cutanés* : Teinte verdâtre des cheveux, des dents, des gencives et de la peau, conjonctivite et œdème des paupières, congestion nasale avec ulcération de la cloison nasale, dermite d'irritation et parfois eczéma par contact avec les poussières ;

➤ *Des atteintes pulmonaires* : Irritation pulmonaire, fibrose granulomateuse et augmentation de la fréquence des cancers broncho-pulmonaires chez les viticulteurs utilisant de la bouillie bordelaise, chez les mineurs et les raffineurs du cuivre.

➤ *Des troubles hépatiques* : Fibrose, cirrhose micronodulaire et hépatomégalie par accumulation de cuivre.

➤ *Au niveau sanguin* : Une augmentation de la cuprémie et de la céruloplasminémie.

###### ❖ Effets cancérigènes

Les données épidémiologiques et animales ne permettent pas de conclure sur la cancérogénicité du cuivre, ni des composés du cuivre [107,108]. L'Union Européenne, CIRC (centre international de recherche sur le cancer) et L'U.S.E.P.A (United States Environmental Protection Agency) classent la cancérogénicité du cuivre comme suit :

**Tableau 11 : classification de la cancérogénéicité du cuivre et ses dérivés[111].**

<b>L'Union Européenne</b>	Le chlorure cuivreux, l'oxyde cuivreux, le sulfate de cuivre, ont été examiné mais non pas été classés cancérigène.
<b>CIRC-IARC</b>	Classe 3(agent inclassable quant à sa cancérogénéicité) : le 8-hydroxyquinoléate de cuivre ne peut être classée pour sa cancérogénéicité pour l'homme (depuis 1987) Pour les cuivre et autres composés, il n'existe pas de classification
<b>U.S.E.P.A</b>	Classe D : substance non classifiable quant à sa cancérogénéicité pour l'homme

#### ❖ Effets sur la reproduction

Les études sur les fonctions de reproduction et sur le développement menées avec le cuivre ne révèlent pas d'effet toxique particulier ; des effets sont observés uniquement en présence d'une toxicité maternelle [109].

#### ❖ Effets génotoxiques

Les différentes études disponibles tendent à démontrer l'absence d'effets génotoxiques des dérivés du cuivre après administration par voie orale [109].

#### 2.4.4.2 Traitement

Cette accumulation progressive de cuivre dans l'organisme, à l'origine de ces manifestations, doit être prise en charge médicalement et le traitement le plus efficace correspond à l'administration, par voie orale, de D-pénicillamine [107,108].

#### 2.4.4.3 Prévention

Afin de limiter l'exposition professionnelle, des mesures préventives doivent être mises en place sur le lieu de travail : mesures techniques collectives (ventilation des locaux, systèmes d'aspiration de poussières et fumées...) et individuelles (port de gants, d'un masque...). Par ailleurs, la prévention repose également sur une surveillance périodique de l'état de santé des travailleurs exposés et sur une surveillance de l'environnement, les valeurs limites d'exposition professionnelle du cuivre étant :

- Le cuivre (fumées) : VLEP-8h = 0,2 mg.m<sup>-3</sup>[110].
- Le cuivre (poussières) : VLEP-8h = 1 mg.m<sup>-3</sup> [110].

## 2.5 Les méthodes de dosage du cuivre dans les matrices biologiques

Les dosages du cuivre sanguin et urinaire ne sont pas de pratique courante en milieu professionnel. Il existe de grandes variations des concentrations de cuivre dans le sang et les urines parmi la population non professionnellement exposée. De nombreux facteurs viennent influencer les résultats (grossesse, traitement oestrogénique, contraceptifs oraux, hyperthyroïdie, hémochromatose, infections, pathologies hépatiques...) [112].

Les contaminations métalliques étant le principal écueil lors de l'analyse des éléments traces, il est nécessaire de prendre certaines précautions lors du prélèvement (aiguilles, tubes, bouchons, antiseptiques flacons en polyéthylène pour les prélèvements urinaires...) et de l'acheminement (conservation, transport) au laboratoire. Pour cela, il est primordial que le médecin du travail prenne contact avec le laboratoire effectuant l'analyse (mais également avec celui qui fait le prélèvement s'il est différent) afin de se faire préciser les procédures de prélèvement et d'acheminement et les pièges à éviter.

Dans tous les cas, les prélèvements doivent être réalisés en dehors des locaux de travail, au mieux après une douche et au minimum après lavage des mains pour limiter le risque de contamination, par un laboratoire participant au contrôle de qualité pour cet élément trace [112].

Avant le dosage, il est nécessaire de procéder à une « dissolution/digestion » destinée à libérer le cuivre lié aux différents substrats (matière organique, complexes, etc.) et mettre en solution l'analyte.

Si les techniques d'analyses nécessitent une étape de préconcentration, elle peut être réalisée par procédé de Co-précipitation ou par évaporation. Une préconcentration sélective peut être employée avec des résines échangeuses d'ions. Cependant certaines techniques deviennent suffisamment sensibles (ICP MS) pour ne pas avoir recours à une étape de préconcentration [113].

Il existe de nombreuses méthodes permettant le dosage des différentes fractions du cuivre dans les différents milieux biologiques.

### 2.5.1 Les méthodes spectrométriques

La détection des métaux lourds est principalement réalisée par des techniques spectroscopiques :

- ❖ la spectrométrie d'absorption atomique (SAA flamme / SAA four) ;
- ❖ la spectrométrie d'émission optique par ionisation de flamme (F-OES) ;
- ❖ la spectrométrie d'émission optique avec plasma induit par haute fréquence (ICP-OES) ;
- ❖ la spectrométrie de masse avec plasma induit par haute fréquence (ICP-MS) ;
- ❖ fluorescence aux rayons X (XRF) ;
- ❖ et les techniques l'analyse par activation neutronique instrumentale (INAA).

Les techniques de spectrométrie atomique optique ont pour principe l'étude de l'absorption et de l'émission de photons lors de la restructuration atomique des analytes à doser, préalablement mis sous forme d'atomes libres. On ne va développer dans ce paragraphe que certaines méthodes spectrales qui sont les plus utilisées :

#### 2.5.1.1 La spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

Le principe repose sur l'absorption par les éléments à l'état atomique d'un rayonnement issu d'une lampe à cathode creuse ou à décharge. Compte tenu de la nature discrète des niveaux d'énergie des atomes, la source lumineuse doit contenir l'élément à analyser ; ainsi son spectre d'émission correspond exactement au spectre d'absorption de l'élément à analyser [114].

#### 2.5.1.2 La spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma (ICP-MS)

Elle constitue la méthode de référence. Le composé à analyser est introduit sous forme de gaz et une très faible quantité de ce composé est ionisée dans un plasma d'argon selon deux modes principaux : soit par impact avec des électrons, soit par ionisation chimique. Les ions sont ensuite séparés en fonction du rapport masse /charge qui est caractéristique de chaque élément. Le principe repose sur le fait que l'échantillon est amené jusqu'à la torche à plasma par une pompe péristaltique. Le plasma issu du couplage inductif d'électrons libres avec des oscillations rapides du champ magnétique est généré par l'argon. Au contact de l'argon, l'échantillon est nébulisé puis transporté jusqu'au centre du plasma où la température est proche de 8000 °K. Il est alors atomisé puis ionisé dans sa totalité sous forme de cations

monovalents. Dans ces conditions, les éléments métalliques, les métalloïdes, les alcalins, les alcalino-terreux, les lanthanides et les actinides sont ionisés à plus de 90 % [115].

### 2.5.1.3 Absorption UV-Visible

La spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (UV-Visible) basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules ou complexes, d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer-Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, aussi bien qu'une étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorption [117].

Le dosage du cuivre par cette méthode repose sur les propriétés Red/Ox du couple ( $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ ). Ex : les ions  $\text{Cu}^{2+}$  une fois réduit en  $\text{Cu}^+$  se complexe avec la néocuproïne pour former un complexe jaune orangé [118].

Le tableau 12 récapitule les principales caractéristiques des méthodes de détection de routine des métaux lourds [116].

**Tableau 12 : Principales caractéristiques des différentes méthodes spectroscopiques pour le dosage des métaux lourds [116].**

Techniques	Spectrométrie			Fluorescence rayons X (XRF)	Activation Neutronique (INAA)
	optique		masse		
	ICP-OES	GF-AAS	ICP-MS		
Nature de l'échantillon	Liquide/Gaz	Liquide/Gaz	Liquide/Gaz	Solide/Liquide	Solide/Liquide
Sélectivité	Multi-éléments	Mono-élément	Multi-éléments	Multi-éléments	Multi-éléments
Limites de détection (LOD)	1 – 100 ppb	100 ppt - 10 ppb	1 ppt – 1 ppb	ppm	1 ppt – 1 ppb

### 2.5.1.4 Avantages

- ✓ leurs principaux avantages sont leur souplesse, puisqu'elles permettent la détection d'un grand nombre d'éléments, leurs sensibilité et leur limite de détection (LOD) de l'ordre du femto molaire ( $10^{-15}$ );
- ✓ la gamme de travail utile dépasse plusieurs ordres d'amplitude ;

- ✓ la mesure peut être automatisée, ce qui améliore l'exactitude, la précision et le nombre d'échantillons soumis à l'analyse [116].

### 2.5.1.5 Inconvénients

Cependant, les méthodes spectrales présentent certains inconvénients :

- ✓ un matériel onéreux ;
- ✓ l'emploi d'un personnel qualifié pour la réalisation des procédures analytiques complexes,
- ✓ seule la concentration totale en métal peut être déterminée par ces méthodes et l'obtention de données sur la spéciation engendre des étapes de prétraitement et de stockage des échantillons augmentant les risques d'erreur sur la mesure,
- ✓ un certain nombre de phénomènes peuvent également être rencontrés et affecter certaines limites de détection, on leur a donné le nom général de perturbations (ou interférences ou interactions). Les perturbations proviennent de plusieurs origines, on peut les classer en perturbations spectrales, physiques et chimiques. Ces perturbations sont corrigées par l'utilisation de lampe à deutérium, ou par l'application de l'effet Zeeman (interférences spectrales) ou par l'utilisation de tampons spectrométriques, tels que les agents complexant (l'acide éthylène diamine tétracétique et ses sels) ou les agents précipitant comme le lanthane (interférences chimiques).

Les mesures sont souvent effectuées en laboratoire à partir d'échantillons prélevés sur site ; les incertitudes quant au stockage et au transport des prélèvements constituent alors une source d'erreur supplémentaire sur la mesure [116].

## 2.5.2 Les méthodes électrochimiques

Sont des méthodes analytiques sensibles qui permettent de mesurer des concentrations de métaux comprises entre  $10^{-8}$  et  $10^{-11}$  molaires. Elles ne nécessitent généralement pas d'étape de pré concentration des échantillons [119]. Les appareils électrochimiques sont la plupart du temps intuitifs et faciles d'utilisations, peu onéreuses et miniaturisés. Ils s'appuient en outre sur des procédures simples qui ne nécessitent pas l'utilisation conséquente de réactifs [116].

### 2.5.2.1 Méthodes potentiométriques

Le principe est la mesure du potentiel d'une électrode indicatrice sensible à un composé ou ion de la solution étudiée, par rapport à une électrode de référence. C'est la seule méthode

analytique qui permet de mesurer la concentration en métal libre sans affecter l'équilibre de la solution. Son principal avantage réside dans ses limites de détection assez éloignées des concentrations rencontrées dans les eaux naturelles. L'applicabilité de cette méthode est restreinte par le manque de sélectivité de l'électrode [120].

#### 2.5.2.2 Méthodes volt ampérométriques

Le volt ampèremètre englobe le groupe des méthodes électro analytiques dans lesquelles l'information concernant l'analyte est tirée de la mesure du courant en fonction de la tension appliquée dans des conditions qui favorisent la polarisation de l'électrode de travail dite aussi indicatrice. Ce sont des méthodes électroniques fondées sur la mesure d'une courante fonction d'un potentiel appliqué à l'échantillon sous des conditions spécifiques favorisant la polarisation. Elles font partie des méthodes directes qui permettent d'accéder à de faibles concentrations [121].



**PARTIE II :**  
**PARTIE PRATIQUE**

## **Objectifs du travail :**

Le but de ce travail est de permettre au CHU de Tizi-Ouzou, (laboratoire de toxicologie et le laboratoire de biochimie) de faire le diagnostic de la maladie de Wilson (métabolisme du cuivre) en assurant le dosage de la triade : Cu urinaire, Cu sanguin (méthode déjà validée sur SAAF) et la céruloplasmine (ce paramètre sera lancé si les dosages urinaire et sanguin du cuivre seraient disponibles).

Notre pratique sera organisée de la façon suivante :

- Dans un premier temps sera exposé le mode opératoire de l'analyse par spectroscopie d'absorption atomique avec flamme.
- Dans un second temps, sera réalisée une mise au point analytique, assortie de la validation de la technique de dosage cuivre urinaire par spectroscopie d'absorption atomique avec flamme chez un groupe de personnes supposées saines, et d'autres dont le diagnostic est en faveur de la maladie de Wilson ayant été hospitalisés ou suivent leurs consultations au service neurologie de Belloua (CHU de Tizi-Ouzou).

Au vu des circonstances lié à la pandémie du COVID-19, nous avons vu notre travail s'interrompre à l'étape de validation sans lancer d'échantillons.



**CHAPITRE I :  
MATERIELS ET  
METHODE**

## 1. Présentation de l'étude

Le présent travail consiste à mettre au point et à valider une méthode de dosage du cuivre dans les urines par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique flamme (SAAF) en utilisant un procédé de concentration qui nous permet de faire des dosages d'ordre de ppb ( $\mu\text{g/l}$ ) au lieu ppm ( $\text{mg/l}$ ) avec un coefficient de concentration de 10.

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

## 2. Conditions de collecte de pools de la matrice

En règle générale, on préfère le recueil des urines de 24 heures. Elles sont recueillies dans un flacon en polypropylène de deux litres (2L), propres lavés à l'acide.

Le recueil doit porter sur la totalité des mictions des 24 heures car la concentration varie au cours du nyctémère.

A une heure déterminée, par exemple à 8 heures, il faut vider la vessie dans les toilettes et à partir de cet instant, recueillir toutes les mictions dans le flacon destiné à cet effet, jusqu'au lendemain, y compris 8 heures.

Apporter au laboratoire le pool d'urines recueilli. Le volume des urines de 24h est à noter.

Les urines seront acidifiées dans le laboratoire avec une solution d'acide nitrique à 5% jusqu'à obtenir un Ph 5,9. Il est important de conserver les urines entre 2 et 8° C.

Avant toute analyse homogénéiser les urines.

## 3. Matériel

### 3.1 Appareillage

- ❖ **Spectrométrie d'absorption atomique flamme** : de marque **Shimadzu AA-6200**, équipée de :

- ✚ Un compresseur de type JUN-AIRRoHS0038.
- ✚ Une bouteille de gaz acétylène PHYWE SYSTEME GMBH &Co.KG.
- ✚ Un ordinateur HPL1908w muni d'un logiciel d'exploitation : WIZAAR.
- ✚ Une lampe à cathode creuse au cuivre (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.).
  - ❖ Purificateur : (Human Power 1 Scholar)
  - ❖ Agitateur magnétique (IKAMAG RH) ;
  - ❖ Balance (KERN) ;
  - ❖ Centrifugeuse (Hettich EBA 20) ;
  - ❖ Bain marie (Memmert) ;
  - ❖ Vortex (Nahita 681) ;
  - ❖ PH-mètre (HannaH 2211) ;
  - ❖ Séchoir ;



Figure 16 : Spectrométrie d'absorption atomique flamme du laboratoire de Toxicologie.

### 3.2 Verrerie

- ❖ Fioles jaugées (fioles de : 10 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml ,2 L).
- ❖ Bêchers.
- ❖ Tubes secs 5 ml.
- ❖ Grands tubes en verre 14 ml.
- ❖ Erlen Meyer.
- ❖ Eprouvettes graduées.

- ❖ Spatules.
- ❖ Entonnoirs.

### 3.3 Autres

- ❖ Micropipettes réglable (10-100 $\mu$ L) et (100-1000 $\mu$ l).
- ❖ Embouts (bleus et jaunes)
- ❖ Pissettes.
- ❖ Bouchons.
- ❖ Papier filtre. (SUPELCO) de diamètre 75 mm
- ❖ portoirs

### 3.4 Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique reconnue.

- ❖ APDC (Ammonium 1-Pyrrolidinecarbodithionate) (**Fluka AG, Chemische Fabrik, CH-9470 Buchs SG**) (voire annexe IV)
- ❖ Triton X 100 (**BIOCHEM**) (voire annexe V)
- ❖ Phenol (**BIOCHEM**)
- ❖ Méthanol (**SIGMA-ALDRICH**)
- ❖ Ethanol (**SIGMA-ALDRICH**)
- ❖ Acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), glacial (**SIGMA-ALDRICH**,  $d=1,05$ ).
- ❖ Acétate de sodium ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ ) (**SIGMA-ALDRICH**).
- ❖ Acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) supra pur à 65% (**SIGMA-ALDRICH**,  $d=1,4$ ).
- ❖ Eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

### 3.5 Produits

- ❖ Solution de cuivre  $20 \cdot 10^3$  ppm (**Tritisol®, MERCK**).
- ❖ un pool d'urine.

## 4. Méthode analytique

L'objectif de ce travail était d'étendre l'utilisation de la technique de préconcentration par point de trouble à la détermination des concentrations de cuivre dans les échantillons d'urines de l'ordre de ppb ( $\mu\text{g/l}$ ), en utilisant un agent complexant et un surfactant.

#### 4.1 Le procédé de concentration : Extraction par point de trouble (Cloud point extraction CPE)

L'extraction par point de trouble, est une technique d'extraction liquide-liquide qui se base sur la séparation des constituants d'un mélange aqueux par l'emploi d'agents tensioactifs de types non ioniques.

Cette technique permet de concentrer une grande variété d'analytes de natures diverses et à de faibles concentrations même à l'échelle de traces [122].

Plusieurs chélateurs ont été utilisés dans la littérature afin de complexer les faibles concentrations du cuivre dans les liquides biologiques, pour le doser par la SAA flamme. parmi ces chélateurs, on trouve le 2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline (néocuproïne), sélectif au cuivre  $\text{Cu}^{+1}$  [123], le *O,O*-diéthylthiophosphate (DDTP) [124], le 2-[2'-(6-méthyl-benzothiazolylazo)]-4-aminophénol (Me-BTAP) [155], méthyl-2-pyridylketone oxime (MPKO) [125]. Certains de ces chélateurs sont disponibles dans le commerce (ex : néocuproïne), le reste à préparer (Me-BTAP).

L'opération d'extraction repose sur les étapes suivantes (figure 17) :

- 1ère étape : solubilisation d'analytes dans les agrégats micellaires formés ;
- 2ème étape : formation d'un trouble (après chauffage) ;
- 3ème étape : séparation de phases (une phase coacervat dense et riche en TA et une autre phase dite diluée pauvre en TA).

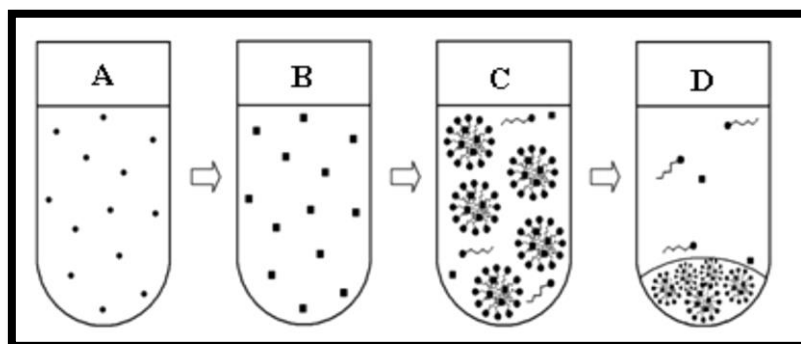


Figure 17: Principe de l'extraction par point de trouble d'un ion métallique [156].

(A): solution métallique ; (B): formation de complexes métalliques après ajout d'agent complexant ; (C): Piégeage des complexes à l'intérieur des micelles ; (D): séparation de phases suite à l'élévation de la température

## 4.2 Dosage par Spectrométrie d'absorption atomique flamme (SAAF)

Après chélation du cuivre et préconcentration. La phase riche en triton X (**voire annexe n° V**) sera introduite dans la SAAF (**voire annexe n° I**).

