

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique
Université Mouloud Mammeri
Faculté de Médecine
Département de pharmacie
Tizi-Ouzou



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة مولود معمري
كلية الطب
قسم الصيدلة
تيزي وزو

†.ΘΛ.Πξ†ΠΣ∶∩∶Λ.†ΓΗ.Γ∶Ο

N° D'ordre :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté sous forme d'article et soutenu publiquement en vue de
l'obtention du diplôme de docteur en Pharmacie

Le : 24/06/2024

Sous le Thème

**Développement, optimisation et validation d'une
méthode de dosage du Tryptophane dans le plasma
humain par HPLC – fluorimétrie selon les
recommandations de l'ICH M10**

Réalisé par :

DJEBLI Imane

HARIECHE Akila

HARIECHE Dhya

Encadrés par :

Dr. BEN SI SAID Hassan

Co-encadré par :

Dr. CHEKROUN Tassadit

Membres du jury :

Pr. MAMOU Marzouk

Professeur en Chimie analytique

Président du Jury

Dr. BELKAID Nawal

MAHU en Biochimie

Examinatrice

Développement, optimisation et validation d'une méthode de dosage du Tryptophane dans le plasma humain par HPLC-Fluorimétrie selon les recommandations de l'ICH M10.

Development, optimization and validation of a method for the determination of Tryptophan in human plasma by HPLC-Fluorimetry according to ICH M10 recommendations.

BEN SI SAID Hassan, HARIRECHE Akila, HARIRECHE Dhya, DJEBLI Imane, CHEKROUNT Assadit

Laboratoire de chimie analytique, Département de pharmacie, Faculté de médecine, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie, 2024.

MOTS CLES

Tryptophane, validation, HPLC, Spectrofluorimétrie, Dosage, Plasma humain.

RESUME

Le présent travail mené au laboratoire de chimie analytique de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou s'inscrit dans le domaine de la validation analytique. Il décrit le développement, l'optimisation et la validation d'une méthode de dosage du tryptophane dans le plasma humain par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrofluorimétrie, en accord avec les directives de l'ICH M10. L'optimisation des conditions opératoires, y compris le choix de la colonne chromatographique, du détecteur et de la phase mobile, a été essentielle pour garantir une séparation efficace du tryptophane des autres substances endogènes présentes dans le plasma. Les différents critères de validation, telles que la spécificité/sélectivité, l'effet matrice, la limite de quantification et l'intégrité de dilution, ont été soigneusement évalués. Les résultats ont démontré une bonne spécificité/sélectivité, une récupération élevée du tryptophane après soustraction de sa quantité endogène, une absence d'un effet matrice significatif et une limite de quantification assez basse et satisfaisante. En conclusion, cette méthode novatrice offre une analyse juste, précise, spécifique et rapide du tryptophane plasmatique sur un intervalle de dosage allant de 2 à 120 $\mu\text{mol/L}$, ouvrant de nouvelles perspectives pour la recherche et la pratique clinique en bioanalyse.

KEYWORDS

Tryptophan, Validation, HPLC, Spectrofluorimetry, Determination, Human plasma.

ABSTRACT

The present work, carried out at the Analytical Chemistry Laboratory of the Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, falls within the field of analytical validation. It describes the development, optimization and validation of a method for the determination of tryptophan in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with spectrofluorimetric detection, in accordance with ICH M10 guidelines. Optimization of the operating conditions, including choice of chromatographic column, detector and mobile phase, was essential to ensure effective separation of tryptophan from other endogenous substances present in plasma. The various validation criteria, such as specificity/selectivity, matrix effect, limit of quantification and dilution integrity, were carefully evaluated. The results demonstrated good specificity/selectivity, high tryptophan recovery after subtraction of its endogenous amount, absence of a significant matrix effect and a satisfactorily low limit of quantification. In conclusion, this innovative method offers a fair, precise, specific and rapid analysis of plasma tryptophan over an assay range from 2 to 120 $\mu\text{mol/L}$, opening up new prospects for bioanalytical research and clinical practice.