## 5. Optimisation du procédé

Le protocole suivi est une synthèse de deux protocoles de : R.W.Looyenga et all, Naeemullah et all ; il a été modifié en fonction des réactifs disponibles au niveau de laboratoire.

- ✓ Nous avons utilisé dans notre étude Le Pyrrolidinedithiocarbamate d'ammonium (APDC) comme chélateur (**voir annexe IV**). Il présente une bonne stabilité dans le milieu acide, ainsi la propriété de complexer le cuivre dans ces différents états d'ionisation ( $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), un chélateur non spécifique et non sélectif au cuivre, il peut complexer presque tous les métaux [126,127].
- ✓ Le Triton X-100 a été choisi comme tensioactif non ionique en raison de sa large utilisation comme surfactant [128], ainsi que son faible prix, disponibilité commerciale et toxicité moindre.
- ✓ La température nécessaire pour atteindre le point de trouble du triton X-100 est  $67.3^{\circ}\text{C}$  [129]. Afin d'abaisser Cette température, une solution de phénol à 5% est utilisée. Le phénol décroît la température du point de trouble de la solution micellaire du Triton X-100 et permet une meilleur séparation de phases(en absence du phénol, le point de trouble apparait a des températures supérieures à  $70^{\circ}$ , et pour assurer la séparation des phases, la température devrait atteindre les  $85$  à  $90^{\circ}$ ). L'effet des additifs (organique ou inorganique) sur la température du point de trouble est reporté dans la littérature. [129,130].
- ✓ L'utilisation de l'eau acidifiée à 0.5% pour la préparation des solutions standards dans l'eau pour une meilleure stabilité. De plus l'utilisation d'une solution méthanolique visant à réduire la viscosité de la phase riche en triton X-100 avant d'analyser les échantillons.
- ✓ L'intervalle de pourcentage de triton x 100 (0.1 à 0.2%) a été fixé après plusieurs essais (en fixant tout le reste des paramètres) à des concentrations allant de 0.05 à 1% de triton x, l'absorbance était maximale dans cet intervalle.

## 6. Protocole opératoire

### 6.1 Préparation des solutions de travail

#### 6.1.1 Solution mère

On dispose d'une solution de cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) à  $20 \cdot 10^3$  ppm (mg/L), à partir de laquelle on prépare une nouvelle solution à 100 ppm dans une eau acidifiée à 0.5 %. Cette dernière est considérée comme la solution mère.

Protocole de préparation:

- ❖ dans une fiole de 50 ml;
- ❖ introduire 250 $\mu$ l de la solution de cuivre à 20 000ppm ;
- ❖ ajouter l'eau pure acidifiées (0,5%) jusqu'au trait de jauge (qsp 50ml).

#### 6.1.2 Les solutions filles

➤ Deux gammes d'étalonnage doivent être préparées, une dans l'eau pure acidifiée (0.5%), l'autre dans une matrice d'urines collectées pendant 24 H (acidifiées et garder au frais) pour l'étape de prévalidation et ensuite pour la validation. Ces deux gammes d'étalonnages sont préparées à partir de la même solution mère de **100 ppm**.

On choisit 05 points pour établir les droites d'étalonnage : 20ppb ; 100ppb ; 200ppb ; 300ppb et 500ppb. Cet intervalle prend en considération les valeurs normales et pathologiques de la cuprurie.

**Tableau13: Protocole de préparation des gammes d'étalonnage**

	Blanc	0.02 ppm	0.1ppm	0.2ppm	0.3ppm	0.5ppm
Solution étalon du Cu à 100mg/l ( $\mu$ l)	0	10	50	100	150	250
Eau pure / urine (ml) q.s.p 50ml	50	49.99	49.95	49.9	49.85	49.75

➤ Les solutions filles pour les standards de validation : On choisit trois points comme standards de validation : 50ppb ; 150ppb et 400ppb. Ces solutions sont préparées à partir de la solution mère de cuivre à 100ppm. De la même manière on calcul les volumes à prélever de la solution mère pour la préparation de 50 ml de chaque point

**Tableau14 : Protocole de préparation des standards de validations.**

Volume	0.05ppm	0.15ppm	0.4ppm
Solution étalon de Cu à 100mg/L (µl)	25	75	200
Urine (ml) q.s.p 50ml	49.975	49.925	49.8

## 6.2 Procédure de dosage

### 6.1.1 Etape de préconcentration

Après avoir préparé la verrerie, les solutions standards et les réactifs (**pour la préparation des réactifs voir annexe II**)

(Chaque jour toutes ces solutions sont re préparées (exigence SFSTP), les étapes à suivre sont les suivantes :

- Dans des grands tubes en verre (au nombre des échantillons nécessaire), mettre
  - 10 ml d'échantillon (solutions standards, standards de validation ou échantillons à analyser) ;
  - 2 ml de la solution d'APDC à 0.30% m/v ;
  - 1 ml de la solution tampon.
- Agiter le mélange au vortex pour 30 secondes ;
  - Ajouter 1 ml de la solution de phénol à 5% m/v.
- Dans des Erlen (au nombre des échantillons), peser 0.014 g (on peut aller jusqu'à 0.025 g c'est-à-dire un intervalle de 0.1-0.2 %) de triton X-100 ;
- Verser le tout dans les Erlen contenant le triton X-100 (à 0.1-0.2 %) ;
- Agiter au vortex pendant 1 minute ;
- Mettre dans le bain marie, et agiter ;
- Dès que la mousse commence à disparaître et le trouble apparaît, (1 à 2 min) verser dans des tubes en verre (tubes de 14 ml) ; « cette étape est réalisée par manque de centrifugeuse à grands tubes »
- Fermer les tubes avec du papier transparent (défaut de para film) et laisser les dans le bain-marie pendant 20 minutes à température (70°) ;
- Mettre les tubes dans la centrifugeuse, centrifuger pendant 10 minutes à 4000 tours/minutes ;

- Après centrifugation, mettre les tubes dans un bain de glace pendant 10 – 15 minutes, ceci permet une meilleure séparation des phases (une phase jaune ayant un volume environ 400  $\mu$ l, riche en triton x et le complexe (APDC-Cu) qui est jaune, et une phase aqueuse non troublante (voir figure 18).



**Fig18 : Séparation des phases après le bain de glace**

- Jeter la phase aqueuse avec pipette, il faut récupérer le même volume de la phase riche en triton X-100 ;
- Si la phase riche en triton X-100 se propage, refaire la centrifugation le nombre de fois nécessaire pendant 1 ou 2 minutes ;
- Récupérer la phase riche en triton X-100 avec 600  $\mu$ l de la solution méthanolique à 0.1 % v/v, le volume final (phase riche en triton X-100 + solution méthanolique) ne dépasse pas 1 ml
- Analyse sur SAAF.

### 6.1.2 Mise au point des conditions opératoires et analyse sur SAAF

Avant de procéder à l'analyse des échantillons, les principales étapes à suivre afin de mettre au point les conditions opératoires au niveau de l'appareil d'analyse sont comme suit :

- ❖ Allumer l'appareil
- ❖ Ouvrir la bouteille d'acétylène.
- ❖ Allumer et purger le compresseur d'air.
- ❖ Activer le logiciel WizAArd.
- ❖ Ouvrir ou créer une méthode pour l'élément à doser :
  - Sélectionner l'élément
  - Connecter l'appareil

- Suivre les instructions du logiciel pour vérifier les éléments suivants avant d'allumer la flamme :
  1. Vérifier le reste du gaz combustible et du gaz de support (la bouteille d'acétylène doit être remplacée par une nouvelle si la pression primaire est inférieure à 0,5 MPa).
  2. Vérifier la pression d'alimentation en gaz (pression de gaz requise pendant la combustion : carburant 0.09MPa, support 0.35MPa).
  3. Vérifier que la fente du brûleur n'est pas obstruée (vérifier également l'intérieur de la tête du brûleur).
  4. Insérer fermement la tête du brûleur dans le port de fixation du brûleur
  5. Vérifier que le nébuliseur est fixé à la chambre par la plaque de retenue du nébuliseur.
  6. Vérifier les tuyaux de gaz, le tuyau de vidange et la soupape de sécurité (arrière) sont connectés à la chambre.
  7. Remplir le tube en U avec de l'eau.
  8. Vérifier que l'extrémité du tuyau de vidange dans le récipient de vidange n'est pas dans l'eau.
  9. Vérifier le débit de gaz en appuyant sur le bouton de purge dans les 5 secondes : carburant (FLUEL): 2 à 3 OXYDANT : 8.

Une fois tous ces paramètres vérifiés, on allume la flamme afin de procéder à l'analyse proprement dite.

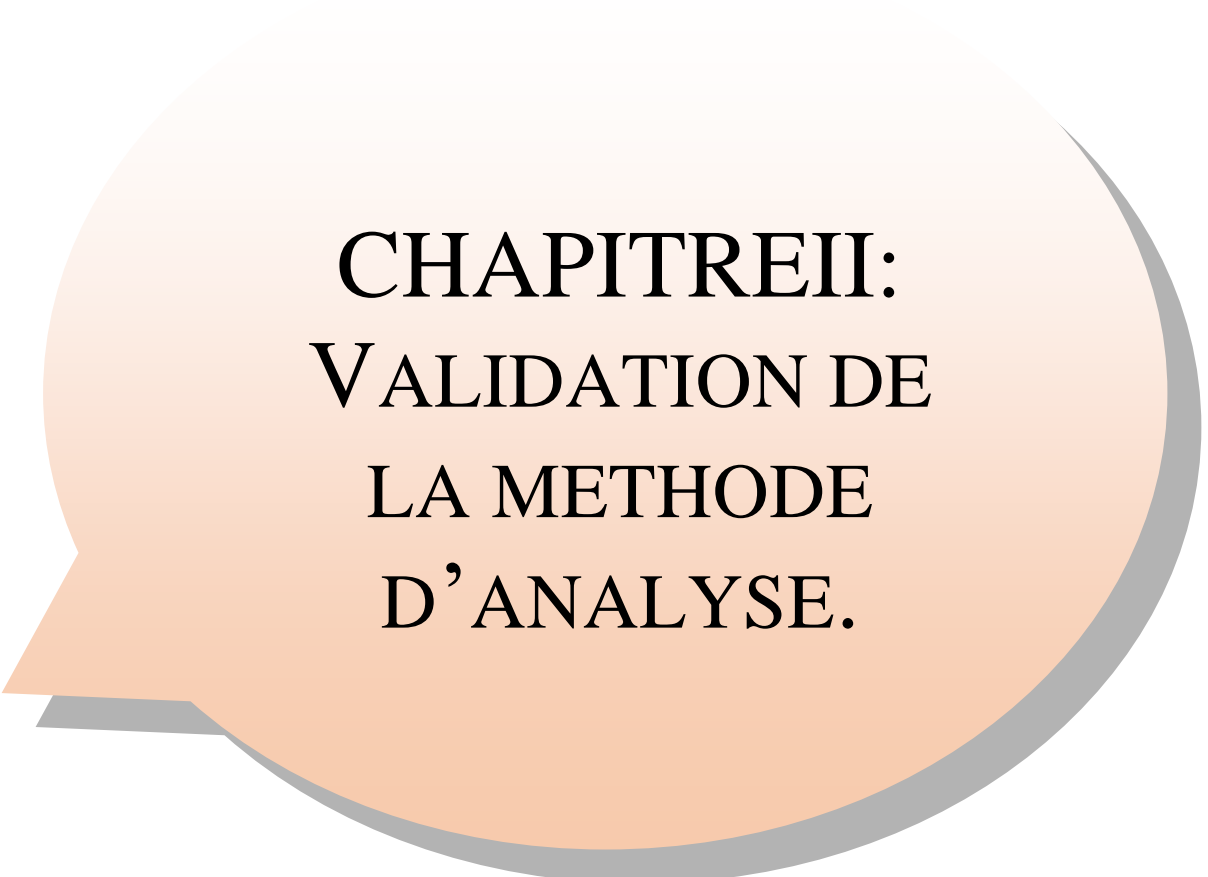
Les échantillons sont analysés selon cet ordre :

- ❖ Le blanc (contenant tous les réactifs sauf le cuivre : dans l'eau et dans les urines)
- ❖ Les solutions standards servant de points de la courbe d'étalonnage (selon leurs concentrations croissantes : 0.02 ppm, 0.1 ppm, 0.2 ppm, 0.3ppm, 0.5 ppm dans l'eau et dans les urines)
- ❖ Les standards de validation après la tracé de la courbe d'étalonnage (selon leurs concentrations croissantes : 0.05ppm, 0.15ppm, 0.4ppm dans les urines)

**Remarque :** il faut rincer après l'analyse de chaque échantillon soit avec de l'eau purifiée ou de l'eau acidifié à 0.5%.

**Tableau 15 : récapitulatif des conditions opératoires à régler.**

<b>Type de lampe</b>	<b>Lampe à cathode creuse (HCL)</b>
<b>Mode de lampe</b>	BGC-D <sub>2</sub>
<b>Longueur d'onde émise par la lampe</b>	Lampe du cuivre : 324.8 nm.
<b>Intensité de la lampe</b>	06 Ma
<b>Largeur de la fente</b>	0.7 nm
<b>Gaz combustible</b>	1.8 L/min
<b>Débit de carburant</b>	2-3 L/min
<b>Débit de l'air</b>	8.0 L/min
<b>Type de flamme</b>	Air-Acétylène(C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> )



**CHAPITRE II:  
VALIDATION DE  
LA METHODE  
D'ANALYSE.**

## 1. Protocole de validation analytique.

### 1.1 Généralités

Le principe de validation des procédures analytiques quantitative est largement répandu dans tous les domaines d'activité où les mesures sont réalisées. Etant donné l'importance des décisions à prendre, les différentes réglementations aux bonnes pratiques (BPL, BPC, BPF et autres) ainsi que les documents normatifs ou réglementaires (ISO, ICH, EMEA, FDA) suggèrent que toutes les procédures de dosage répondent à certains critères d'acceptabilité, donc que ces procédures, soient validées [131].

Selon l'ICH « la validation est l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage bien déterminé » [132].

Selon la norme ISO 17025 (chapitre 4 et 5) « la validation est une exigence technique qui permet l'évaluation des compétences des laboratoires d'étalonnage et d'analyses » [133].

Actuellement, une nouvelle stratégie de validation est mise au point. Elle est basée sur l'établissement du profil d'exactitude, qui est la combinaison sous forme de graphique, de plusieurs intervalle de tolérance calculés à différents niveaux de concentration et d'une limite d'acceptabilité [134].

Dans ce travail, la démarche de validation utilisée est celle du protocole SFSTP 2003-2006 basée sur le profil d'exactitude.

La méthode de validation utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision, a été développée par une commission de la SFSTP (SFSTP 2003 et 2006), pour pallier aux faiblesses des guides de validation précédents.

Le profil d'exactitude permet d'associer les deux éléments fondamentaux de la validation que sont la justesse et la fidélité au résultat final d'une mesure, et par conséquent de tenir compte de l'erreur totale de mesure (erreur systématique + erreur aléatoire).

### 1.2 Critères de validation

Selon les principales exigences de protocole de validation (SFSTP 2003-2006) suivi, les critères de validation sont [133, 135, 136,137] :

### 1.2.1 Fonction de réponse (courbe d'étalonnage) :

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 l'échantillon.

Elle doit être strictement monotone (croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé. La fonction de réponse est de type :

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

Dont  $\varepsilon$  est l'erreur associée à la fonction de réponse  $f$ , appelée communément erreur résiduelle, cette dernière doit être minimisée et pour cela il faut ajuster la fonction de réponse en évaluant les paramètres du modèle.

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode. Le choix dépend du type de méthode, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non).

On distingue les fonctions dites linéaires en leurs paramètres et les fonctions non linéaires.

Le tableau suivant résume les différents types de fonctions de réponses :

**Tableau16 : les différents types de fonctions de réponse [136].**

Type	Équation	Paramètre	linéarité
<b>Droite passant par l'origine</b>	$Y = \beta X$	Pente $\beta$	oui
<b>Droite</b>	$Y = \alpha + \beta X$	Ordonnée à l'origine $\alpha$ Pente $\beta$	oui
<b>Fonction quadratique</b>	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	$\alpha, \beta, \gamma$	oui
<b>Fonction logistique à 4 paramètres</b>	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + (\frac{X}{\gamma})^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	non
<b>Fonction logistique à 5 paramètres</b>	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{[1 + (\frac{X}{\gamma})^\beta]^\psi}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \psi$	non

### 1.2.2 Linéarité (des résultats d'essai)

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration ou à la quantité d'analyte dans l'échantillon.

Rappelons que l'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentration calculée =  $f$  (concentrations introduites)), 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.

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

Il est recommandé donc d'utiliser au minimum cinq niveaux de concentration et d'effectuer au minimum trois séries indépendantes de chacune des 5 concentrations à raison d'une série par jour.

### 1.2.3 Justesse (biais)

La justesse exprime l'étroitesse d'accord entre la valeur trouvée et la valeur acceptée soit comme valeur conventionnellement vraie soit comme valeur de référence.

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue par calcul de la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées.

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

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

Dont :

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

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

### 1.2.4 Fidélité

La fidélité est l'étroitesse d'accord entre une série de mesures obtenues dans des conditions prescrites à partir de prises d'essais multiples provenant d'un même échantillon homogène. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. Elle est exprimée en écart-type ( $\sigma$ ), et en coefficient de variation (CV) :

$$CV = \frac{\sigma}{\hat{\mu}} \times 100$$

Avec :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n-1}}$$

$x_i$  : valeur obtenue sur une série de n mesures d'un échantillon

$m$  : valeur moyenne sur la série de mesure

$n$  : nombre de mesures

Elle peut être évaluée à trois niveaux à savoir :

#### 1.2.4.1 Répétabilité

La répétabilité exprime la fidélité évaluée dans des conditions opératoires identiques (même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps).

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité.

#### 1.2.4.2 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire exprime la variabilité intra-laboratoire : jours différents, analystes différents, équipements différents, etc....

La somme des estimations des variances intra- et inter série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire

### 1.2.4.3 Reproductibilité

La reproductibilité exprime la variabilité inter laboratoires (études collaboratives) habituellement appliquées à la standardisation de la méthodologie.

### 1.2.5 Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie », à savoir pour chaque mesure :

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

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

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

L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat.

Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

### 1.2.6 La limite de détection (LD) et de quantification (LQ)

#### 1.2.6.1 Limite de détection

La limite de détection d'une méthode d'analyse est la plus petite quantité d'analyte qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

$$\text{La limite de détection : } LD = 3.\sigma/S$$

Avec  $\sigma$  : Écart type       $S$  : pente

#### 1.2.6.2 Limite de quantification

Quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude appropriée.

$$\text{La limite de quantification : } LQ = 10.\sigma/S$$

### 1.2.7 Sensibilité

Une procédure est dite « sensible » si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse.

### 1.2.8 Spécificité

Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon. Autrement dit, la spécificité est bien la capacité d'une procédure d'analyse de faire la discrimination analyte /substances interférentes [146].

### 1.2.9 Robustesse

Capacité du protocole de rester non affectée par des variations faibles mais délibérément introduites dans les paramètres de la méthode ; fournit une indication sur sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation.

### 1.2.10 Intervalle de dosage

Intervalle compris entre la concentration (quantité) la plus élevée et la plus faible de l'échantillon dans lequel il a été démontré que la méthode d'analyse présente une fidélité, une exactitude et une linéarité satisfaisante.