I. Introduction

Le tryptophane(Trp) est un acide aminé essentiel (figure 1), apporté exclusivement par l'alimentation. C'est un élément clé de la synthèse des protéines(1). Il circule dans le sang sous forme liée à l'albumine et seulement 10 à 20% sont libres dans le plasma avec un taux normal entre 40 et 80 $\mu\text{mol/L}$ (2). C'est un précurseur de la sérotonine, la niacine(VitamineB3), l'acide kynurénique et d'autres substances bioactives qui sont essentiels au maintien de la fonction neurologique, de l'immunité et de l'homéostasie du corps humain(3).

Les rôles physiologiques du tryptophane découlent des 3 voies métaboliques que suit cet acide aminé aromatique :

La voie des kynurenines (KYN) représente 98% du catabolisme du tryptophane, conduit à la synthèse du nicotinamide ; précurseur des coenzymes NAD et NADP. Le Trp est transformé en kynurénine(Kyn) par le biais de la tryptophane 2,3- dioxygénase (TDO), et par l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Cette dernière est une enzyme fortement induite par d'interféron gamma et par d'autres signaux pro-inflammatoires par conséquent, son activité peut varier avec le statut inflammatoire(4).

Cette voie aboutit à la synthèse de différentes molécules, telles la Kyn, l'acide kynurénique (AK), l'acide anthranilique (AA) et le 3-hydroxyanthranilique (3HA), ce dernier donne naissance à l'acide quinolinique précurseur du nicotinamide(5, 6).

En effet, les déséquilibres de cette voie ont été associés à plusieurs pathologies notamment les maladies cardiovasculaires(7). Le ratio Kyn / Trp se

trouve augmenté chez les personnes atteintes d'athérosclérose(8) et chez les personnes obèses(9). On décrit une relation entre cette voie et la cancérogenèse suite à l'activation par certaines KYN (Kyn et l'AK) du récepteur au aryls hydrocarbure connu pour son activité pro tumorigène(10). Cette voie est également impliquée dans la dépression, la maladie de Parkinson, l'Alzheimer, la schizophrénie, l'autisme, l'AVC, maladie d'Huntington(11). Ces métabolites agissent comme des médiateurs immunosuppresseurs en inhibant l'activité des lymphocytes T (12).

La voie de la sérotonine est quantitativement moins importante (environ 2% du Trp). La sérotonine est synthétisée à partir du Trp qui subit l'action de la tryptophane hydroxylase pour donner le L-5-hydroxytryptophane. Ce dernier est décarboxylé par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) aboutissant à la sérotonine(3) communément appelée l'hormone de bonheur qui est un neuro médiateur impliqué dans de nombreuses maladies psychiatriques telles la dépression(13), l'anxiété(14), l'agressivité(15). Les dysfonctionnements du système sérotoninergique sont également impliqués dans l'hypertension pulmonaire, la migraine, la genèse des arythmies cardiaques, les syndromes fibrotiques et certains symptômes du syndrome carcinoïde(16). Il a également été prouvé qu'une carence en tryptophane altère la synthèse de cette hormone dans le cerveau(3). Elle est aussi un précurseur de la mélatonine ; hormone régulatrice de sommeil et de l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA)(17) ; un biomarqueur des tumeurs endocrines(18).

Enfin une voie mineure existe, c'est la voie des indoles où le Trp est dégradé par le microbiote intestinal en dérivé indolique(17).

Quant aux processus pathologiques dans lesquels le Trp est impliqué, on décrit une maladie héréditaire du métabolisme (*MHM*) du Trp qui est la maladie de Hartnup caractérisée par une anomalie des transporteurs rénaux et intestinaux des acides aminés neutres *BOATI* qui normalement absorbent le Trp vers la circulation sanguine, cette anomalie entraîne une augmentation du tryptophane dans les urines et une diminution dans le sang où il se trouve essentiel pour la synthèse de la niacine. Au final la clinique du syndrome est liée à un déficit en niacine et se caractérise par des rashes cutanés rouges au niveau des parties découvertes dont l'aspect est identique à ceux du pellagre classique, troubles neurologiques (perte d'équilibre, strabisme, sensibilité à la lumière) parfois des troubles psychiques et un retard mental. Le traitement consiste en une supplémentation en vitamine B3(19).