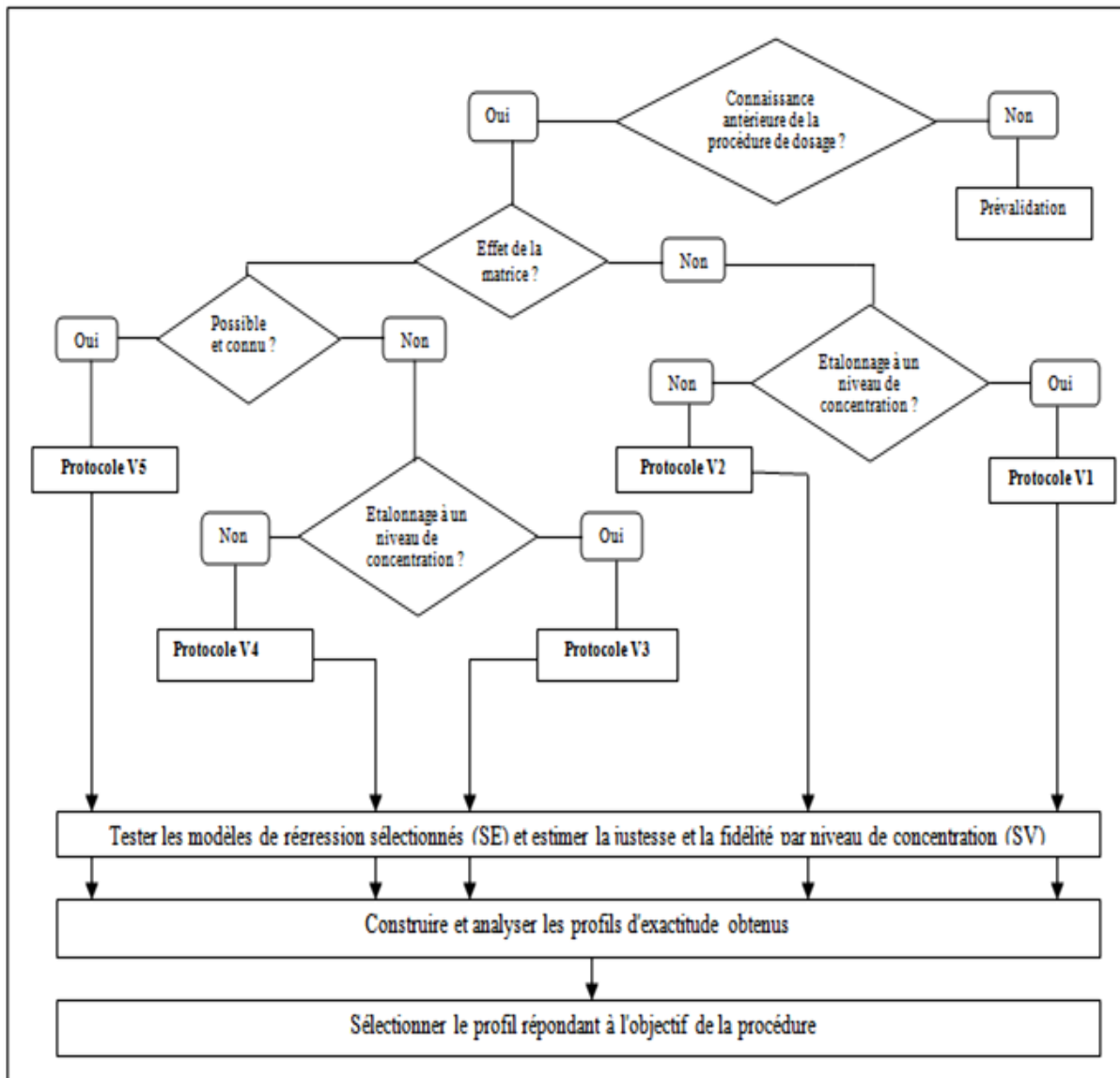
## 1.3 Choix de procédure de validation

Avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

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

- ❖ démontrer la spécificité (sélectivité),
- ❖ valider la fonction de réponse (ou modèle d'étalonnage utilisé en routine),
- ❖ estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire),
- ❖ estimer la justesse,
- ❖ estimer l'exactitude,
- ❖ valider les seuils de quantification,
- ❖ valider l'intervalle de dosage,
- ❖ vérifier la linéarité de la procédure analytique.

La figure 19 présente les démarches proposées dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve [131].



**Figure 19 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation (SFSTP2006) SE : standard d'étalonnage. SV : standard de validation.**

Une phase de prévalidation est conseillée s'il y a absence d'informations pertinentes obtenues lors du développement ou d'une connaissance particulière de l'analyste sur les performances de la procédure. En revanche, si ces informations sont disponibles, il est tout d'abord recommandé de s'interroger sur la présence ou l'absence d'un effet de la matrice.

Selon cet effet de matrice, le protocole sera choisi (voir tableau 16)

**Tableau 17: Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. (SFSTP 2006).**

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

#### 1.4 Validation analytique par le profil d'exactitude

Le « profil d'exactitude » est un outil graphique qui emploie une approche statistique basée sur le calcul d'un intervalle statistique de dispersion et permet de statuer sur la validation de la performance de la méthode.

L'approche de l'erreur totale ou du profil d'exactitude est une stratégie de validation permettant d'associer la justesse et la fidélité au résultat final d'une mesure [138].

Son principe peut se traduire par une équation indiquant que la différence entre une mesure ( $x$ ) et sa vraie valeur ( $\mu$ ) doit être inférieure à la limite d'acceptation ( $\lambda$ ) définie a priori.

$$-\lambda < x - \mu < \lambda \Leftrightarrow |x - \mu| < \lambda$$

C'est-à-dire qu'au terme de la validation de la procédure par profil d'exactitude, les futures mesures fournies seront comprises dans les limites d'acceptation fixées en fonction des contraintes du secteur d'activité (exemple : 1 ou 2% sur des matières premières, 5% sur des spécialités pharmaceutiques, 15% en bio analyse, environnement, etc.) [139].

### 1.5 Construction du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est construit à partir des estimations de l'intervalle de tolérance d'espérance  $\beta$  (contenant une proportion  $\beta$  % de futurs résultats) à chaque niveau de concentration calculé (les calculs étant effectués séparément pour chaque niveau de concentration  $k$ , permettant d'obtenir  $k$  écart-types de fidélité puis  $k$  intervalles de tolérance)

Le profil d'exactitude peut être construit de différentes façons, en fonction du type de données traité. Cependant la méthode la plus classique, lorsqu'on a à faire à des concentrations relatives, est celle exprimées de façon relative, par un taux de recouvrement. La figure ci-dessous illustre un exemple de profil d'exactitude construit avec trois niveaux de concentration, qui délimitent le domaine de validation de la méthode à valider.

Les éléments graphiques entrant dans le profil d'exactitude sont les suivants :

- Sur l'axe horizontal, la concentration théorique de chaque niveau (soit les valeurs de référence moyennes)
- Sur l'axe vertical :
  - Les limites de tolérance relatives haute et basse ;
  - Les taux de recouvrement moyens ;
  - Les limites d'acceptabilité hautes et basses relatives.

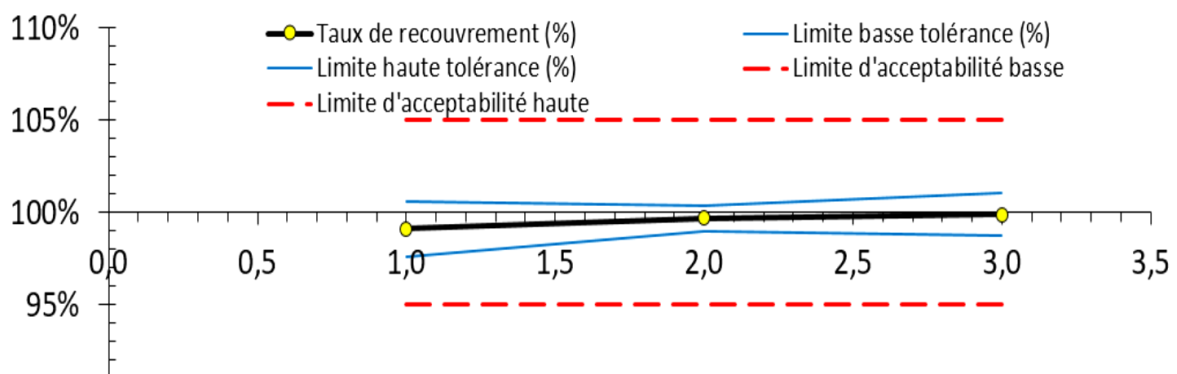


Figure 20: profil d'exactitude exprimé par le taux de recouvrement [140].

Après avoir fixé les deux critères de décision suivant :

- ✓ Les limites d'acceptabilité ( $\pm\lambda$ ): délimitant un intervalle autour de la valeur de référence, elles sont le plus souvent réglementaires
- ✓ La proportion ( $\beta$ ) : représentant la proportion de futurs résultats en moyenne compris dans les limites d'acceptation, dans cet exemple, elle est fixée à 80% au moins

Quand les limites de tolérance sont comprises entre les limites d'acceptabilité dans un domaine de validité : la méthode est dite validée dans ce domaine [140].



## CHAPITRE III : RESULTATS

## 1. La recherche d'un éventuel effet matrice (étape de prévalidation)

### 1.1 Plan d'expériences

On prépare chaque jour, Pendant 03 jours, deux gammes d'étalonnage :

- une dans l'eau pure acidifiée (0,5%) ;
- l'autre dans un pool d'urine de 24h.

Les résultats obtenus après analyses sont les suivants :

➤ Jour1 :

**Tableau 18 : résultats des gammes d'étalonnage du J1**

Concentrations (ppm)	Absorbances	
	eau	Urine
0,02	0,007	0,006
0,1	0,0199	0,036
0,2	0,0505	0,0797
0,3	0,0732	0,11
0,5	0,1102	0,171

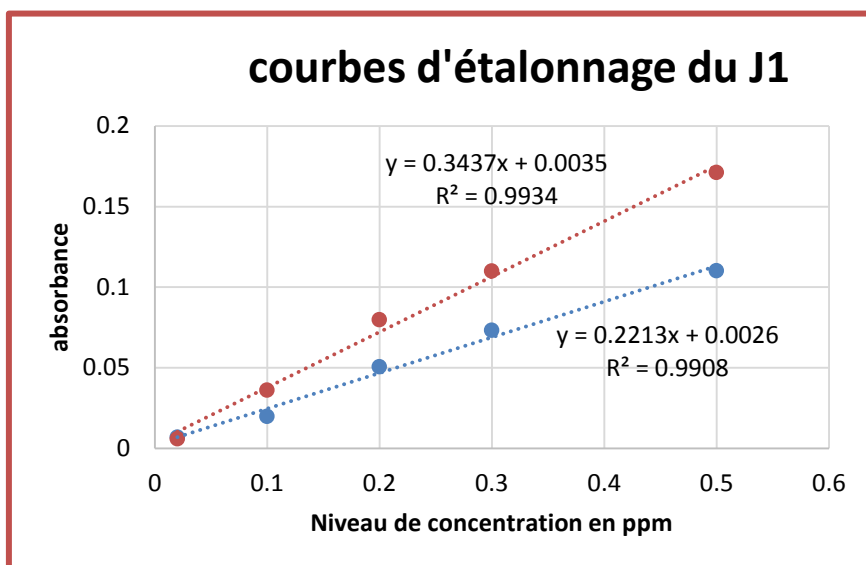


Figure 21 : Les courbes d'étalonnage du premier jour

➤ Jour 2 :

Tableau 19 : résultats des gammes d'étalonnage du J2

Concentration (ppm)	Absorbances	
	eau	urine
0,02	0,019	0,01
0,1	0,0324	0,0525
0,2	0,07	0,1073
0,3	0,1017	0,1463
0,5	0,1622	0,245

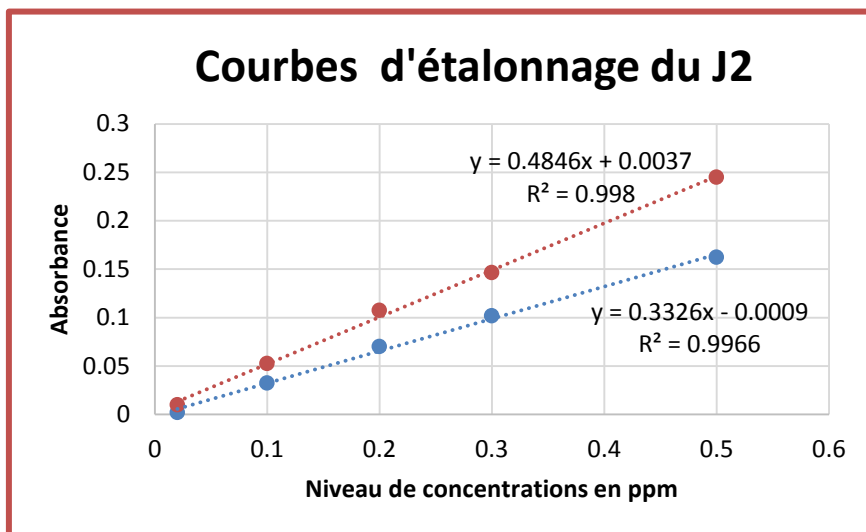


Figure 22 : Les courbes d'étalonnage du deuxième jour

➤ Jour 3

Tableau 20 : Résultats des gammes d'étalonnage du J3

Concentrations (ppm)	Absorbances	
	eau	urine
0,02	0,0061	0,0139
0,1	0,02	0,0463
0,2	0,0413	0,0968
0,3	0,08	0,1633
0,5	0,15	0,2831

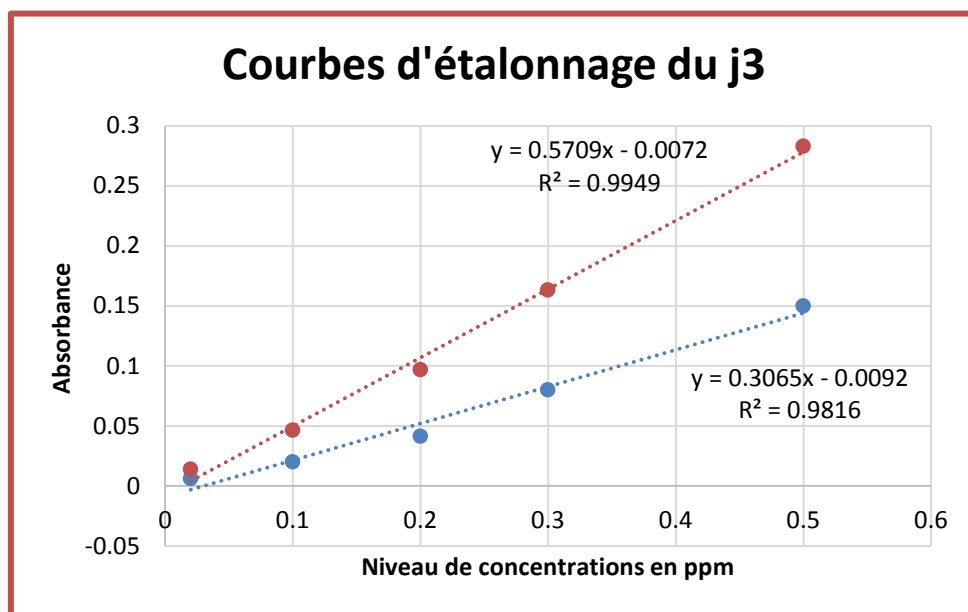


Figure 23: Les courbes d'étalonnage du troisième jour

✓ Calcul des moyennes des 03 jours

Tableau21: les moyennes des résultats des trois jours

Concentrations (ppm)	Absorbances	
	Moyennes eau	Moyennes urine
0,02	0,005	0,0099
0,1	0,0241	0,04493
0,2	0,0539	0,0946
0,3	0,0849	0,1398
0,5	0,1408	0,233

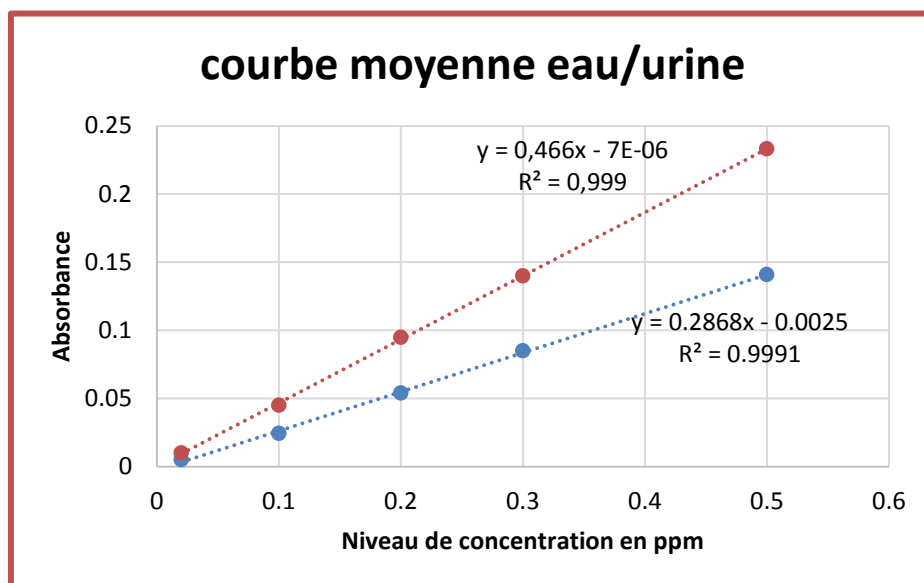


Figure 24 : La courbe des résultats obtenus durant les trois jours.

Tableau 22 : valeurs de la pente et des ordonnées à l'origine obtenu par les courbes moyenne.

Courbes d'étalonnage	Eau	Urine
moyenne		
la pente (a)	0,286	0,466
Ordonnés à l'origine (b)	-0.0025	-7E -06

❖ Réalisation d'un test de Student pour la recherche d'erreur systématique et d'un éventuel effet matrice :

Les tableaux ci-dessous, résument les caractéristiques des droites D1 (eau) et D2 (matrice), pour la recherche d'un éventuel effet matrice, dont:

$S^2_{a1}$  : variance de la pente  $a_1$  de la droite D1

$S^2_{a2}$  : variance de la pente  $a_2$  de la droite D2

$S^2_{b1}$  : variance des ordonnées à l'origine de la droite D1

$S^2_{b2}$  : variance des ordonnées à l'origine de la droite D2

$S^2_R$  : variance totale

$X_{ij}$  : quantité introduite

$Y_{ij}$  : absorbance

5% : erreur permise = 0,05 (5%)

n : Nombre de manipulation (=30)

( $\alpha$ ): Risque

**Tableau23 : Comparaison des ordonnées à l'origine b1 et b2**

comparaison des ordonnées à l'origine b1 et b2		test (t) de student
$\bar{x}''$	$\sum x_{ij} / n$	100
$(S_{a1})^2$	$(SR1)^2 \cdot (1/n + (\bar{x}'')^2 / \sum (x_{ij} - \bar{x}'')^2)$	0,00003588
$(S_{a2})^2$	$(SR2)^2 \cdot (1/n + (\bar{x}'')^2 / \sum (x_{ij} - \bar{x}'')^2)$	0,00012275
$(S_{a1})^2 + (S_{a2})^2$	$(S_{a1})^2 + (S_{a2})^2$	0,00015863
t calculé	$ a_1 - a_2  / \sqrt{(S_{a1})^2 + (S_{a2})^2}$	0,19786097
t calculé	0,19786097	< t table ( $\alpha = 5\%$ , n-4 = 26) = 2,05
		VRAI

❖ *Comparaison de l'ordonnées à l'origine b1 et b2 :*

Le t calculé est comparé à la valeur seuil au risque  $\alpha$  de la loi de Student (**voire annexe III**) à un n-4 degré de liberté (ddl) .

Le t calculé < t table (0.05, 26) donc les deux ordonnées à l'origine b1 et **b2 sont pas significativement différentes, cela implique l'absence d'erreurs systématiques.**

Tableau 24: Comparaison des pentes a1 et a2

comparaison des pentes à l'origine a1 et a2		test (t) de student	
(SR1) <sup>2</sup>	$(\sum(y_{ij} - y'')^2 - (b1)^2 \cdot \sum(x_{ij} - x'')^2) / (n-2)$	0,00019237	
(Sb1) <sup>2</sup>	$(SR1)^2 / \sum(x_{ij} - x'')^2$	0,0004596	
(SR2) <sup>2</sup>	$(\sum(y_{ij} - y'')^2 - (b1)^2 \cdot \sum(x_{ij} - x'')^2) / (n-2)$	0,00065801	
(Sb2) <sup>2</sup>	$(SR2)^2 / \sum(x_{ij} - x'')^2$	0,00157207	
(Sb1) <sup>2</sup> +(Sb2) <sup>2</sup>	$(Sb1)^2+(Sb2)^2$	0,00203167	
t calculé	$ b1 - b2  / \sqrt{(Sb1)^2+(Sb2)^2}$	3,98431224	
t calculé =	3,98431224	< t table ( $\alpha = 5\%$ , n-4 = 26) = 2,05	<b>Faux</b>

❖ *Comparaison des pentes a<sub>1</sub> et a<sub>2</sub> :*

Le t calculé > t table (0.05, 26) (**voir annexe III**) ce qui implique que les deux pentes ne sont pas comparables, donc les deux courbes *ne sont pas superposables, présence d'un éventuel effet matrice*.

## 1.2 Conclusion

La comparaison des pentes des deux courbes par le test de Student, montre une existence d'un effet matrice. De ce fait, la validation de notre technique va suivre le protocole V5 du protocole de validation SFSTP 2003-2006.

## 2. Validation de la méthode d'analyse

### 2.1 Fonctions de réponse

Un protocole V5 de la nouvelle approche SFSTP 2003-2006 a été retenu du fait de l'existence de l'effet matrice.

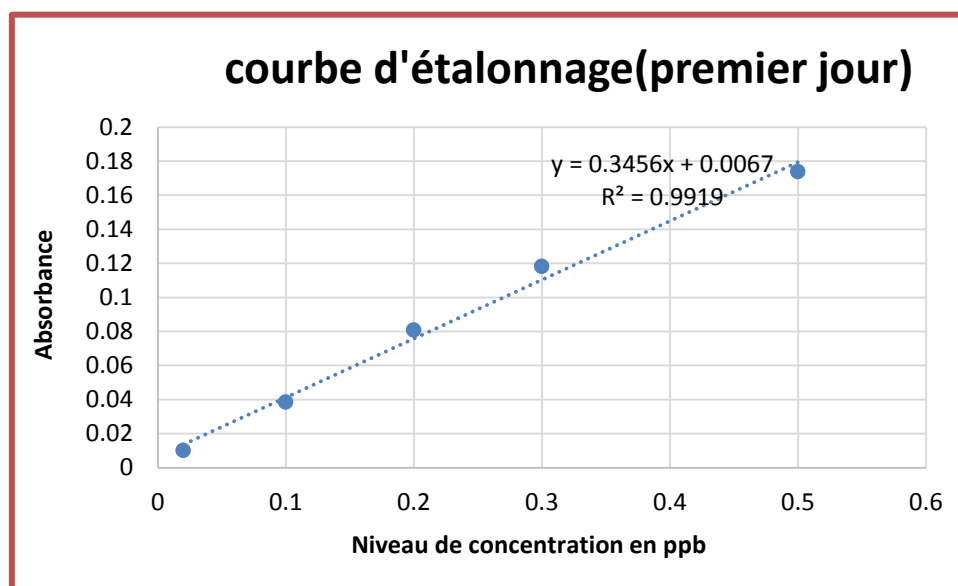
Pour la gamme d'étalonnage, on prépare chaque jours, pendant 03 jours, une gamme d'étalonnage dans un pool d'urine de 24h, nous avons utilisés cinq niveaux de concentrations pour établir les droites d'étalonnage : 0.0.2ppm ; 0.1ppm ; 0.2ppm; 0.3ppm et 0.5ppm.

Pour le standard de validation nous avons choisis trois niveaux 0.050ppm, 0.150ppm et 0.4 ppm avec trois répétitions sur trois jours.

➤ Jour 1 :

Tableau25 : Gamme d'étalonnage de la solution du cuivre dans la matrice (1<sup>er</sup> jour)

Concentration théorique (ppm)	Absorbance
0,02	0,0099
0,1	0,0384
0,2	0,0806
0,3	0,118
0,5	0,1738

Figure 25: courbe d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (1<sup>er</sup> jour)

**Tableau26 : Résultats de la gamme de standard de validation**

Concentrations en ppm	Répétitions	Absorbances	Concentrations calculées (ppm)
0,05	R1	0,0242	0,05063657
	R2	0,0234	0,04832176
	R3	0,026	0,05584491
0,15	R1	0,0517	0,13020833
	R2	0,055	0,13975694
	R3	0,052	0,13107639
0,4	R1	0,16	0,44357639
	R2	0,15	0,4146412
	R3	0,156	0,43200231

➤ Jour 2 :

**Tableau27 : Gamme d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (2<sup>ème</sup> jour)**

Concentration en ppm	Absorbance
0,02	0,006
0,1	0,036
0,2	0,0691
0,3	0,1035
0,5	0,17

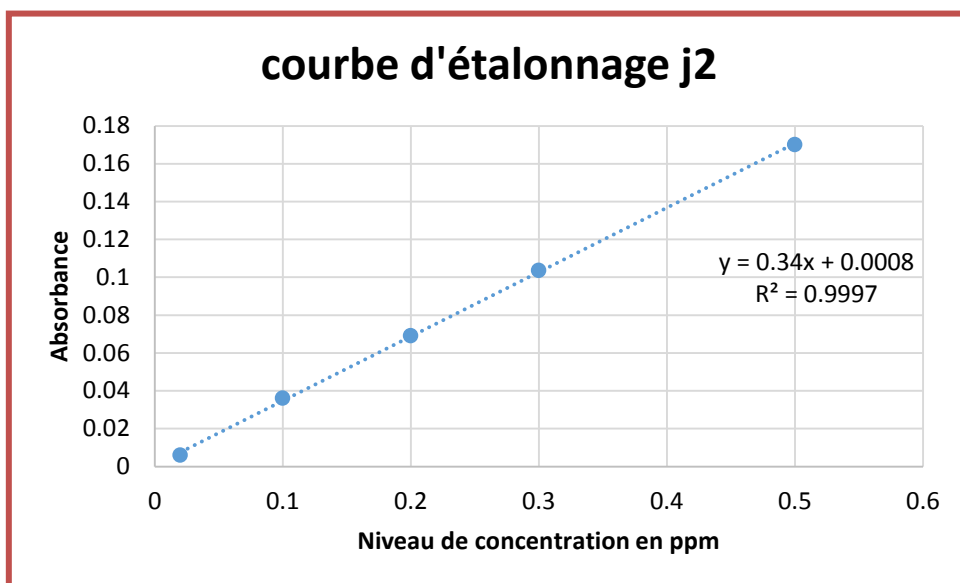


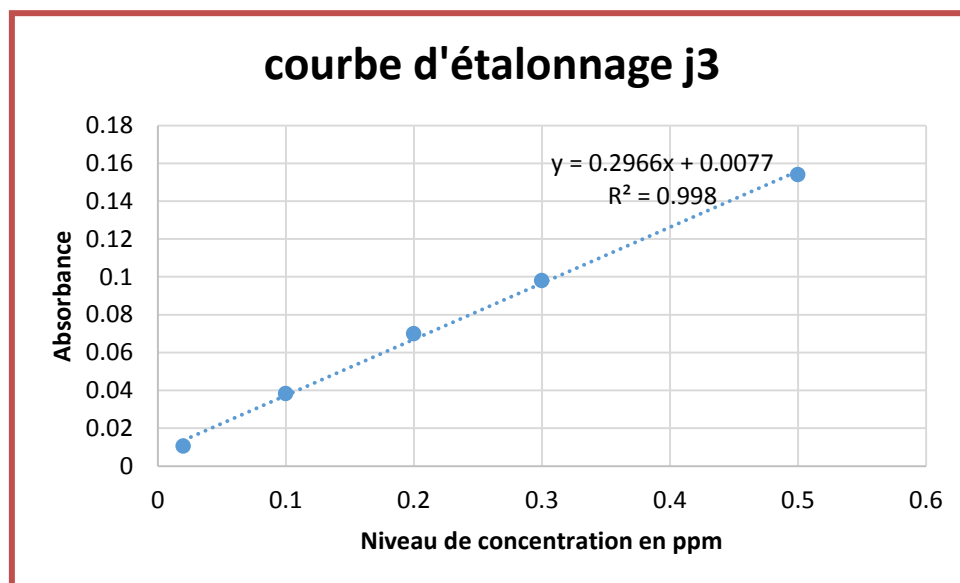
Figure 26 : courbe d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (2<sup>em</sup> jour)

Tableau 28: Résultats de la gamme de standard de validation (2<sup>em</sup> jour)

Concentrations en ppm	Répétitions	Absorbances	Concentrations calculées (ppm)
<b>0,05</b>	<b>R1</b>	0,015	0,041764706
	<b>R2</b>	0,017	0,047647059
	<b>R3</b>	0,018	0,050588235
<b>0,15</b>	<b>R1</b>	0,0467	0,135
	<b>R2</b>	0,0476	0,137647059
	<b>R3</b>	0,048	0,138823529
<b>0,4</b>	<b>R1</b>	0,1214	0,354705882
	<b>R2</b>	0,12	0,350588235
	<b>R3</b>	0,1205	0,352058824

➤ Jour 3 :Tableau29: Gamme d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (3<sup>em</sup> jour)

Concentrations théorique	Absorbance
0,02	0,0105
0,1	0,0383
0,2	0,0698
0,3	0,098
0,5	0,154

Figure 27: courbe d'étalonnage de la solution de cuivre dans la matrice (3<sup>em</sup> jour)

**Tableau 30 : Résultat de la gamme de standard de validation 3<sup>em</sup> jour.**

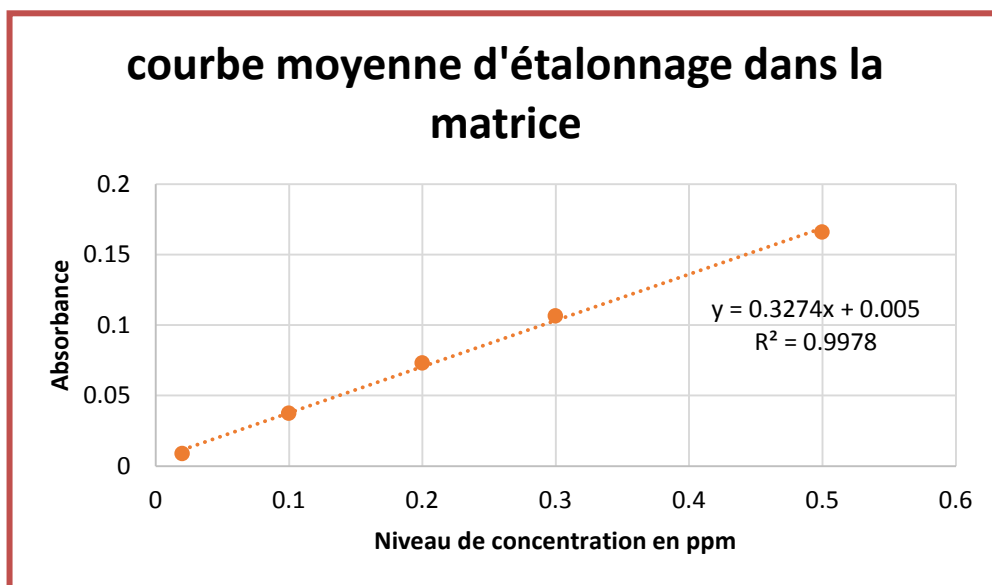
Concentrations en ppm	Répétitions	Absorbances	Concentrations calculées (ppm)
<b>0,05</b>	<b>R1</b>	0,02	0,041469993
	<b>R2</b>	0,025	0,058327714
	<b>R3</b>	0,021	0,044841537
<b>0,15</b>	<b>R1</b>	0,0477	0,134861767
	<b>R2</b>	0,0491	0,139581929
	<b>R3</b>	0,0549	0,59238031
<b>0,4</b>	<b>R1</b>	0,1425	0,454484154
	<b>R2</b>	0,1363	0,43358058
	<b>R3</b>	0,1309	0,415374241

➤ Courbe d'étalonnage moyenne :

On établit une courbe moyenne des trois jours à partir des valeurs d'absorbance relatives à chacune des concentrations (0.02 ppm, 0.1ppm ,0.2ppm, 0.3ppm et 0 .5ppm)

**Tableau31 : Absorbances moyennes obtenus pendant les trois jours de validation.**

Concentration (ppm)	Moyenne des absorbances
<b>0,02</b>	0,0088
<b>0,1</b>	0,0375
<b>0,2</b>	0,0731
<b>0,3</b>	0,1065
<b>0,5</b>	0,1659



**Figure 28 : Courbe d'étalonnage moyenne des trois jours**

## 2.2 Calcul de la limite de détection et de quantification

### ➤ Limite de détection (LD) :

On utilise la méthode d'exploitation de valeurs chiffrées :

- Effectuer à mesures de blancs d'analyse indépendamment  $n \geq 6$
- Calculer l'écart type

$$LD = 3.\sigma/S$$

Avec  $\sigma$  : Écart type

$S$  : pente

### ➤ Limite de quantification (LQ) :

.Les procédures sont les mêmes que celles de la limite de détection.

Elle est estimée par :

$$LQ = 10.\sigma/S$$

## Résultats :

Le tableau suivant regroupe les absorbances d'une série de six(6) blancs d'analyse.

**Tableau 32: Absorbances d'une série de six blancs d'analyse.**

N °Blanc	Absorbances
1	0,0003
2	0,0012
3	0,0013
4	0,0006
5	0,0018
6	0,0007
<b>Ecart type <math>\sigma</math></b>	<b>0,00054924</b>

- **Calcule de la limite de détection :**

$$LD = 3 \cdot \sigma / a$$

Avec:  $a = 0,3274$



$$LD = 3 \times 0,00054924 / 3274$$

$$LD = 0,00503276 \text{ ppm (5 ppb)}$$

- **Calcule de la limite de quantification :**

$$LQ = 10 \cdot \sigma / a$$



$$LQ = 10 \times 0,00054924 / 3274$$

$$LQ = 0,01677587 \text{ ppm (16ppb)}$$

- ✓ **Interprétation** : Dans notre pratique:
- ❖ **0,00503276ppm** : est la plus petite concentration du cuivre à doser pouvant être détectée mais non quantifiée comme valeur exacte.
  - ❖ **0,01677587 ppm** : est la plus petite concentration de cuivre pouvant être dosée dans les urines avec une fidélité et une exactitude suffisante.

### 2.3 Mesure de la justesse

On effectue trois séries de standards de validation distribués sur trois jours en parallèle avec les solutions étalons, neuf mesures au total sont effectuées pour chaque niveau de concentration  $k$  à raison de trois répétitions par jour, la moyenne des concentrations calculées a été retenue pour chaque niveau  $k$  (voir **tableau33**), dont :

- $k1 = 0.05$  ppm ;
- $k2 = 0.15$  ppm ;
- $k3 = 0.4$  ppm.

**Tableau33 : concentrations calculées des standards de validation**

Série	Niveau de Concentration $k$ (ppm)	R1	R2	R3	Moyenne / J	Moyenne / N
J1	0.05	0,0506	0,0483	0,0558	0,0516	0,0488
J2		0,0417	0,0476	0,0506	0,0466	
J3		0,0414	0,0583	0,0448	0,0482	
J1	0.15	0,1302	0,1398	0,1310	0,1337	0,1439
J2		0,1350	0,1376	0,1880	0,1535	
J3		0,1348	0,1395	0,1592	0,1445	
J1	0.4	0,4435	0,4146	0,4320	0,4300	0,4056
J2		0,3547	0,3506	0,3521	0,3524	
J3		0,4335	0,4153	0,4544	0,4344	

La **justesse** de la méthode peut s'exprimer en termes de :

- Biais absolu ;

$$\mathbf{Biais} = \mu_{jk} - \chi_k$$

- Biais relatif ;

$$\mathbf{Biais}(\%) = 100 \times \frac{\mu_{jk} - \chi_k}{\chi_k}$$

- Le recouvrement.

$$\mathbf{Recouvrement}(\%) = 100 \times \frac{\mu_{jk}}{\chi_k}$$

Avec

$\chi_k$ : la concentration théorique de chaque niveau de concentration  $k$

$\mu_{jk}$ : moyenne des concentrations retrouvées de chaque niveau de concentration  $k$  par jour  $j$

La justesse a été estimée au moyen des standards de validation dans la matrice (urines) à trois niveaux de concentration (0.05 ppm, 0.15 ppm, 0.4 ppm).

Les résultats de la justesse (biais absolu et relatif ainsi que les taux de recouvrement) sont regroupés dans le **tableau 34**

**Tableau34: Résultats de la justesse des standards de validations.**

Concentrations théoriques (ppm)	Concentrations retrouvées (ppm)	Biais absolu	Biais Relatif%	Recouvrement%
<b>0.05</b>	0,0516	0,0016	3,1333	103,1333
	0,0466	-0,0034	-6,7467	93,2533
	0,0482	-0,0018	-3,6667	96,3333
<b>0.15</b>	0,1337	-0,0164	-10,9000	89,1000
	0,1535	0,0035	2.3556	102,3556
	0,1445	-0,0055	-3.6667	96,3333
<b>0.4</b>	0,4300	0,0300	7,5083	107,5083
	0,3524	-0,0476	-11,8892	88,1108
	0,4344	0,0344	8,6000	108,6000
<b>Moyenne</b>			<b>-1.6969</b>	<b>98,3031</b>
<b>Ecart type</b>			<b>7.5196</b>	<b>7,5196</b>

Le tableau suivant récapitule les valeurs de la justesse (biais absolu, relatif et taux de recouvrement) par niveau de concentration .

**Tableau 35: récapitulatif des résultats de la justesse par niveau.**

concentration théorique (ppm)	Moyenne des concentrations retrouvées (ppm)	Biais absolu ppm	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)
50	48,79	-0,0012	-2,4267	97,5733
150	143,89	-0,0061	-4,0704	95,9296
400	405,63	0,0056	1,4064	101,4064

**Interprétation :**

Les taux des recouvrements (sa valeur cible est 100%) des trois standards de validation varient entre 88,11 % et 108,6 %. Donc ils sont inclus dans la limite d'acceptabilité [80% – 120%],

Leurs biais relatif moyen (sa valeur cible est zéro) est égal à : -1.6969 %, ce qui est largement acceptable (inclus dans les limites d'acceptabilités ( $\pm 20\%$ )).

Après calculs du recouvrement et du biais, nous pouvons conclure que la technique est juste

## 2.4 Mesure de la fidélité

Le traitement statistique des données consiste à utiliser une méthode appelée analyse de la variance à un facteur (dans notre cas c'est le jour) qui permet de décomposer la variance totale de toutes les mesures c'est-à-dire toutes séries confondues (variance de fidélité intermédiaire) en une variance intra-série et une variance inter-série.

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra- et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire. La fidélité est mesurée à partir des écart-types (ou variances) des résultats d'essais pour un ou plusieurs niveaux de concentration, ceci permet de calculer le coefficient de variation, donné par :

$$CV = \frac{\text{Ecart type}}{\text{Moyenne}} \times 100$$

Pour les trois niveaux de concentration 0,05ppm, 0.15 ppm et 0.4ppm, des analyses sont effectuées à raison de trois fois pour chaque série (J1, J2, J3). Les absorbances obtenues nous ont servi pour le calcul du coefficient de variation (CV) :

- CV intragroupe : à partir des absorbances du même jour
- CV intergroupe : à partir des absorbances des trois jours.

Les valeurs obtenues sont rapportées dans le **Tableau 36** :

Tableau 36: mesure des coefficients de variation intra et inter groupe

Paramètres		Concentration			Moyenne de CV
		0.05 ppm	0.15 ppm	0.4 ppm	
<b>Intragroupe</b>					
<b>J1</b>	Ecart type	0,0038	0,0053	0,0146	<b>4,9329</b>
	Moyenne	0,0516	0,1337	0,4300	
	<b>CV %</b>	<b>7,4511</b>	<b>3,9640</b>	<b>3,3835</b>	
<b>J2</b>	Ecart type	0,0045	0,0299	0,0021	<b>9,9149</b>
	Moyenne	0,0466	0,1535	0,3524	
	<b>CV %</b>	<b>9,6925</b>	<b>19,4598</b>	<b>0,5924</b>	
<b>J3</b>	Ecart type	0,0089	0,0129	0,0196	<b>10,6737</b>
	Moyenne	0,0482	0,1445	0,4344	
	<b>CV %</b>	<b>18,5582</b>	<b>8,9589</b>	<b>4,5040</b>	
<b>Moyenne de CV %</b>		<b>11,9006</b>	<b>10,7942</b>	<b>2,8266</b>	<b>8,5072</b>
<b>Inter groupe</b>					
	Ecart type	0,0025	0,0100	0,0461	<b>7,8224</b>
	Moyenne	0,0488	0,1439	0,4056	
	<b>CV</b>	<b>5,1811</b>	<b>6,9186</b>	<b>11,3674</b>	

Les coefficients de variation varient entre **0,5924%** et **19,4598%** selon le jour et les concentrations.

Le coefficient de répétabilité est de 8,5072 %, et le coefficient de la fidélité intermédiaire est de 7,8224%, ce qui est conforme aux limites fixées (<20%).

Les résultats de la fidélité intermédiaire et de la répétabilité par niveau de concentration sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau37 : Résultats de la Fidélité par niveau.