Des études cliniques prouvent qu'une modification des taux du Trp affectent l'humeur. D'autres études contrôlées par placebo ont démontré son intérêt à potentialiser l'effet antidépresseur des IMAO et que l'apport en Trp présenterait des effets équivalents à ceux de l'amitryptiline. D'autres études ont montré que sacarence peut induire des changements anxieux et dépressifs chez les humains, De plus des troubles de l'humeur post-partum ont été associés à de faibles concentrations plasmatiques en Trp(3).

Le dosage plasmatique du tryptophane permet d'évaluer l'état nutritionnel, en

particulier dans les cas de malnutrition, et de diagnostiquer des troubles métaboliques comme le syndrome de Hartnup ou la pellagre. Il aide également à comprendre les troubles de l'humeur et du sommeil, Utilisé pour le suivi thérapeutique, il permet de surveiller l'efficacité des traitements impliquant des suppléments de tryptophane ou des interventions diététiques. Enfin, il constitue un outil précieux dans la recherche clinique et biomédicale.

Compte tenu des implications significatives du Trp dans les troubles neurologiques, psychiatriques et métaboliques, et vu l'absence d'une méthode validée et adaptée dans notre région permettant son dosage plasmatique, nous avons cherché à développer et valider conformément au guide de l'ICH M10 pour les matrices biologiques(20), une méthode de dosage de cet acide aminé par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par spectrofluorimétrie. Notre approche vise à pallier les lacunes rencontrées avec les méthodes existantes en termes de sensibilité, spécificité ou rapidité d'exécution probablement dues aux propriétés physicochimiques du tryptophane et à sa faible concentration plasmatique ; En proposant une méthode novatrice qui va garantir la précision et la fiabilité requise pour un tel dosage biologique.

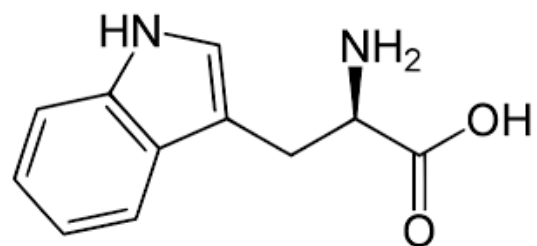


Figure 1: Structure du Tryptophane.

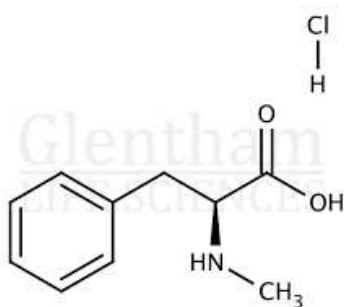


Figure 2: Structure de l'étalon interne (N-méthyl-L-phenylalaninehydrochloride).

II. Matériel et méthode

II.1 Réactifs et matériels

La substance standard utilisée est le DL-Tryptophan fournie par le laboratoire *RIEDEL DE HAEN AG SEELZE-HANNOVER*. L'étalon interne (EI) (N-méthyl-L-phenylalaninehydrochloride) (figure 2), l'hydrogénophosphate dipotassique (K_2HPO_4) et l'acide perchlorique sont fournis par *SIGMA-ALDRICH*. Le dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) provient de *FLUKA* et l'acétonitrile (ACN) de *HONEYWELL*.

II.2 Optimisation des conditions opératoires

Une optimisation des conditions chromatographiques est nécessaire avant de valider toute méthode d'analyse.

Deux colonnes chromatographiques (C8 et C18) ont été testées pour leurs capacités à séparer efficacement le pic du Trp de ceux des substances endogènes présentes dans le plasma humain, une colonne C18 a été choisie pour sa bonne résolution et efficacité.