Concentration Théorique (ppm)	concentrations moyennes retrouvés (ppm)	Ecart-type de répétabilité (sr)	Ecart-type inter-série (sB)	Ecart-type de fidélité (sFI)	coefficient de variation de répétabilité %	coefficient de variation de fidélité %
0.05	0,0488	0,0062	0,0000	0,0062	11,9006	5,1811
0.15	0,1439	0,0190	0,0000	0,0190	10,7942	6,9186
0.4	0,4056	0,0141	0,0454	0,0475	2,8266	11,3674
<b>Moyenne</b>					8.5071	7.8223

Nos coefficients de variation par niveau de concentration sont inclus dans les limites d'acceptabilité ( $\pm 20\%$ )

Le coefficient de répétabilité (=8.5071 %) et le coefficient de fidélité intermédiaire (=7.8223%) sont conformes aux limites fixés (<20%).

## 2.5 Etablissement du profil d'exactitude

- **Calcul de l'intervalle de tolérance :**

Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance sont calculées pour les trois niveaux des standards de validation selon la formule suivante :

$$\left[ \text{Biais}\% - Q_t \times s_{IT}, \text{Biais}\% + Q_t \times s_{IT} \right] \quad \text{Intervalle de tolérance}$$

Avec:

$$s_{IT} = s_{FI} \times \sqrt{1 + \frac{1}{IJ \times B^2}} \quad \text{Ecart-type de l'IT}$$

$$Q_t = t_{\nu, \frac{1+\beta}{2}} \quad \text{Facteur de couverture de l'IT}$$

Le tableau suivant regroupe les facteurs de couverture de l'intervalle de tolérance.

**Tableau 38: Facteurs de couverture de l'intervalle de tolérance**

C° Théorique (ppm)	Rapport des variances (R)	Coefficient B <sup>2</sup>	Nombre de degrés liberté	Probabilité de tolérance (bêta) %	T Student -t bas	T Student haut	Facteur de couverture (kIT)	Ecart-type de tolérance (sIT)
0.05	0	1	7,7143	70	1,1192	1,1081	1,1113	1,1113
0.15	0	1	7,7143	70	1,1192	1,1081	0,0065	0,0201
0.4	10,3168	0,3542	2,2553	70	1,3862	1,2498	1,3514	0,0545

Les résultats des limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance des concentrations : 0.05 ; 0.15 et 0.4ppm sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau 39 : limites de tolérance basses et hautes pour les standards de validation**

Concentration Théorique (ppm)	Moyenne des concentrations Retrouvées (ppm)	Limite de tolérance basse (ppm)	Limite de tolérance haute (ppm)
0.05	0.0488	0,0415	0,0560
0.15	0.1439	0,1216	0,1662
0.4	0.4056	0,3320	0,4792

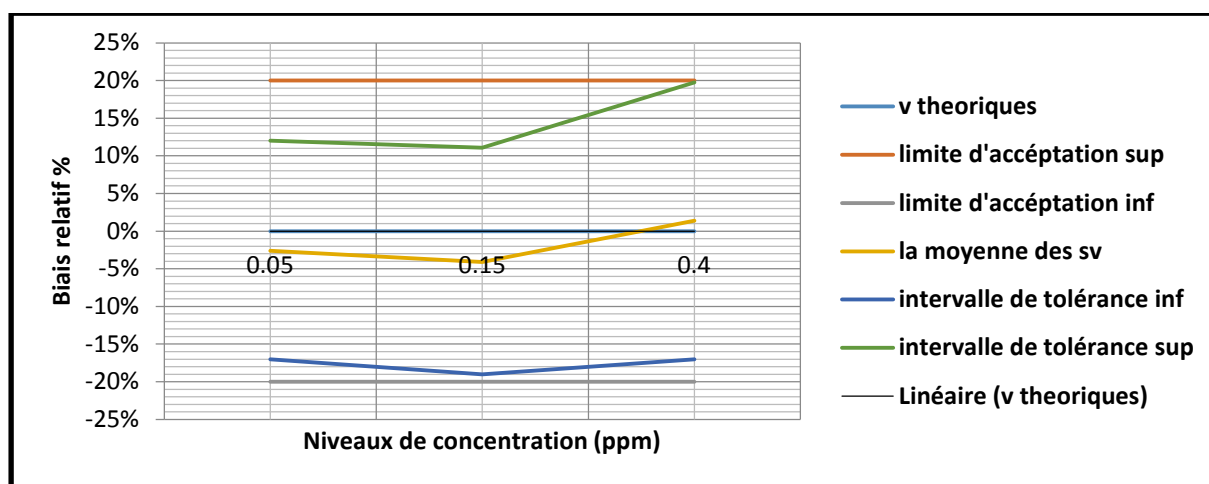
- **Le profil d'exactitude :**

Le profil d'exactitude est représenté graphiquement en abscisse les niveaux des standards de validation (les concentrations 0.05, 0.15 et 0.4 ppm), en ordonnée le biais relatifs. On y reporte le biais relatif moyen pour chaque niveau des standards de validation, leurs limites basses et hautes de l'intervalle de tolérance, ainsi que les limites d'acceptabilité ( $\pm 20\%$ ) (Voir tableau ci-dessous).

Le tableau suivant est un récapitulatif pour les paramètres qui servent à l'établissement du profil d'exactitude de notre méthode de dosage.

**Tableau 40 : récapitulatif pour l'établissement du profil d'exactitude**

Les C° théoriques	La moyenne		Limite intervalle de tolérance basse		limite intervalle de tolérance haut		Limite d'acceptation supérieure	Limite d'acceptation inférieure
	C (ppm)	Biais %	C (ppm)	Biais %	C (ppm)	Biais %		
<b>0.05</b>	0,0488	-0,026	0,0415	-0,17	0,056	0,12	+20%	-20%
<b>0.15</b>	0,1439	-0,041	0,1215	-0,19	0,1666	0,11067	+20%	-20%
<b>0.4</b>	0,4056	0,014	0,332	-0,17	0,479	0,1975	+20%	-20%

**Figure 29: Profil d'exactitude de la méthode de dosage de la cuprurie par SAA flamme.**

Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance sont incluses dans les limites d'acceptabilité ( $\pm 20\%$ ), de ce fait notre méthode est valide pour l'intervalle de dosage choisi

### 3. Applications

Vu Les circonstances actuelles liées à la pandémie du covid-19, nous avons vu notre travail s'interrompre à l'étape de validation, un échantillon d'une personne (femme) saine a été lancé.

#### 3.1 Détermination de la concentration en cuivre dans l'échantillon d'urines

L'échantillon subit le même traitement que celui des points des courbes d'étalonnages

- **Lecture sur la courbe d'étalonnage du jour même** : courbe de J3 de validation avec  
( $y = 0.2966x + 0.0077$ )

	Absorbance (Y)	Concentration retrouvée (x) (ppm)
Echantillon	0.0187	<b>0.037</b>

- **La méthode des ajouts dosés:**

On prépare 3 tubes d'échantillon, à volume de 10 ml, on ajoute des volumes croissants de la solution mère à 100 ppm, sauf le premier tube, la procédure est résumée dans la figure et le tableau suivants :

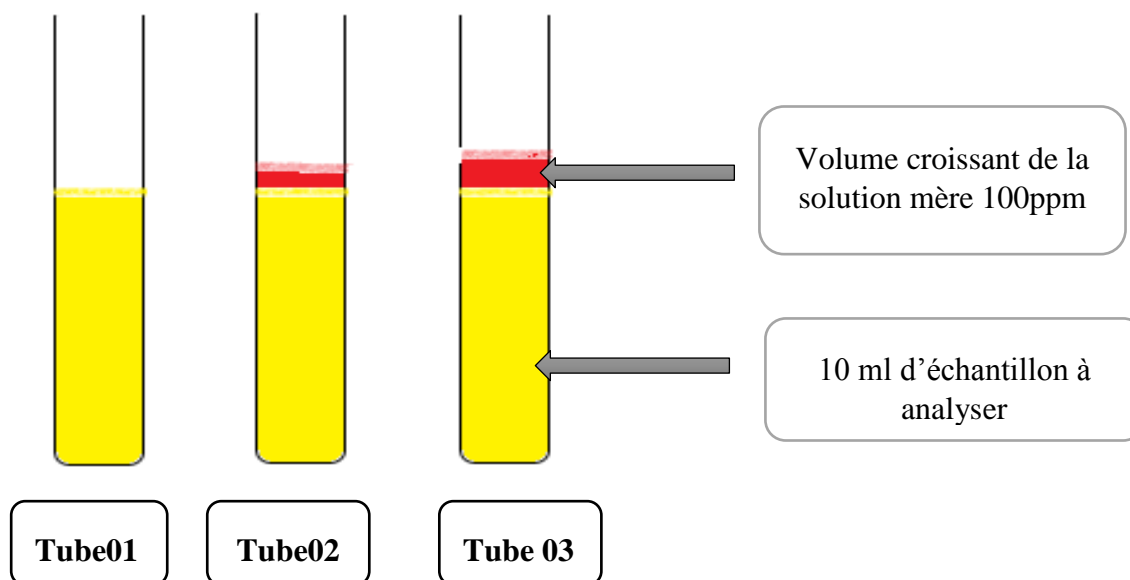


Figure 30: Schéma expliquant la méthode des ajouts dosés.

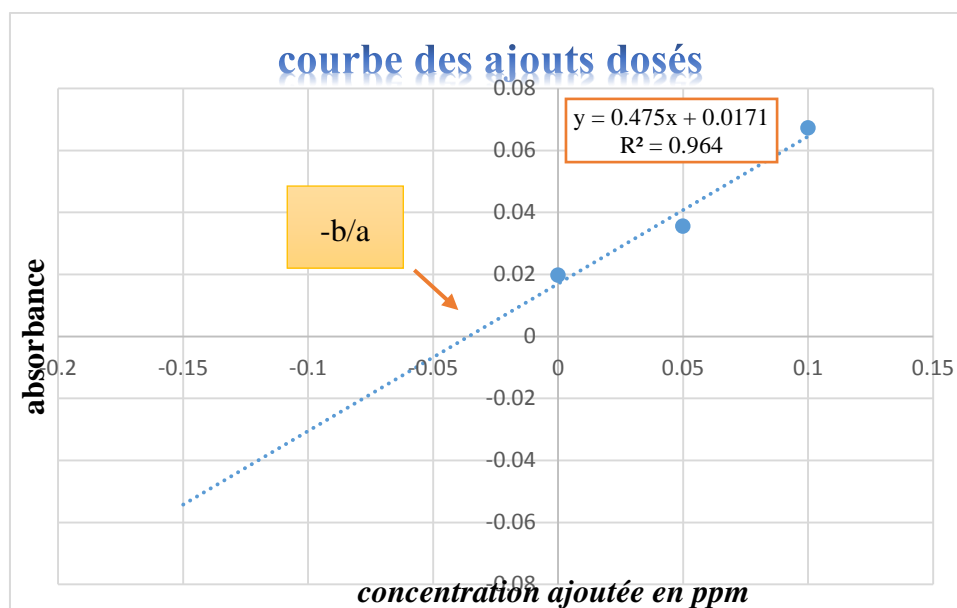
Tableau41: Tableau explicatif de la méthode des ajouts dosés.

	Tube 01	Tube 02	Tube 03
Echantillon d'urine (ml)	10	10	10
Volume (Vi) de la solution mère Ci=100ppm (µl)	0	05	10
Concentration ajoutée *(ppm)	0	0.05	0.1
Absorbance	0.0197	0.0356	0.0672

**\*Calcul des concentrations ajoutées :**

➤ Concentration ajoutée dans le tube 02 :  $C_2 = C_i \cdot V_i / V_2$  avec  $V_2 = 10 + 5 \cdot 10^{-3}$  (ml)  
 $C_2 = 100 \times 05 \cdot 10^{-3} / 10 + 5 \cdot 10^{-3} = \mathbf{0.04997 \text{ mg/l}}$  sera arrondi à **0.05 ppm**

➤ Concentration ajoutée dans le tube 03 :  $C_3 = C_i \cdot V_i / V_3$  avec  $V_3 = 10 + 10 \cdot 10^{-3}$  (ml)  
 $C_3 = 100 \times 10 \cdot 10^{-3} / 10 + 10 \cdot 10^{-3} = \mathbf{0.0999 \text{ mg/l}}$  sera arrondi à **0.1 ppm**

**Calcul de la concentration dans l'échantillon :**

Le point d'intersection de la courbe et l'axe des abscisses correspond à  $(-b/a$  le point où  $y=0$ ) et ce **rapport  $(-b/a)$  correspond à la concentration du cuivre dans l'échantillon** (avec « b » ordonnée à l'origine et « a » la pente)

La concentration en cuivre dans l'échantillon =  $|-0.0171/0.475| = \mathbf{0.036 \text{ ppm}}$

La concentration de cuivre retrouvée avec la méthode courbe d'étalonnage et celle des ajouts dosés sont identiques. De ce fait, le dosage du cuivre dans les urines peut être fait par les deux méthodes.



**CHAPITRE IV :  
DISCUSSION**

### 1. Discussion de la validation de méthode de dosage.

Dans ce travail ; Le protocole de validation développé à partir des guides de validation analytique SFSTP 2003-2006 est bien applicable aux validations analytiques des méthodes de dosage des métaux dans les matrices biologiques.

L'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision permet de visualiser rapidement et clairement les caractéristiques des résultats qui seront obtenus en utilisant la méthode analytique validée.

Cette représentation va pouvoir aider l'analyste à justifier que les critères d'acceptation établis sont adéquats, adaptés à la méthode analytique et au produit auquel elle est appliquée.

Le profil d'exactitude obtenu à partir des résultats de validation peut permettre de soutenir la justification d'un écart de concentration en métal supérieur à  $\pm 20\%$ .

Le tableau suivant résume les performances analytiques de notre méthode de dosage.

**Tableau 42 : Résumé de la validation pour le cuivre urinaire**

Critères de validation	Performances
Intervalle de dosage	0.02 – 0.5 ppm
Linéarité	
Equation de la droite	$y = 0.3274x + 0.005$
Coefficient de corrélation	$R^2 = 0.9978$
Limite de détection(LD)	0.0050 ppm
Limite de quantification (LQ)	0.0168 ppm

<b>Justesse</b>	
Recouvrement moyen (%)	<b>98,3031% ± 7,5196%</b>
Biais relatif	<b>-1.6969 (±20%)</b>
<b>Fidélité</b>	
CV répétabilité	<b>8,5072% (&lt; 20 %)</b>
CV fidélité intermédiaire	<b>7,8224% (&lt; 20 %)</b>
<b>Exactitude (Justesse + Fidélité)</b>	<b>6.1255% (&lt; 20 %)</b>

Durant la validation analytique de la méthode de dosage du cuivre dans les urines par SAAF, nous avons démontré que les paramètres de la validation étudiés répondent aux critères d'acceptation, c'est ainsi que :

- Présence d'un effet matrice, de ce fait le meilleur moyen de le corriger est la méthode d'ajouts ;
- La méthode est linéaire dans l'intervalle de (0.02-0.5ppm) avec une étude satisfaisante au risque de ±20% ;
- La méthode est exacte : avec un intervalle de confiance de 88.11 au 108.6 ;
- La méthode est fidèle avec un coefficient de variation de 7.82% ;
- La méthode est répétable avec un coefficient de variation de 8.50% ;
- La méthode est juste avec une justesse de 6.1255%.

Compte tenu de ces résultats de dosage du cuivre dans les urines par SAAF et dans le cadre des constantes que nous avons fixé (les limites d'acceptabilité  $\lambda = \pm 20\%$  et la probabilité de tolérance  $\beta$  à 70%), la méthode est déclarée **valide**.

## 2. Dosage de l'échantillon :

- ✓ Valeurs trouvées lors du dosage de notre seul échantillon fait par les deux méthodes sont : **0.037ppm**  $\approx$  **0.036ppm** (Les deux valeurs sont très rapprochées).
- ✓ La valeur limite de la normale est de **0.1ppm** (100 $\mu$ g/l).



Le résultat de l'échantillon testé peut être considéré dans **les normes**.

## 3. Discussion du procédé d'extraction par point de trouble

### Avantage :

L'utilisation des systèmes micellaires comme une alternative de séparation présente les avantages suivants [141]:

- ✓ Les tensioactifs non ioniques sont moins dangereux que les solvants organiques employés généralement dans l'extraction liquide-liquide. Ils ne sont ni volatils, ni inflammables. Ils sont biodégradables, ce qui permet de classer la CPE parmi les procédés de chimie verte ;
- ✓ Les surfactifs utilisés sont bon marché.
- ✓ Ils possèdent une ample capacité de concentrer une grande variété d'analytes de natures diverses et à de faibles concentrations même à l'échelle de traces ;
- ✓ La CPE nécessite une quantité minimale de tensioactif (en général quelques milligrammes) ;
- ✓ Le caractère hydrophobe du tensioactif (TA) influe favorablement sur le rendement de la séparation. Il doit être plus ou moins grand par rapport à celui de la substance à analyser
- ✓ La basse température du point de trouble pour certains tensioactifs permet la séparation ou la préconcentration des molécules thermosensibles d'intérêt biologique ou environnemental ;
- ✓ La mise au point expérimentale du procédé de séparation et / ou de pré concentration est très simple à réaliser et il a été décrit par différents chercheurs.

## 4. Contraintes

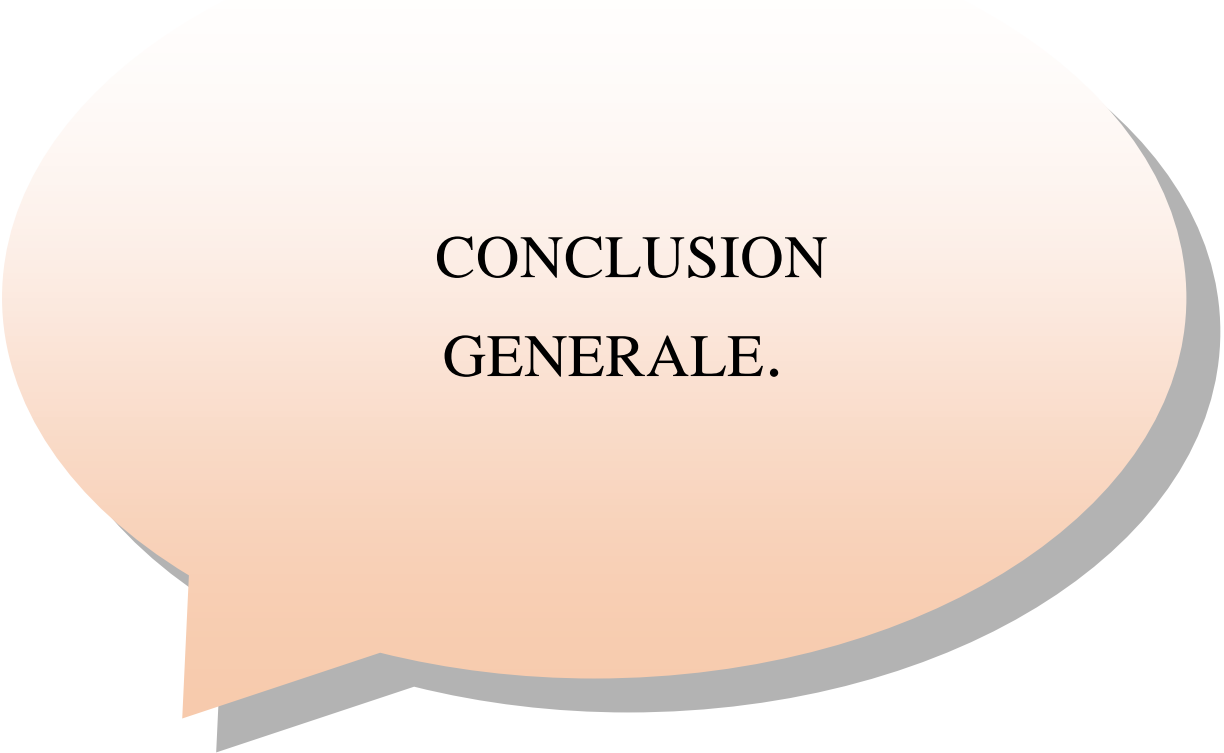
Durant la réalisation de ce travail, nous avons rencontré un certain nombre de contraintes liées notamment aux inconvénients du procédé d'extraction par point de trouble :

- ✚ La première contrainte est la non disponibilité de chélateur spécifique du cuivre, le seul que nous avons trouvé était l'APDC (chélateur non spécifique au cuivre, ce qui augmente le risque d'interférence).
- ✚ Ce procédé est long, demande beaucoup de *précision et d'attention* notamment au moment de récupérer la phase riche en triton X. Plus particulièrement, dans le cas des échantillons d'urines : la phase riche en triton X contenant le complexe  $\text{Cu}(\text{APDC})_2$  est colorée en jaune, ce qui rend plus difficile sa distinction à l'œil nu par rapport à la couleur des urines.
- ✚ La solution d'APDC doit être fraîchement préparée lors de chaque manipulation car sa stabilité diminue avec le temps.
- ✚ Après ajout de la solution méthanolique, l'analyse doit être faite le plus rapidement possible (risque de volatilité, donc des absorbances plus élevées, et viscosité élevée, causant le colmatage de la tubulure de la SAA).
- ✚ Le dosage du cuivre par ce procédé ne peut être effectué chez les wilsoniens traités par un chélateur, car on devra faire une minéralisation pour libérer le cuivre de toute chélation.
- ✚ Non disponibilité d'un contrôle de qualité commerciale ou un contrôle inter laboratoires, pour mieux confirmer nos analyses.
- ✚ Le volume utilisé pour notre analysé est de 10 ml conditionné par la centrifugeuse (tube de 14 ml maximum), sinon des volumes de 20 voire 30 ml sont préférés pour avoir des facteurs de concentration de 20 et 30 respectivement.
- ✚ La difficulté du télétravail suite au confinement établi face à la pandémie (Covid-19).