En vue de déterminer la méthode de détection la plus adéquate, un détecteur

UV-Visible a été initialement utilisé. Cependant, le pic obtenu était peu intense et présentait une traînée importante. Cela nous a conduit à employer un détecteur par spectrofluorimétrie qui a permis de détecter des concentrations plus faibles de Trp et d'obtenir un pic meilleur.

La phase mobile est constituée d'un mélange de tampon et de solvant organique. Plusieurs compositions ont été testées notamment un mélange de tampon acétate/acétonitrile, tampon phosphate/méthanol etc. Finalement un mélange de tampon phosphate et d'acétonitrile a abouti à une rétention optimale du tryptophane sans compromettre la symétrie du pic.

Par la suite, afin d'améliorer la séparation et l'allure du chromatogramme, plusieurs paramètres ont été optimisés à savoir : le pH de la phase mobile (4, 5.2, 6.4 et 7), la proportion en acétonitrile (3, 5, 7, 10 et 15% v/v), le volume d'injection (10 et 20 μ l), ainsi que le débit (0.8, 1, 1.2 et 1.5 ml/min).

Enfin, pour éliminer les composés du plasma potentiellement interférents, 3 procédés de déprotéinisation sont réalisés ; en modifiant le pH par traitement de l'échantillon par un acide fort (Acide tétrachloroacétique, Acide perchlorique) ou une base forte (NaOH), en modifiant la force ionique par l'ajout d'une solution saline saturée de sulfate d'ammonium et enfin en agissant sur la constante diélectrique par l'ajout d'ACN.

Les conditions ayant permis d'obtenir le meilleur résultat en termes d'étroitesse, de symétrie et de résolution des pics sont ci-après.

II.3 Conditions chromatographiques

L'analyse quantitative a été réalisé sur un système *HPLC LC20* équipé d'une colonne *Shimadzu C18*(250 x 4.6, 5µm) maintenue à une température de 30°C. Ce système est couplé à un détecteur par fluorimétrie *Shimadzu RF-10Ax1*. La phase mobile est composée d'un mélange de tampon phosphate (pH 5.2, 0.015M), et d'acétonitrile (93:7 ; v/v) ; éluée selon un mode isocratique. Les échantillons ont été injectés par un autosamplersil-20ax avec un volume 10 µl et un débit de 1.5 ml/min assuré par une pompe lc-20 at. Le temps d'analyse était de 10 min et le détecteur a été programmé pour changer automatiquement les longueurs d'ondes après 7 min d'analyse. Pour l'EI la détection se fait à $\lambda_{ex}=210$ nm $\lambda_{em}=302$ nm, et pour le Trp à $\lambda_{ex}=280$ nm $\lambda_{em}=350$ nm. Toutes les données ont été traitées à l'aide du logiciel *Shimadzu LC solution*.

II.4 Préparation des solutions

La solution de précipitation des protéines qui a été retenue durant l'étape d'optimisation était l'Acide perchlorique, préparée avec une concentration de 2M. La solution d'étalon interne était à 28 µmol/L.

La solution stock du Trp a été préparée à une concentration de 240 µmol/l de sorte à avoir une concentration finale après chargement de plasma de 120 µmol/l et qui va correspondre à la limite supérieure de l'intervalle de dosage (LHQ). De cette solution mère, on prépare par dilution au 3/4, 1/2, 1/4, 1/12, 1/60, cinq solutions filles. Ces solutions vont servir par la suite à la préparation des standards de validation et/ou d'étalonnage.

II.5 Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés par ajout maîtrisé de 100 µl de la solution de Trp, à 100 µl de plasma hépariné en ajoutant 50 µl d'EI puis 1750 µl d'acide perchlorique, on centrifuge à 5000 tr/min pendant 15 min, le surnageant est récupéré dans des viales puis analysé par HPLC.

Les standards sans matrices sont préparés de la même façon que ceux avec matrice en remplaçant le plasma par l'eau.

Des blancs plasma (avec EI) sont également préparés afin de soustraire la quantité endogène du Trp.