## 5. Perspectives

- ✚ Etendre la technique de dosage pour les wilsoniens sous traitement dans le cadre du suivi thérapeutique.
- ✚ Chercher un autre chélateur plus spécifique du cuivre ex : la néocuproïne qui se trouve en commerce.
- ✚ Employer le triton X 114 au lieu du triton X 100 pour travailler à des températures basses.

- ✚ Valider un autre procédé avec un prétraitement (minéralisation au préalable), pour assurer un dosage du Cu total dans les urines (Cu complexé et Cu libre) pour le suivi thérapeutique chez malades sous chélateur.



CONCLUSION  
GENERALE.

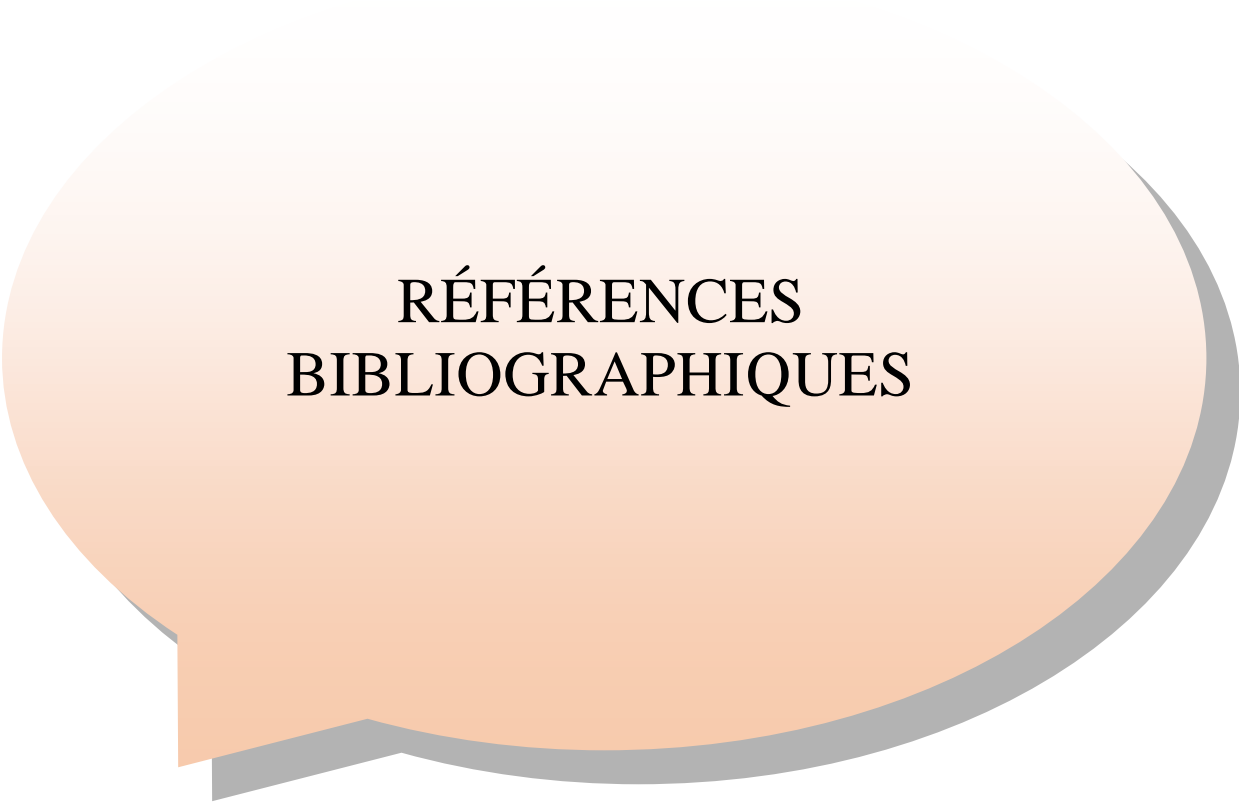
Le cuivre est un oligoélément nécessaire à la vie. Notre corps a donc besoin d'un apport quotidien pour être maintenu en bonne santé.

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

L'extraction au point de trouble a été utilisée avec une détection SAAF pour la détermination de cuivre dans l'urine humaine. La procédure est bon marché et utilise des instruments largement disponibles. La méthodologie offre une alternative simple et sensible, et peu coûteuse à d'autres techniques de pré concentration.

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

Cette technique de dosage du cuivre dans l'urine constituerait alors une amorce dans l'établissement du diagnostic complet de la maladie de Wilson, en assurant le dosage de la triade : Cu urinaire, Cu sanguin (méthode déjà validée sur SAAF) et la céruloplasmine (ce paramètre sera lancé si le dosage urinaire et sanguin du cuivre est disponible).



RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1].COX Diane W. Disorders of copper transport. Br. Med .Bull, 1999, 55(3): 544-555.
- [2].Simona Procházková, Radoslav Halko; Determination of Copper in Human Urine by Cloud Point Extraction and Flame Atomic Absorption Spectrometry; 2016.
- [3].journées techniques viticulture biologique conférence 2 : Cuivre : origines, usages, et différentes formes. Avignon 8et9décembre 2004 page 73 disponible sur le site [http://www.itab.asso.fr/downloads/actes/actes\\_jt\\_viti\\_04\\_avignon\\_mini.pdf](http://www.itab.asso.fr/downloads/actes/actes_jt_viti_04_avignon_mini.pdf)
- [4]. André PICOT, Président de l'ATC Directeur de Recherche honoraire au CNRS, Expert français honoraire auprès de l'Union européenne pour les Produits chimiques en Milieu de travail (SCOEL, Luxembourg), 2011.
- [5]. Linder, M. C. ET Hazegh-Azam, M. (1996).Copper biochemistry and molecular biology. The American journal of clinical nutrition, 63(5):797S–811S.
- [6].M. Falcy, D. Jargot, F. Pillière, et al. ; Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, cuivre et ses dérivés- –Ineris 11 mars 2005, page 25.
- [7]. A.PICHARD: annick.pichard@inerisINERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, sulfate du cuivre.
- [8]. Charles Kittel ; Physique de l'état solide édition Dunod Paris 1998.
- [9]. I.N. Putilova., S.A. Balezin, V.P. Barranik, Metallic corrosion Inhibitors, Pergamum, Oxford, (1960).
- [10]. Starring Jane, Bold and Pepper ;les propriétés du cuivre Institut Européen du cuivre 2018.
- [11].P.CUNY, T.CREA, F.ZITO et all ; Alimentation et peau. Les carences alimentaires. Un problème sanitaire et humain au 21<sup>ème</sup> siècle .diapo77
- [12]. Bernard Beaufrere, Jacques Birgé, Claude Burlet, et al. Carences nutritionnelles : étiologies et dépistage (Besoins, carences et suppléments en vitamines et minéraux) 1999.
- [13]. Actualisation des repères du PNNS : élaboration Des références nutritionnelles Avis de l'Anses Rapports d'expertise collective édition scientifique 2016.
- [14]. Saisine n°2004-SA-0064 138/169 Fiche 13 : Evaluation des risques sanitaires liés au dépassement de la limite de qualité du cuivre dans les eaux destinées à la consommation humaine Cuivre – mars 2006.

- [15]. M.H. Nasser Algerwie and P.C. Khatri Serum copper in newborns and their mothers Department of Pediatrics, S.P. Medical College, Bikaner 1998.
- [16]. M. Tackoen le lait maternel : composition nutritionnelle et propriétés fonctionnelle Breast Milk: its nutritionnel composition and functionalproperties Centre néonatale C.H.U Saint-Pierre 2012.
- [17]. Edward\_J.\_Massaro\_Handbbok\_of\_Copper\_Pharmacology\_and\_Toxicology\_(22).pdf
- [18]. Pr Frédéric Gottrand, Pr Dominique Türck Alimentation et besoins nutritionnels du nourrisson et de l'enfant Unité de gastroentérologie, hépatologie et nutrition, clinique pédiatrie, hôpital Jeanne de Flandre, centre hospitalier régional et universitaire de Lille et faculté de médecine, université de Lille 2, 59037 Lille cedex.
- [19]. Luc Cyno ber, Emmanuel Alix et All ; Apports nutritionnels conseillés chez la personne âgée 2000.
- [20]. Dr Ben Saad. S maitre-assistant en biochimie cours de deuxième année médecine sur les oligo-éléments université Salah Boubnider 2019/2020.
- [21]. 180831\_valeurs\_de\_reference\_biochimie.pdf (CHUM mise à jour : 28-08-2018)
- [22]. MERCER J. the molecular basis of copper transports diseases cuivre: métabolisme; transport ET absorption.mol. Med, 2001 7(2):64:
- [23]. ELKOUBI P ; j Chir le cuivre, Cuivre : métabolisme ; transport et absorption 1989 ; 126(4) :248-57.
- [24]. EL-YOUSSEF M. Mayo. Clin. Wilson disease ; Cuivre : métabolisme ; transport et absorption Proc, 203.78(9) :1126-1136.
- [25]. Durant-F ; JP BENHAMOU. Maladie de Wilson ; Cuivre : métabolisme ; transport et absorption .EMC1993 hépatologie 7-037-1-10.
- [26]. MISRAHI M., HADCHOUEL M. Physiopathologie et génétique de la maladie de Wilson Hépatogastro., 1997, 6(4):473-481.
- [27]. Guiraud P, Favier A et Horn N .Métabolisme du cuivre. Encycl. Méd. Chir. Endocrinologie nutrition .10-359-C-10. (Cuivre : métabolisme ; transport et absorption).
- [28]. Chappuis, BOST mirachi m, et al. La maladie de Wilson. Aspects clinico –biologiques. Ann Biol.clin. La cinétique du cuivre ; la distribution du cuivre. 2005. 63(5)475-66.
- [29]. LEI WAN, CHANG-HAI TSAIETal ; Mutation analysis of Taiwanese Wilson disease patients Biochemical and Biophysical Research Communications 345 (2006)734-738.

- [30]. Gracia Heijl. Cuivre: la cinétique du cuivre; le métabolisme ; 2009.
- [31]. TROCELLO JM, Chappuis P, El Bal khi S Poupon J, Leyendecker A, Chainé P, Woimant F. Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte. Revue de Médecine interne 31(2010)750-756).
- [32]. Julie La liberté ET Simon Labbé; Les bases moléculaires de l'approvisionnement En cuivre leçon tirée de la levure; publié en mars 2008.
- [33]. Giraud P, Favier. A ET Horn N. métabolisme du cuivre. Encycl. Med Chir, Endocrinologie Nutrition, 10-359-C-10, 2003, 10 P.
- [34]. Claire PICAUD ; oligo-élément : excès, carences et conseil officinal ; thèse; 20/12/2017.
- [35]. Rapport d'un comité d'experts de l'OMS ; les oligo-éléments en nutrition humaine, (Organisation mondiale de la santé série de rapports technique ; N° 532 ; cuivre, Rôles Métaboliques ; P17.).
- [36].Balmont Stéphanie ; Intérêt des micronutriments pour l'immunité des personnes âgés, année 2006 ; N° 7016 ; P54.
- [37]. Alimentation et peau. Les carences alimentaires. Un problème sanitaire et humain au 21<sup>ème</sup> siècle .diapo77 .
- [38].Sara BAHLOUL, La maladie de Menkes, à propos d'un cas et revue de la littérature ; 2018 ; P15-16
- [39].Gu YH, kodama H., Shiga K, Nakata S, Yanagawa Y , Ozawa H. A survey of Japanese patients with Menkes disease from 1990 to 2003: incidence and early signs before typical symptomatic onset, pointing the way to earlier diagnosis.J. Inherit, Metab. Dis. 2005 ; 28(4) : 473-478.
- [40]. Celia H Chang, MD; Menkes Disease 2018.
- [41].Maladie de Menkès : quels symptômes, traitements ? ; Le journal des femmes ; article mis à jour le 15/11/19.
- [42].Le manuel MSD version pour professionnels de la santé : revue générale des carences en minéraux et intoxications par les minéraux.
- [43]. J.-M. Trocelloet al. « Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte », Rev. Médecine Interne, vol. 31, no 11, nov. 2010.
- [44]. D. Videt-Gibou, S. Belliard, J. Rivalan, D. Ménard, et G. Edan, « Myélopathie postérieure par carence en cuivre acquise », Rev. Neurol. (Paris), vol. 166, no 6, juin 2010.

[45].G. Keck, « Contaminants et résidus chimiques dans les aliments d'origine animale», Rev. Fr. Lab., vol. 2002, no348, déc. 2002.

[46].IFREMER, « Impact potentiel des activités nautiques sur la qualité des eaux du Bassin d'Arcachon », janv. 2008.

[47]. ANDREWS E. B. & C. LITTLE, 1972. Structure and function in the excretory systems of some terrestrial prosobranch snails (Crciophoridae). J. Zool., Vol. 168, pp. 395-422.

[48]. Sénat. Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé », Sénat. Disponible sur : <https://www.senat.fr/rap/100-261/100-26188.html>.

Lonnerdal, 1998; Bauerly et coll., 2005

[49]. Estéban Remon. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Biologie végétale. Université Jean Mo2et - Saint-Etienne, 2006. Français.

[50]. Arens, P., Tuschewitzki, G-J., Follner, H., Jacobi, H. et Leuner, S. (1996). Experiments for stimulating microbiologically induced corrosion of copper pipes in a cold-water plumbing system. Mater. Corros, 47: 96–102

[51]. Zacarias, I., Yanez, C.G., Araya, M., Oraka, C., Olivares, M. et Uauy, R. (2001). Determination of the taste threshold of copper in water. Chem. Senses, 26(1): 85–89.

[52].Ellingsen et coll., 2007; Riedel, 2008; Mauceri et Mishra, 2014, CCME, 1999; ATSDR, 2004.

[53]. Rezania, L.W. ET Anderl, W.H. (1995). Copper corrosion and iron removal plants. The Minnesota experience. Proceedings of the 1995 AWWA Water Quality Technology Conference, New Orleans, LA. American Water Works Association, Denver, Colorado.

[54]. Rasmussen, P.E., Beauchemin, S., Nugent, M., Dugandzic, R., Lanouette, M. ET Chenier, M. (2008). Influence of matrix composition on the bioaccessibility of copper, zinc, and nickel in urban residential dust and soil. Hum. Ecol. RiskAssess.,

[55]. Nicolas Franchitt, Bernard Georges, Peggy Gandia Nicolas, Anne Galinier, Norbert Telmon, Jean Louis Ducass'e, Daniel Roug .Service d'aide Medicale d'Urgence, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, 330 avenue de Grande Bretagne, TSA 70034, 31059.

[56].YONG SOO CHO, JEONG MI MOON, YONG HOON JEONG, DONG HUN LEE, Byeong JO CHUN Chonnam National UniversityHospital, Gwangju, Corée duSud Département de médecine d'urgence.2018.

[57]. P. Chappuis et Société Francophone d'Études et de Recherches sur les Éléments Trace Essentiels, Les oligoéléments en médecine et biologie. Lavoisier Tec & Doc, 1991.

- [58].L. Sctrick, R. Jollois L'oligothérapie exactement, 1991.
- [59].C. Guichet eau, L.Boyer, D.A.Somé, J-Levèque, P.Poulain, M.Denier, V.Lavoué.
- [60].DOCTEUR W.R.WALKER, Université de NEWCASTLE, les bijoux en cuivre Australie.
- [61]. Zlotkin, S.H., Atkinson, S. et Lockitch, G. (1995). Trace elements in nutrition for premature infants. Clin. Perinatol, 22(1): 223–240.
- [62].Robert Lauwerys, Vincent Haufroid, Perrine Hoet, Dominique Lison, Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles 5<sup>e</sup> édition, Cuivre, INTOXICATIONS PROFESSIONNELLES.
- [63].Kapoor Neeti<sup>1</sup> and KhajuriaHimanshu; Copper Toxicity: A Comprehensive Study Badiye Ashish<sup>12</sup> 1RTM Nagpur University, Nagpur, MH, INDIA ; Received 29th November 2012, revised 25th December 2012, accepted 15th February 2013.
- [64].André PICOT Ingénieur Chimiste, Toxicochimiste Directeur de Recherches honoraire du CNRS ; La Destinée du Cuivre dans l'Organisme humain, entre Bénéfice et Risque à Luxembourg de 1992 à 2004.
- [65]. George J. Brewer ;A brand new mechanism for copper toxicity ; Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, 48109-0534, USA.
- [66]. Marie MERCIER- JACQUIER, La maladie de Wilson, Revue de la littérature à propos de 19 observations, FACULTE DE MEDECINE DE NANCY.2007
- [67].Wei Hsu, Stephen C. Bondy, and Masashi Kitazawa<sup>1</sup>; Environmental and Dietary Exposure to Copper and Its Cellular Mechanisms Linking to Alzheimer's disease Heng, Center for Occupational and Environmental Health, University of California, Irvine, California 92617. 2018.
- [68].Philippe Benny ; Les Intoxications par le Cuivre UP Pharmacie – Toxicologie ENVL Cours de Toxicologie Clinique D3 09/2005.
- [69].A. Faure, L. Mathon, J.C. Poupelin a, B. Allaouchiche c, D. Chassard Acute cupric sulfate intoxication: pathophysiology and therapy 69437 Lyon cedex 03, France Reçu le 4 août 2002; accepté le 4 février 2003.
- [70].EIRONALD J. SOKOL, MICHAEL W. DEVEREAUX, MARET G. TRABER, AND ROBERT H. SHIKES Copper Toxicity and Lipid Per oxidation in Isolated Rat Hepatocytes: Effect of Vitamin Section of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, Department of Pediatrics [R.J.S., M. W.D; New York, New York 10016Vol. 25, No. 1, 1989.
- [71].M. BISSON - N. HOUEIX - G. GAY – G. LACROIX - J.P. LEFEVRE - H. MAGAUD - V. MIGNE - A. MORIN - S. TISSOT DOCUMENTATION C. GILLET ; INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques CUIVRE ET SES

DÉRIVÉS Dernière mise à jour : 11/03/05 RESPONSABLE DU PROGRAMME A. PICHARD : annick.pichard@ineris.fr EXPERTS AYANT PARTICIPE A LA REDACTION.

[72].M L Schilsky, R J Stockert, I Sternlieb J Clin Invest; Hepatocellular copper toxicity and its attenuation by zinc. 1989; 84(5):1562-1568.

[73].MLLE ERAHMOUNI Badia, Badia ; La maladie de Wilson (à propos de 5 observation), thèse N°048/09 ,2009 .

[74].J.-CH, Duclos-vallé, Ph. Ichai, Ph .Chapui, M.Misrahi, F.Woimant. La maladie de Wilson; Mars 2006.

[75].F.Woimant, J-M. Torcello, N. Girardot-Tintant, P. Chainé, R. Sobesky, J-C.Duclos-Vallée, P. Chappuis. El Balkhi, J. Poupon Maladie de Wilson .17-060-A-10.

[76].P.Hiroz, A. Antonino, C.Doerig, I. Pache, D. Moradpour ; La maladie de Wilson: un caméléon clinique auquel il faut penser ; Rev Med suisse 2011 ; 7 ; 1690-S.

[77].François Agret, Anaïs Vallet-Pichard, Alain Landau ; Révélation tardive d'une maladie de Wilson sous la forme d'une cirrhose compliquée d'un carcinome hépatocellulaire,Gastroentérologie Clinique et Biologique Vol 27, N°1 – janvier 2003, p.130.