II.6 Validation de la méthode analytique

Notre méthode a été principalement validée selon les recommandations de l'ICH M10 de 2019 (matrices biologiques) en évaluant les critères suivants : sélectivité, spécificité, effet matrice, courbe d'étalonnage, justesse, fidélité, linéarité, carry-over, intégrité de dilution et stabilité. Un lot de contrôle qualité a été préparé en calculant les intervalles de conformité.

En raison de l'absence d'une matrice exempte de Trp, on a procédé à la soustraction de la quantité naturellement présente dans le plasma (Trp de base) après analyse des blancs plasma.

L'intervalle de validation qui définit les limites inférieure et supérieure de quantification (LBQ et LHQ) est fixé à [2-120] µmol/l en incluant les normes physiologiques et pathologiques ciblées. Les standards de validation sont préparés et évalués à 4 niveaux : **LBQ**, **Bas** (5 fois la LBQ), **Moyen** (50% LHQ) et **Elevé** (75%

LHQ), selon les recommandations de l'ICHM10. La méthodologie suivie pour valider chaque critère est décrite ci-dessous.

II.6.1 Spécificité/sélectivité

Ces deux paramètres évaluent la capacité de la méthode à détecter le Trp en présence des autres substances de la matrice, la différence est que la spécificité l'évalue en présence des substances apparentées (produits de dégradation, structures similaires etc.) et non pas uniquement dans la matrice vierge. En raison de la présence du tryptophane naturellement dans notre matrice, nous avons évalué la sélectivité avec une méthode empirique en comparant les chromatogrammes obtenus dans les blancs avec ceux de l'échantillon.

Le recouvrement entre les aires de pic du Trp et de l'EI dans le plasma et l'eau a été calculé pour estimer le taux de récupération et confirmer la sélectivité.

Nous avons également vérifié la spécificité empiriquement en présence de la phénylalanine (Phe) et de la tyrosine (Tyr), qui ont des structures similaires avec notre analyte.

Des standards et des blancs sont préparés dans l'eau et dans le plasma avec et sans Trp, Phe, Tyr et EI, et les chromatogrammes sont comparés avec calcul des paramètres de rétention et de la résolution.

Pour confirmer ces paramètres et s'assurer de l'absence d'une erreur systématique, une évaluation statistique a été faite par comparaison des ordonnées à l'origine des courbes avec et sans matrice entre elles, ensuite chacune à la valeur de zéro.

II.6.2 Effet matrice

Il est évalué selon les directives de l'ICH M10 en analysant six échantillons issus de plasma individuels. Tous les échantillons ont été préparés à 2 niveaux de concentration, Elevé et Bas avec 3 répétitions pour chacun. Pour compléter cette étude, nous avons analysé dans les mêmes conditions un échantillon préparé à partir d'un plasma lipémique et un autre à partir d'un plasma hémolysé afin d'évaluer l'influence de l'hémolyse et de la lipémie sur la justesse et fidélité de cette méthode. Le traitement des résultats a été fait en calculant les biais et les CV.

II.6.3 Limite de quantification

La limite de quantification est déterminée par l'analyse du Trp à une concentration C connue ($90\mu\text{mol/L}$) afin d'établir le niveau minimum auquel l'analyte peut être quantifié avec une justesse et une précision acceptable.

Cette évaluation est réalisée à l'aide de l'équation suivante (21):

$$\text{LBQ} = 10 \times h \times \frac{C}{H}$$

H : hauteur du pic d'un échantillon de Trp.

h : amplitude maximal du signal (bruit de fond) exprimée en hauteur aux alentours du temps de rétention du Trp, déterminé par analyse d'un blanc eau.

C/H : facteur de réponse.

II.6.4 Courbe d'étalonnage

Les dilutions préparées auparavant ainsi que la solution stock de Trp ont été utilisées chacune pour charger le plasma et préparer 6 échantillons aux concentrations suivantes : 120 (LHQ), 90, 60, 30, 10 et 2 (LBQ) $\mu\text{mol/l}$ ce qui nous a permis

d'obtenir une courbe d'étalonnage à 6 niveaux.