[78]. Sami Kaidi ; Maladie de Wilson : L'impératif d'un registre national ; article publié le 12/03/2020.

[79].A. Poujois P. Chainé F. Woimant - FMC 2018; 9:173–185; La maladie de Wilson en 2018, Pratique Neurologique.

[80].Marie MERCIER- JACQUIER.La maladie de Wilson Revue de la littérature à propos de 19 observations.THESE Pour obtenir le grade DOCTEUR EN MEDECINE Présentée et soutenue publiquement Dans le cadre du troisième cycle de Médecine Générale Par Le 29 mai 2007.

[81]. Maladies Rares Info Services 01 56 53 81 36 [www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Wilson-FRfrPub134v01.pdf](http://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Wilson-FRfrPub134v01.pdf) | Mai 2008

[82].Dr AFTIS Dr ZMIRI Pr NAKMOUCHE maladie de Wilson séminaire atelier février 2009

[83]. Zineb RACHADI Médecin Interne du CHU Mohamed .La maladie de Wilson chez l'enfant - A propos de 24 cas - THESE PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 06/10/2016 PAR Mlle. VI de Marrakech Née le 10 Aout 1990.

[84].Philippe Chappuis, Muriel Bost Micheline Misrahi et al ; EXPLORATION BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE WILSON, France Woimant.

[85]. Dr Bedrane -Barka Zahira. Maladie de Wilson .Thèses pour l'obtention du doctorat en médecine ; université Abou BekrBelkaid ,2013-2014.

[86]. CAROLE EMILE Biologiste, rédactrice scientifique, **source** D'après les communications de Joël Poupon et France Woimant (CNR Wilson, Hôpital Lariboisière, Paris). 43e Colloque national des biologistes des hôpitaux, Marseille, novembre 2014.

[87]. Dr. Hammaoui Hamza Dr. Tedjini O kacha. Maladie de Wilson.[Thèse]Année universitaire : 2011-2012.

[88]. BREWER GJ. Practical recommendations and new therapies for Wilson's disease *Dmgs*, 1995, 50(2):240-249.

[89]. Bergstrom RF, Kay DR, Wagner JG: The in vitro loss of penicillamine in plasma, albumin solutions, and whole blood: Implications for pharmacokinetic studies of penicillamine. *Life Sci* 27:189-198, 1980.

[90]. Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: Impact on genetic testing. *Hum Genet* 2006; 120:151-9.

[91]. Docteur France Woimant Centre de référence de la maladie de Wilson Service de Neurologie Hôpital Lariboisière, Paris.

[92]. DAVID A. JOYCE ; D-PENICILLAMINE PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS IN MAN Department of Clinical Pharmacology, Queen Elizabeth H Medical Center and University of Western Australia, Nedlands, WA 6009, Australia.

[93]. J. Ghika, F. Vingerhoets, P. Maeder, F.-X. Borruat, J. Bogousslavsky Service de neurologie du Professeur Bogousslavsky, Centre hospitalo-universitaire Vaudois, rue du brugnon, CH 1011 Lausanne, Suisse

[94]. Dr Diane Cox Wilson disease treatment University of Alberta 8-39 Medical Sciences Building Edmonton, Alberta T6G2H7 Canada.

[95]. Holtzman, NA, Elliott DA, Heller RH. Copper intoxication. Report of a case with observations on ceruloplasmin. *N Engl J Med*. 1966; 275(7): 347-52.

[96]. El-Zein M, Infante-Rivard C, Malo JL, Gautrin D - Is metal fume fever a determinant of welding respiratory symptoms and/or increased bronchial responsiveness, *Occup Environ Med.*, 2005, 62, 10 : 688-94.

[97]. Nelson LS, Replinger D, Nguyen V, Rao R. A bad case of the blues. *American College of Medical Toxicology National Case Conference*, 2011).

[98]. P. Chappuis et Société Francophone d'Études et de Recherches sur les Éléments Trace Essentiels, *Les oligoéléments en médecine et biologie*. Lavoisier Tec & Doc, 1991.

- [99].Bremner I. 9Manifestationsofcopperexcess. AmJClinNutr1998;67:1069S–73S.
- [100].Franz – Xavier REICHL. Guide pratique de toxicologie. De Boeck 2004, 2eme édition.
- [101]. A. Faure, L. Mathon, J. C. Poupelin, B. Allaouchiche, et D. Chassard, « Intoxication aiguë au sulfate de cuivre :physiopathologie et traitement d’après un cas», Ann. Fr. Anesth. Reanimation, vol. 22, no6, juin 2003.
- [102]. HASSABALAH H.A, LATEEF O.BEU, J. KIM, E.KASID L. Metal fume Fever presenting an aseptic meningitis with pericarditis, pleuritis and pneumonitis occupy MED (Lond).55, 638.2005
- [103]. Bingham E, Cohrssen B, Powell CH (Eds) - Patty's Toxicology Cu.5th ed. Vol 2. New York: John Wiley and Sons; 2001: pp. 598-610.
- [104]. Copper. Draft Assessment Report Volume 3, Annex B.6, Toxicology and metabolism. EFSA, avril 2007.
- [105]. Gunay N, Yildirim C, Karcioğlu O, et al. A series of patients in the emergency department diagnosed with copper poisoning: recognition equals treatment. Tohoku J ExpMed 2006; 209:243—8.
- [106].Antoine VILLA. DIU Toxicologie Centre Antipoison de Paris Consultation de pathologie professionnelle Hôpital Fernand Widal.
- [107]. P. Chappuis et Société Francophone d’Études et de Recherches sur les Éléments Trace Essentiels, Les oligoéléments en médecine et biologie. Lavoisier Tec & Doc, 1991.
- [108]. Claire PICAUD thèse d’exercice Université de Limoges 2017
- [109].M. Falcy, D. Jargot, F. Pillière, S. Robert, P. Serre, A. Cavelier, A. Fastier, MO. Rambourg ; Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, cuivre et ses dérivés page 16.
- [110].Institut National de Recherche et de Sécurité, « Valeurs limites d’exposition professionnelle aux agents chimiques en France ». oct.-2016.
- [111].PICHARD A. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, cuivre et ses dérivés- –Ineris 11 mars 2005, page 25.
- [112].Guide bio toxicologique pour les médecins de travail ;Biotox 2018 ; p 113
- [113].José Carlos Diaz Ros ado. Étude et développement de la spectroscopie d’émission optique sur plasma induit par laser pour la réalisation d’analyses de terrain : application à l’analyse en ligne de métaux dans les liquides. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114805.

[114]. Michel MORLOT. AGHTM, Aspects analytique du plomb dans l'environnement, Lavoisier.

[115]. J.P. GOULLE, R. TALEC. Quelles technologies pour l'analyse toxicologique en 2003 ; Overview of toxicological analysis methods in 2003. ITBM-RBM 25 (2004) 48– 53.

[116]. Luca Pujol. Mise au point d'un dispositif électro analytique intégrant une étape de minéralisation et une étape de détection pour le dosage des métaux lourds. Ingénierie de l'environnement. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30352.

[117]. Industrie métallique, laboratoire d'analyse d'eau potable et d'eaux résiduaires No. 49/1

[118]. Dominique DLBENEDETTO, Philippe BREUIL. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible ; 10 mars 2007 ; Relu et validé le 01 mars 2019 ; Réf : P2795 v2.

[119]. Philippe MONBET – Marina COQUERY. Approches analytiques pour l'évaluation de la Biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques Rapport Technique Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable Direction de l'Eau 20, avenue de Ségur – 75302 PARIS 07 SP Convention DE n° CV03000081 – Opération n° 2, DECEMBRE 2003.

[120]. M. Di BENEDETTO. « Les métaux lourds, Méthodes spectrométriques; analyse et caractérisation, » Dossier SAM ; Axe « Génie des Procédés », centre SPIN, Ecole Nationale des Mines de Saint-Étienne, 1997.

[121]. N. TIWANGYE. An overview of electro analytical methods to trace element speciation in natural waters. Symposium in Analytical Chemistry, Uganda, (1995).

[122]. A. Gabriel et coll., Cloud point extraction for analysis of antiretroviral in human plasma by UFLCESI-MS/MS, *Analytical Chemistry Research* **2015**, 6, 1–8.

[123]. Radoslav Halko Determination of Copper in Human Urine by Cloud Point Extraction and Flame Atomic Absorption Spectrometry, 2015.

[124]. Jamshid L. Manzoori, Ahad Bavili-Tabrizi ; The application of cloud point preconcentration for the determination of Cu in real samples by flame atomic absorption spectrometry; 2002.

[125]. M. Ghaedi, A. Shokrollahi et al. Cloud point extraction for the determination of copper, nickel and cobalt ions in environmental samples by flame atomic absorption spectrometry 2007.

[126]. R.W. Looyenga ; D.F. Boltz Département de chimie, Wayne State University, Detroit, Michigan 48202 USA 1971

- [127]. Naeemullah, Tasneem GulKazi, Hassan Imran Afridi et al Simultaneous determination of silver and other heavy metals in aquatic environment receiving wastewater from industrial area, applying an enrichment method National Centre of Excellence in Analytical Chemistry, University of Sindh, Jamshoro 76080, Pakistan Received 4 August 2012; accepted 8 October 2014 Available online 25 October 2014.
- [128].S.R. Sirimanne, J.R. Barr, D.G. Patterson, *Anal. Chem.* 68 (1996). 1556-1560.
- [129].W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993). 133-177.
- [130]. H. Tani, T. Kamidate, H. Watanabe, *J. Chromatogr. A* 780 (1997). 229- 241.
- [131].Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu B. Boulanger et al. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches ; Commission SFSTP, E. Chapuzet, 2003 partie I
- [132].Marie-Dominique Blanchin ; Validation des méthodes d'analyse ; Journées Qualité et Chimie 2010 Une démarche qualité au service de la chimie Autrans - 14 octobre 2010 P5
- [133]. validation du dosage du cuivre sérique par la SAA flamme [thèse] ; UMMTO ; 2011.
- [134].Isabelle pinguet ; Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003- 2006 au domaine de la phytothérapie, sciences pharmaceutiques 2015 dumas -01188779 .p12.13.14
- [135].Current concepts for the validation of compendial assays. Pharmacopoeial Forum, The United States Pharmacopoeia Inc., Rockville, 1986, p. 1241.
- [136].E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, B. Boulanger, P. Chevalier, P. Chiap, D. Grandjean, Ph. Hubert, P. Lagorce, M. Lallier, M.C. Laparra, M. Laurentie, J.C. Nivet. – Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP. - *STP Pharma Prat.*, 7, 169-194, 1997.
- [137]. P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II – Statistiques Commission SFSTP.
- [138].MOUHSIN Mouad ;MEMOIRE DE FIN D'ETUDES Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques Validation analytique par profil d'exactitude de la méthode de dosage simultané de métronidazole et de spiramycine par HPLC Présenté par: MOUHSIN Mouad Encadré par : (- Pr. A.BOUKLOUZE - Pr. O.SQALLI) Soutenu Le 23 Juin 2015 .
- [139].Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu B. Boulanger, Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches Commission SFSTP.
- [140].Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu B. Boulanger, Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches Commission SFSTP.

[141]. E. K. Paleologos, D. L. Giokas, M. I. Karayannis, Micelle-mediated separation and cloud point extraction, *Trends in Analytical Chemistry* **2005**, 24:5, 426-436.

[142]. PRADYOT, Patnaik. *Dean's Analytical Chemistry Handbook* (McGraw-Hill Handbooks). Second édition. 1114 p. 2004. ISBN: 0071410600.

[143]. PINTA, M. *Spectrométrie d'absorption atomique Tome 1, Problèmes généraux*. Masson, Paris, 1979. 696 p. ISBN: 2-225-64020-3.

[144]. JOHN, Lynch. *Analyse physico-chimique des catalyseurs industriels, manuel pratique de caractérisation*. Edition Technip. Paris, 2001. 336p. ISBN : 2-7108-0750-5.

[145]. Haswell, S.J., 1991. *Atomic Absorption Spectrometry; Theory, Design and Applications*. Elsevier, Amsterdam.

[146]. SKOOG, HOLLER, NIEMAN. *Principe d'analyse instrumentale*, fifth edition. Edition de Boeck université. Paris, 2003. 938p. ISBN : 2-7445-0112-3.

[147]. BROKAERT, José A. C. *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*. Deuxième édition revue et augmentée. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2005. 414p. ISBN: 978-3-527-31282-5.

[148]. *Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation, spectrométrie d'absorption atomique*. Axe " Génie des Procédés", Centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne. 43p.

[149]. LINDEN. *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*, Volume 2. Tech. & Doc. /Lavoisier. 1993. 510p. ISBN : 978-2852065987.

[150]. José Carlos DIAZ ROSADO ; étude et d'analyses de développement de la spectrométrie d'émission optique sur plasma induit par laser pour la réalisation terrain : application à l'analyse en ligne de métaux dans les liquides, université paris sud année 2012/2013.

[151]. AMMOUR A ; Préparation d'une solution tampon ; UNSA éducation.

[152]. Masood Sarwar and Saied Ahmad ; Copper(II) complexes of pyrrolidine dithiocarbamate Received 7 September 2006; accepted 6 October 2006

[153]. A. Tessier, M. Bisson ; Réalisation d'un montage expérimental permettant d'effectuer en continu la chélation extraction des métaux traces: Cu, Zn, Pb, Cd, Co et Ni ; RAPPORT SCIENTIFIQUE No 79/1977.

[154]. Devoir surveillé de chimie lycée Janson de Sailly ; classe de PCSI 7 ; année scolaire 2017/2018.

[155].Valfredo A. Lemos ,Geisiane dos S. Novaes,Anaildes L. de Carvalho, Determination of copper in biological samples by flameatomic absorption spectrometry after precipitation with Me-BTAP ,2008.

[156].M. A. Bezerra, M. A. Z. Arruda, S. L. Costa Ferre, Cloud Point Extraction as a Procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques, *AppliedSpectroscopy Reviews* **2005**, 40, 269-299.



# **ANNEXES**

## 1. Introduction

La (SAA) est une technique décrite pour la 1ère fois par le physicien australien Alan Walsh (1955). C'est une technique sensible pour la détermination quantitative de plus que 70 métaux, elle permet le dosage mono-élémentaire des cations majeurs dans des échantillons liquides. Les applications sont nombreuses étant donné qu'on atteint couramment des concentrations inférieures au mg/L (ppm).

## 2. Principe

L'absorption atomique est un processus qui se produit lorsqu'un atome soumis à un rayonnement d'énergie (qui correspond à une longueur d'onde spécifique) peut passer d'un état fondamental à un état excité, caractérisé par des électrons à un niveau plus élevé et instable. En général, la raie de la transition entre l'état fondamental et le premier état excité définit la plus forte capacité d'absorption, et c'est la raie habituellement utilisée. Les transitions entre l'état fondamental et l'état excité se produisent uniquement lorsque le rayonnement incident, provenant d'une source lumineuse, est exactement égale à la fréquence d'une transition spécifique. Une partie de l'énergie de la radiation incidente  $I_0$  est absorbée. Le rayonnement émis est donné par  $I$

$$I = I_0 e^{-\epsilon l}$$

$\epsilon$ : Coefficient d'absorption de l'élément à analyser

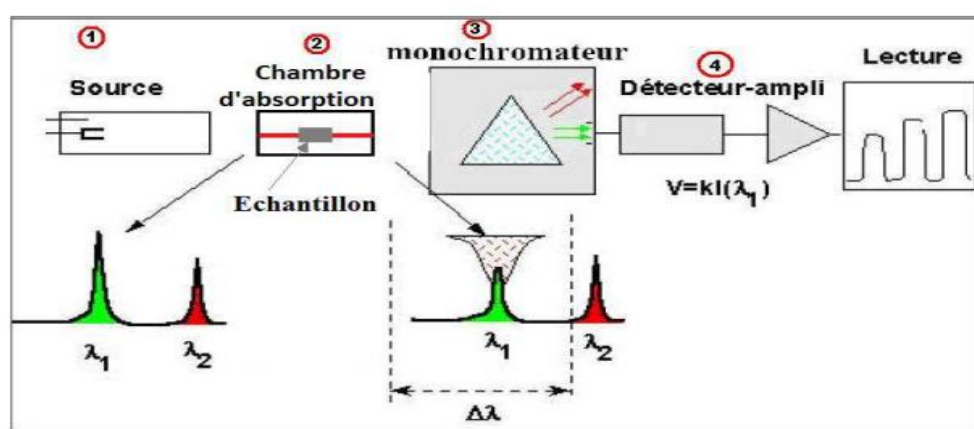
$L$  : La longueur du trajet horizontal du rayonnement à travers la chambre d'absorption.

L'absorption atomique est déterminée par la variation de la puissance rayonnante du faisceau incident en présence et en absence d'atomes analyte dans l'atomiseur. La quantité d'énergie absorbée, à partir d'un faisceau de rayonnement pour la longueur d'onde d'une raie de résonance, augmentera avec l'augmentation du nombre d'atomes de l'élément sélectionné dans la chambre d'absorption. La relation entre la quantité de lumière absorbée et la concentration de l'analyte présent dans les standards peut être déterminée. On peut déterminer les concentrations des échantillons en comparant les quantités de rayonnement absorbé par ces derniers avec la quantité de radiation absorbé par les standards[142].

### 3. Appareillage

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose de quatre parties principales: (figure N° 31)

Le faisceau lumineux issu de la source (1) traverse la chambre d'absorption (flamme) (2) dans laquelle l'élément se trouve porté à l'état fondamentale, avant d'être focalisé sur la fente d'entrée d'un monochromateur (3) qui sert à éliminer toutes les radiations autres que celle à la longueur d'onde. Le trajet optique se termine sur la fenêtre d'entrée du détecteur (4) (Figure 31,32).



**Figure 31 : Les instruments de base pour la spectrométrie atomique**

La solution contenant l'élément à doser est aspirée à travers un capillaire et dirigée vers le nébuliseur. Elle est ensuite pulvérisée à très grande vitesse à travers une chambre où s'éliminent les grosses gouttes grâce à une bille brise-jet. La solution ainsi vaporisée est entraînée par le combustible à travers le brûleur à la sortie duquel a lieu la combustion. Après dissociation thermique dans la flamme, les radiations incidentes qui sont fournies par une lampe à cathode creuse qui émet le spectre de l'élément que l'on veut doser sont absorbées. La mesure de cette absorption permet de déterminer la concentration de l'élément à doser [142].

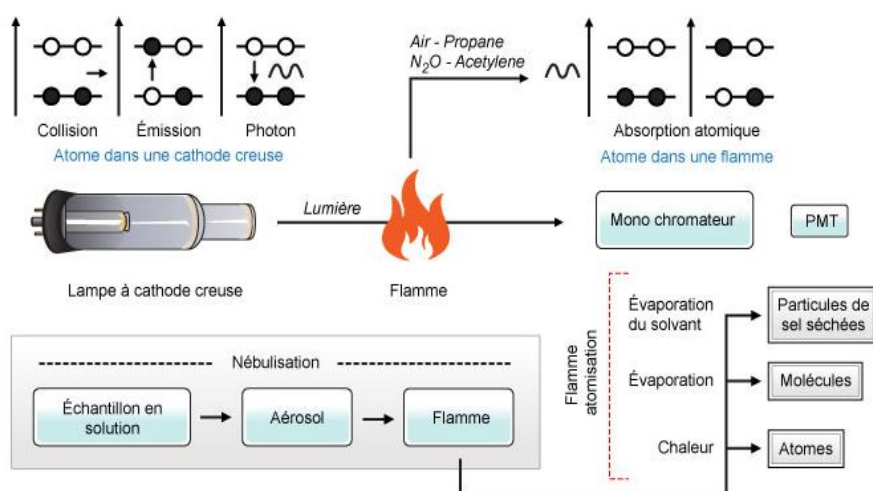


Figure 32 : Spectrométrie d'absorption atomique flamme.

### 3.1 Source lumineuse

La source a pour but la production d'une radiation électromagnétique intense avec une longueur d'onde similaire à celle absorbée par les atomes, elle doit être stable dans le temps, présente une luminance élevée pour le spectre de l'élément avec un fond continu faible et enfin avoir une durée de vie assez longue. Elle est généralement constituée de lampe à cathode creuse ou à décharge électronique [143].