Une gamme d'étalonnage sans matrice est également préparée pour l'évaluation de la spécificité.

Pour vérifier cette courbe, la justesse (biais relatif) des prédictions inverses pour chaque niveau d'étalonnage a été calculée par rapport à la concentration nominale introduite.

II.6.5 Justesse et fidélité

La justesse et la fidélité ont été évaluées sur 3 séries (jours) indépendantes par analyse des standards de validation. 4 niveaux par série sont pris en compte : LBQ, Bas, Moyen, Elevé et pour chaque niveau de concentration, 5 répétitions ont été réalisées. À chaque jour de validation, une courbe d'étalonnage est préparée parallèlement.

La justesse est validée en calculant la différence entre la moyenne des concentrations prédites (retrouvées) et la moyenne des concentrations introduites (théoriques) et elle est exprimée sous forme de biais absolu et relatif et taux de recouvrement.

La fidélité est évaluée pour chaque niveau de concentration en calculant les écarts types et les coefficients de variation (CV) qui estiment la répétabilité (variance intrasérie) et la précision intermédiaire (somme des variances intra et inter série).

II.6.6 Linéarité des concentrations prédites

On estime la linéarité de la relation entre les concentrations prédites (x_p) et les concentrations introduites (x_i) en évaluant la fonction [$x_p = f(x_i)$]. La droite de

régression de cette fonction est obtenue à partir des moyennes des répétitions de chaque niveau de concentration des standards de validation pour les 3 séries effectuées.

II.6.7 Carry-over

Afin de chercher et maîtriser les éventuelles réponses résiduelles, Il est crucial d'évaluer et de minimiser le carry over, pour ce faire, la solution de Trp à la concentration la plus élevée (120 $\mu\text{mol/L}$) a été injectée, suivie immédiatement d'un blanc eau, enfin une analyse de la solution de Trp à la LBQ a été effectuée pour l'interprétation des résultats.

II.6.8 Intégrité de dilution

Trois échantillons de plasma de concentration supérieures à la LHQ (180, 360, et 720 $\mu\text{mol/L}$) sont préparés, puis dilués aux 1/2, 1/4, et 1/8 respectivement avec du sérum physiologique. Pour chaque dilution, cinq répétitions sont testées pour déterminer si les concentrations sont mesurées avec justesse et précision.

II.6.9 Stabilité

L'étude de stabilité est évaluée sur deux niveaux de concentrations Elevé et Bas avec 3 répétitions pour chacun, les échantillons (avec les 3 blancs matrices) sont analysés au temps zéro (référence) et après les conditions de stockage appliquées (*Tableau I*). Le biais relatif des résultats est calculé et il doit être $< 15\%$.

Une courbe d'étalonnage est réalisée à chaque jour d'évaluation.

Le choix des conditions d'évaluation est en fonction des modalités opératoires prévues pour la validation et l'utilisation de la

méthode en routine, en visant l'objectif de chaque test de stabilité.

Tableau I : Conditions appliquées pour la stabilité.

Stabilité	Conditions
Solution stock	T° ambiante à T4h et T8h
Congélation-décongélation (Freeze-thaw)	3 cycles
Court terme (Bench top matrix)	T4h, T8h et T24h à T° ambiante et à +6°C
Long terme	+6°C et -20° aux J1, J3, J7 et J14.
Echantillon préparé	Relancer un échantillon analysé préalablement à T0, T4h et T8h.

II.6.10 Contrôle de qualité

Un lot de contrôle de qualité à deux niveaux (Bas et Elevé) a été préparé à partir d'un pool de plasma et les intervalles de confiance ont été établis en analysant 34 échantillons sur 15 jours et en calculant leurs moyennes de concentrations ainsi que les écarts types.

III. Résultats et discussion

Le chromatogramme du Trp et de l'EI obtenu avec cette méthode est le suivant :

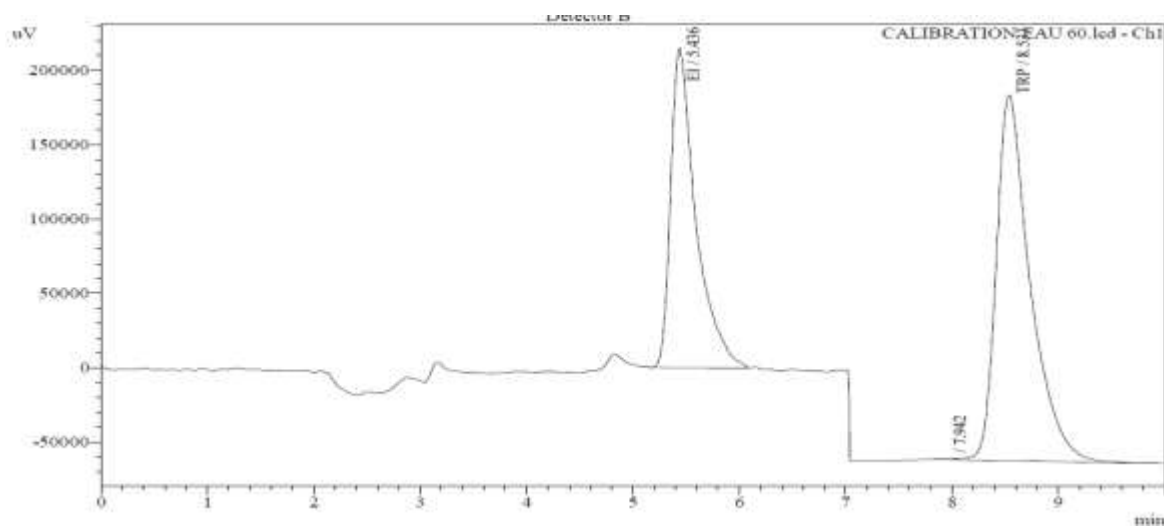


Figure 3: Chromatogramme de l'analyse du Trp par HPLC.

III.1 Spécificité/sélectivité

Les tableaux (II,III et IV) et la figure4 montrent les résultats de cette évaluation :