#### 3.1.1 Les lampes à cathode creuse

Le but principale de cette lampe est de fournir le spectre de raies de l'élément à doser et d'isoler la raie de résonance à l'aide d'un monochromateur. La lampe à cathode creuse est constituée par une enveloppe de verre scellée et pourvue d'une fenêtre en verre ou en quartz contenant une cathode creuse cylindrique et une anode. La cathode est constituée de l'élément que l'on veut doser. Un vide poussé est réalisé à l'intérieur de l'ampoule qui est ensuite remplie d'un gaz rare (argon ou néon) sous une pression de quelques mm d'Hg.

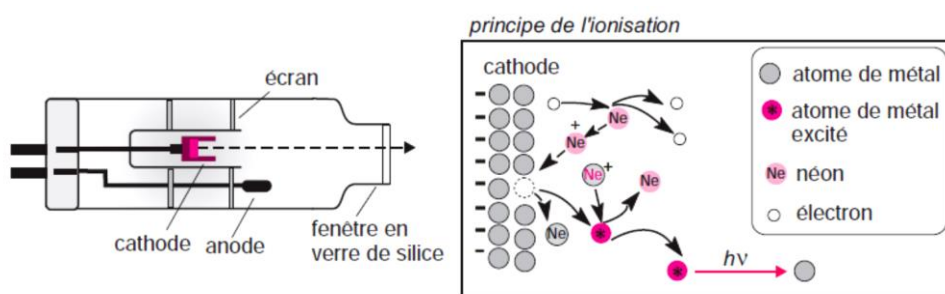


Figure 33 : Composition générale d'une lampe à cathode creuse

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

Pour doser le cuivre qui se trouve dans l'échantillon, il faut une lampe qui lui est spécifique. Cependant, il existe une lampe multiéléments qui est une cathode en alliage de divers métaux [144].

### 3.1.2 Autres sources lumineuses

- ✚ lampe à décharge électronique.
- ✚ Lampe à décharge sans électrode.

## 3.2 .Nébuliseur (pulvérisateur)

L'échantillon à analyser est en solution. Celle-ci est aspirée au moyen d'un capillaire par le nébuliseur. A l'orifice du nébuliseur, du fait de l'éjection d'un gaz à grande vitesse, il se crée une dépression (effet Venturi). La solution d'analyse est alors aspirée dans le capillaire et à la sortie, elle est pulvérisée en un aérosol constitué de fines gouttelettes. Cet aérosol pénètre alors dans la chambre de nébulisation dont le rôle est de faire éclater les gouttelettes et d'éliminer les plus grosses. Ce brouillard homogène pénètre alors dans le brûleur [145,146].

## 3.3 Chambre d'absorption (atomiseur)

La SAA nécessite d'avoir les atomes à l'état fondamental, afin d'observer les raies caractéristiques de l'élément. L'atomiseur doit donc fournir des atomes libres sans les exciter. Il faut de la chaleur pour faire passer l'échantillon généralement en solution à l'état d'un gaz atomique. Cette chaleur peut être générée par une flamme ou par un four de graphite. La SAA de flamme analyse seulement les solutions, tandis que la SAA de four de graphite analyse les solutions, les boues liquides et les solides.

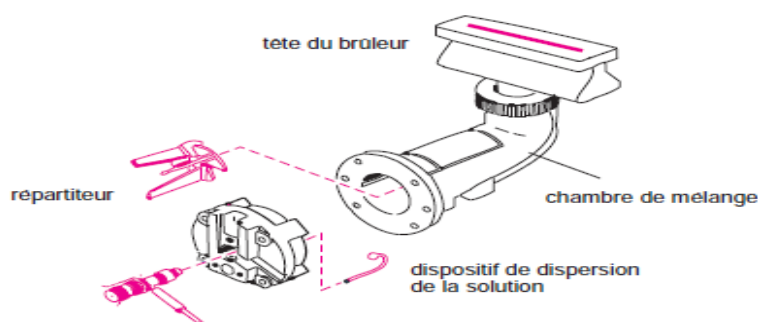
### 3.3.1 Atomiseur de flamme

Dans l'AAS flamme (SAAF), l'échantillon est préparé sous forme de liquide et nébulisé dans la flamme. La caractéristique fondamentale de cette technique est l'atomisation qui survient dans la flamme.

La flamme est le résultat d'une combustion d'un mélange de gaz (l'acétylène, le propane...) et d'un oxydant (l'oxygène, air, le protoxyde de carbone...) dans un brûleur approprié.

L'aérosol pénètre dans le brûleur puis dans la flamme. Au bout d'un certain parcours au seuil de la flamme, le solvant de la gouttelette est éliminé, il reste les sels ou particules solides qui sont alors fondus, vaporisés puis atomisés. La flamme air acétylène est la plus répandue et permet de réaliser le dosage de nombreux éléments. Sa température est de 2500°C environ.

La flamme N<sub>2</sub>O (protoxyde d'azote)/acétylène est utilisée pour certains éléments qui forment des oxydes réfractaires particulièrement solide et ne sont pas atomisés par la flamme air/acétylène [147,148].



**Figure 34 : Brûleur d'un appareil d'absorption atomique**

### 3.3.2 Atomiseur électrothermique (Four)

Après insertion de l'échantillon sur une plate-forme montée dans l'atomiseur électrothermique, une séquence de chauffage est initiée, le tube est chauffé par effet Joule. L'atomiseur électrothermique commercial le plus approprié en SAA est le four en graphite ; où l'atomisation se produit dans un four en graphite cylindrique, ouvert aux deux extrémités et qui contient un trou au centre pour la présentation des échantillons. Le procédé d'atomisation se déroule en trois étapes [148] :

1. Séchage où l'échantillon est chauffé pendant 20 à 30 s à 110 ° C afin d'évaporer les solvants ou des composant très volatile de la matrice.
2. La décomposition s'effectue à une température intermédiaire (souvent 500 ° C) pour la volatilisation des composants réfractaire de la matrice ainsi que la pyrolyse des composés organiques (les graisses et les huiles).

3. Dans l'atomisation, la puissance maximale est appliquée pour monter la température du four aussi rapidement que possible à la température d'atomisation sélectionnée. Le résidu analyte se volatilise et se dissocie en atomes libres qui absorbent la lumière de la source SAA. Sa limite de détection est de l'ordre de ppb.

### 3.4 Monochromateur

Le monochromateur, placé entre l'atomiseur et le détecteur sert à éliminer toutes les raies lumineuses dont les longueurs d'ondes ne correspondent pas à celle de l'élément. On utilise les monochromateurs à prisme et les monochromateurs à réseau.

### 3.5 Détecteur et dispositif de mesure

Le détecteur reçoit le faisceau arrivant de monochromateur. Il mesure les intensités lumineuses nécessaires au calcul des absorbances, le détecteur est donc un transformateur qui fournit un courant ou une tension à partir d'une caractéristique physicochimique.

## 4. Les interférences

Il existe des phénomènes pouvant perturber la mesure des intensités notamment la présence de particules (diffusion, turbidité), la présence d'autres constituants ayant une absorption à la longueur d'onde de travail...etc. donc conduire à des dosages inexacts. En effet, ces interférences peuvent être de type spectral, chimique ou physique [149].

### 4.1 Interférences spectrales

Phénomènes ayant leur siège dans la source d'atomisation et affectant la mesure spectrale d'absorbance de l'analyte [149]:

- ❖ Par superposition de raies.
- ❖ Par la présence de bandes d'absorption moléculaire.
- ❖ Par la diffusion de la lumière incidente sur des particules solides ou liquides présentes dans l'atomiseur.

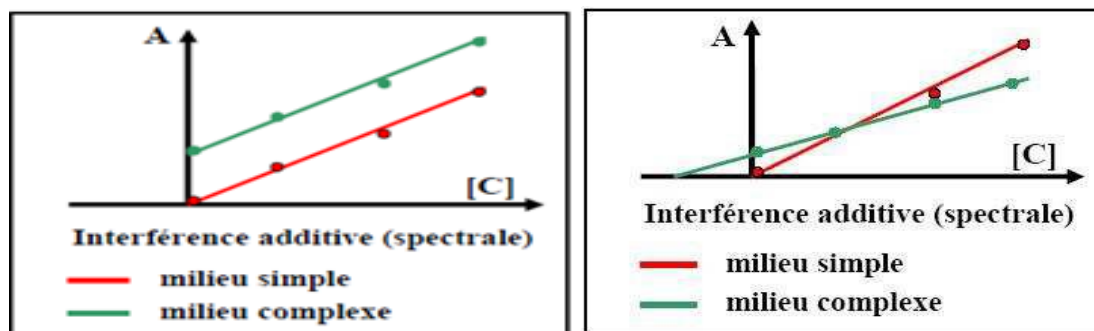


Figure 35 : des courbes représentent les différents types d'interférences spectrales

#### 4.2 Interférences chimiques

Elles résultent des modifications, dans la source d'atomisation, des processus de dissociation, d'oxydoréduction ou d'ionisation. Elles altèrent la densité de vapeur atomique ou sa vitesse de formation [149].

#### 4.3 Interférences physiques

Elles sont généralement liées aux propriétés physiques des solutions étudiées (changement de viscosité entre les étalons et les échantillons) [149].

Les interférences chimiques et physiques entraînent un changement de pente de la droite d'ajout par rapport à la droite d'étalonnage établie en milieu simple (interférences **multiplicatives**).

### 5. Avantages et limites de la méthode [150]

#### 5.1 Avantage

- La spectrométrie d'absorption atomique est une méthode très répandue, grâce à son prix faible, et compte tenu de sa polyvalence et de sa simplicité d'utilisation
- Présente une sensibilité suffisamment élevée pour la détermination des principaux métaux dans la plupart des systèmes aquatique
- Rapidité de mesures
- Grande spécificité
- Faible quantité de substance nécessaire (1ml de la solution peut suffire)
- Bonne précision relative
- Excellente limite de détection

## 5.2 Limite

- Elle nécessite pour chaque élément à doser une source lumineuse caractéristique.
- Technique d'analyse destructrice.
- Elle permet de doser seulement quelques éléments à des concentrations de l'ordre du mg/l (Ag, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn).
- La durée de passage de l'échantillon dans la flamme est très courte ou seule une fraction de celui-ci est atomisée, ce qui limite la sensibilité de la méthode.
- Nécessite des gaz inflammables.
- L'opération sans surveillance n'est pas possible à cause des gaz inflammables
- Ne doit pas contenir de quantités excessives de sels dissous.

**1. La solution tampon acétate (PH=4,6):**

Dans une fiole jaugée à 100 ml, on introduit [151] :

- ❖ 24,5 ml d'acétate de sodium 0,2M (16,4g de  $C_2H_3O_2Na$  dans 1L d'eau distillée);
- ❖ 25,5 ml d'acide acétique 0,2 M (11,5 ml dans 1L d'eau distillée);
- ❖ ajouter 50 ml d'eau pure.
- ❖ On mesure le pH de la solution avec un pH mètre, (le tampon doit être ajusté goutte à goutte avec une solution de HCl 0.1 M ou une solution de NaOH 0.1 M selon les variations de pH jusqu'au pH = 4,6.

**2. La solution d'APDC à 0,30% :**

- ❖ peser 300 mg d'APDC, l'introduire dans une fiole de 100ml
- ❖ dissoudre dans 10 ml d'éthanol  $\rightleftharpoons$  agiter pendant 2 min.
- ❖ compléter jusqu'au trait de jauge avec l'eau distillée.
- ❖ laisser sur agitateur magnétique à T= 50°C pendant 10 min.
- ❖ filtrer.

**3. La solution phénolique à 5% :**

- ❖ peser 05 g de phénol, l'introduire dans une fiole de 100ml ;
- ❖ compléter avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
- ❖ chauffer modérément pour dissoudre.

**4. La solution méthanolique acidifiée :**

- ❖ pipeter 640 $\mu$ l d' $HNO_3$  (60%), l'introduire dans une fiole de 100ml ;
- ❖ compléter avec du méthanol jusqu'au trait de jauge.

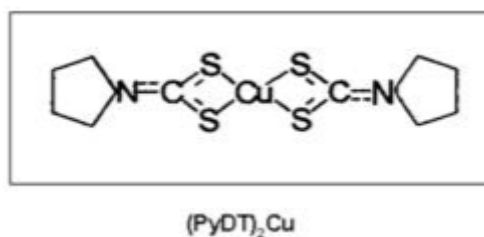
**5. La solution d'eau acidifiée à 0,5% :**

- ❖ introduire dans une fiole de 500ml, 2.5 ml d'acide nitrique (60%).
- ❖ on complète avec de l'eau pure jusqu'au trait de jauge.

**6. La solution acidifiée pour lavage à 5% :**

- ❖ introduire dans une fiole de 2L, 100ml d'acide nitrique (60%).
- ❖ On complète avec de l'eau pure jusqu'au trait de jauge.

df	Valeurs critiques du t de Student						
	Uni Bi	.10 .20	.05 .10	.025 .05	.01 .02	.005 .01	.0005 .001
1		3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	636.62
2		1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3		1.683	2.353	3.182	4.541	5.841	12.941
4		1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5		1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.859
6		1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7		1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.405
8		1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9		1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10		1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11		1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12		1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13		1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14		1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15		1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16		1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17		1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18		1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19		1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20		1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21		1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22		1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23		1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24		1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25		1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26		1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27		1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28		1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29		1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30		1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
35		1.31	1.69	2.030	2.438	2.724	3.591
40		1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551
45		1.301	1.679	2.014	2.412	2.69	3.520
50		1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.496
55		1.297	1.673	2.004	2.396	2.668	3.476
60		1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.460
65		1.295	1.669	1.997	2.385	2.654	3.447
70		1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.435
75		1.293	1.665	1.992	2.377	2.643	3.425
80		1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.416
85		1.292	1.663	1.988	2.371	2.635	3.409
90		1.291	.662	1.987	2.368	2.632	3.402
95		1.291	1.661	1.985	2.366	2.629	3.396
100		1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.390
120		1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.373
Inf		1.282	1.645	1.960	2.236	2.576	3.291
Uni Bi	.10 .20	.05 .10	.025 .05	.01 .02	.005 .01	.0005 .001	

**Propriétés du complexe cuivre(II)- Pyrrolidinedithiocarbamate**

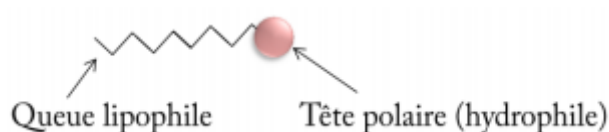
**Figure 36 : Formule chimique du complexe cuivre- Pyrrolidine dithiocarbamate**

Le complexe cuivre(II) –Pyrrolidinedithiocarbamate est de formule suivante [Cu (PDTC) 2], les complexes métalliques de dithiocarbamate ont été largement étudiés ces dernières années en raison de leur large éventail d'applications en agriculture comme pesticides, en médecine, en industrie comme accélérateurs de vulcanisation et en chimie analytique et organique.

l'extraction du cuivre par ce chélateur se fait en milieu acide, deux molécules du PDTC pour un atome du cuivre, ce complexe est stable jusqu'à une température de 139°, Dans l'intervalle de température de 139 à 770 C, la pyrolyse de l'échantillon en oxyde de cuivre a lieu, entraînant la perte de deux ligands PDTC [152,153].

## 1. Définition de tensioactif

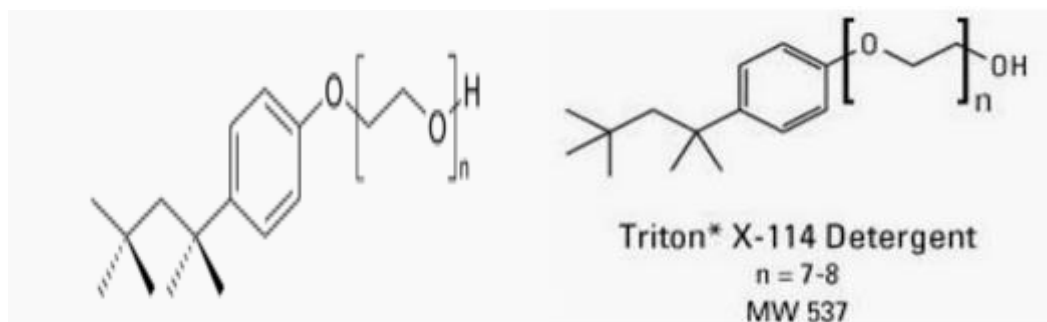
Les tensioactifs aussi appelés surfactants sont des composés qui diminuent la tension de surface du milieu dans lequel ils sont dissous et/ou la tension interfaciale entre ces deux milieux. Ce sont des molécules constituées de deux parties de polarité différentes : l'une lipophile qui retient les matières grasses, appelée queue, l'autre hydrophile, appelée tête. La représentation la plus utilisée d'une molécule de tensioactif est donnée sur la figure ci-dessous. Représentation schématique d'une molécule de tensioactif



## 2. Le Triton X-100

Est un détergent de synthèse de formule brute  $C_8H_{17}C_6H_4(OC_2H_4)_{9-10}OH$ .

Il est utilisé en biologie cellulaire et moléculaire pour perméabiliser les membranes cytoplasmiques, nucléaires, etc. Ceci permet par exemple aux anticorps d'avoir accès au noyau de la cellule lors de la réalisation d'une immunocytochimie [154].

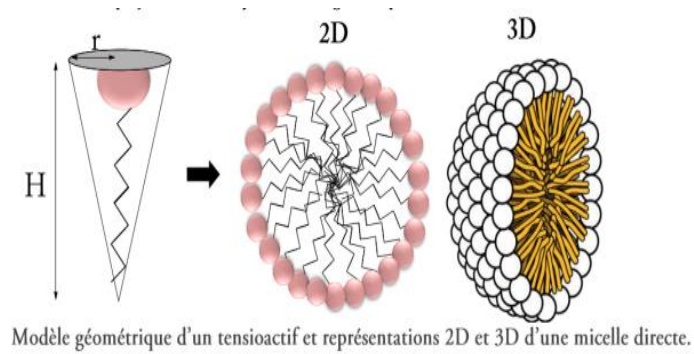


**Figure 37 Présentation de formule chimique de triton X-100 vs triton X 114**

Les deux détergents sont structurellement très similaires, mais Triton X114 a un groupe de tête en polyoxyéthylène plus court que X100 (7-8 vs 9-10 unités). En conséquence, il a une concentration micellaire critique plus élevée (350 vs 50  $\mu M$ ) et un point de trouble plus bas (22 vs 65 ° C). Les deux sont des fluides visqueux, leur manipulation est assez similaire. Les deux peuvent former des peroxydes, ils doivent donc être stockés hermétiquement fermés, frais et protégés de la lumière [154].

### 3. Formation de micelles

En solution aqueuse, au-delà d'une certaine concentration en tensioactifs (appelée concentration micellaire critique), ces derniers peuvent s'organiser pour former des micelles [154].



**Figure 38 : Modèles géométriques d'un tensioactif et representation de micelles**

### **Résumé :**

Dans ce présent travail, une méthode analytique pour le dosage du cuivre urinaire a été mise au point dans le but d'instaurer le diagnostic biologique de la maladie de Wilson au niveau du CHU de Tizi-Ouzou.

La spectrométrie d'absorption atomique flamme a été utilisée après avoir pratiqué un procédé de préconcentration dit extraction en nuage de point. Un protocole de validation SFSTP 2003-2006 basée sur le profil d'exactitude plus précisément le protocole V5 a été suivi.

La présence d'un effet matrice a été démontrée dans une étape de prévalidation.

Après calculs des paramètres statistiques de validation, on a conclu que cette méthode est juste (6.12%), fidèle (7.82%) et répétable (8.5%), elle est donc valide dans l'intervalle de dosage choisi [0.02 – 0.5] ppm et dans la limite des conditions fixées (20%). Cette méthode de dosage est désormais prête pour être utilisée en routine.

**Mots clé : maladie de Wilson, cuivre urinaire, SAAF, validation, profil d'exactitude.**

### **Abstract:**

In this present study, an analytical procedure for measuring the amount of urinary copper has been devised in order to establish the biological diagnosis of the Wilson's disease at the CHU of Tizi-Ouzou.

Flame atomic absorption spectroscopy was used after performing a pre-concentration process, called the Cloud Point Extraction. A 'SFSTP 2003-2006 validation protocol based on accuracy profile, specifically V5 protocol, was followed.

The presence of a matrix effect was demonstrated in a pre-validation step.

After computing the statistical validation parameters, we concluded that the method is accurate (6.12%), precise (7.82%) and repeatable (8.5%). Therefore, it is valid within the calibration range and within the limits of the conditions set (20%), and this method is ready to be employed routinely.

**Keywords: Wilson's disease, urinary copper, FAAS, validation, accuracy profile.**