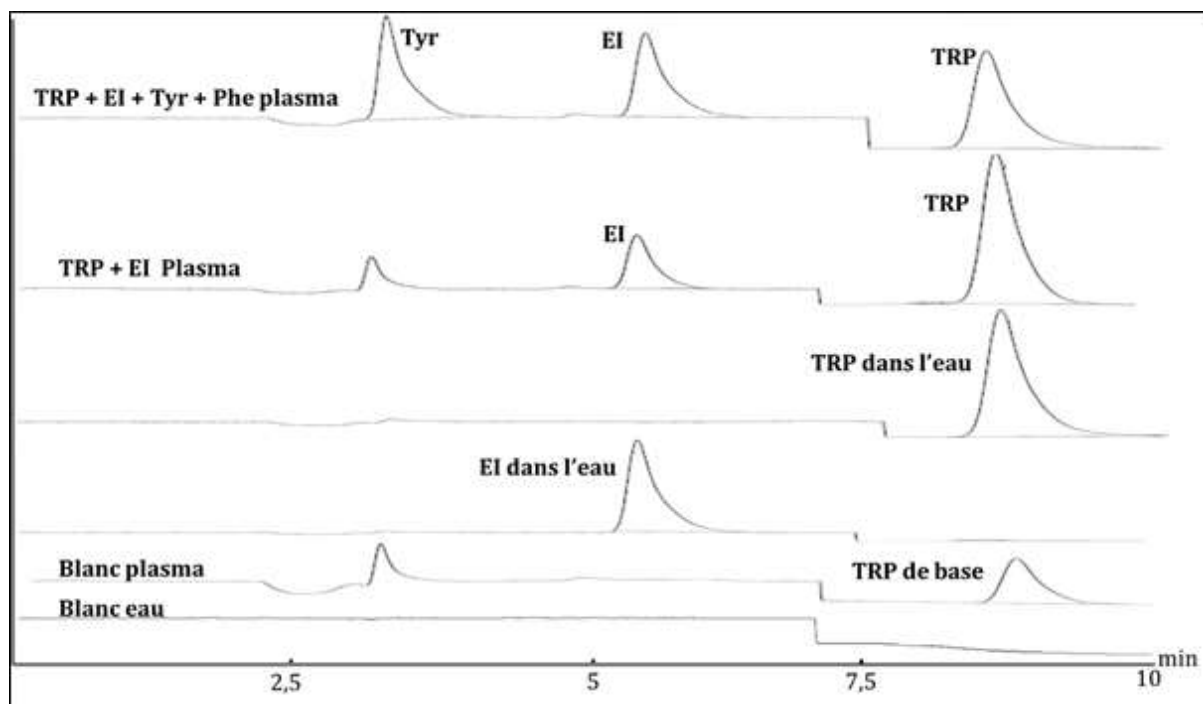


Figure 4: Evaluation empirique de la spécificité/sélectivité.

Tableau II: Recouvrement des aires de pic du Trp et de l'EI.

	<i>Trp</i>	<i>EI</i>
Aire de pic dans l'eau	13062850	3214968
Aire de pic dans le plasma	13066384	3301627
Recouvrement (%)	100,03	102,70
Spécification	100 ± 5%	100 ± 5%
Interprétation	Conforme	Conforme

Tableau III: paramètres de rétention et la résolution du Trp et de l'EI.

	Tr (min)	ω		
<i>Trp</i>	7,984	1,4	R_s (Trp/Tyr)	4,43
<i>EI</i>	5,211	1	R_s (EI/Tyr)	2,34
<i>Tyr</i>	3,106	0,8	Spécification	> 1,5
<i>Phe</i>	Absence de pic	Absence de pic	Interprétation	R_s Acceptable

Trp : Tryptophane, *EI* : étalon interne, *Tyr* : Tyrosine, *Phe* : phénylalanine, *Tr* : temps de rétention, ω : largeur à base du pic, R_s : résolution.

Tableau IV: Evaluation statistique de la spécificité/sélectivité et de l'erreur systématique.

Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 (Sans matrice)	<i>t</i> calculé	0,33	Différence non significative
	$t^{\circ}(\alpha ; 16)$	2,12	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 16)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 (Avec matrice)	<i>t</i> calculé	0,62	Différence non significative
	$t^{\circ}(\alpha ; 16)$	2,12	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 16)$	
Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression	<i>t</i> calculé	0,04	Différence non significative
	$t^{\circ}(\alpha ; 32)$	2,04	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 32)$	
Comparaison des deux pentes des deux droites de régression	<i>t</i> calculé	1,07	Différence non significative
	$t^{\circ}(\alpha ; 32)$	1,47	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 32)$	

Sur les chromatogrammes obtenus et représentés dans la *figure 4*, nous constatons l'absence des pics du Trp et de l'EI sur le blanc eau et leur présence sur les pics individuels des deux molécules dans ce diluant, ce qui identifie leur temps de rétention (*Tableau III*).

Aucun pic au temps de rétention de l'EI est obtenu sur le blanc plasma, ce qui oriente vers une bonne sélectivité de notre méthode pour l'EI. Par contre, il existe une quantité physiologique du Trp (Trp de base) dans la matrice utilisée qui nous a empêché d'évaluer la sélectivité d'une manière certaine avec la méthode proposée par l'ICH.

Après chargement du plasma avec le Trp et l'EI (*Figure 4*) nous constatons

l'augmentation de l'aire du pic du Trp par rapport au pic de base.

Le recouvrement calculé pour les deux molécules après soustraction du Trp de base est de 100,03% et 102,7% respectivement (*Tableau II*) indiquant ainsi une bonne récupération et une bonne sélectivité.

La spécificité en présence de la Phe et la Tyr a été prouvée avec les résultats de la résolution entre le Trp ou l'EI et la Tyr (*Tableau III*) qui sont très satisfaisants, quant à la Phe il n'y a pas de pic qui a été détecté, indiquant l'absence d'interférences dues aux analytes similaires ou aux produits de dégradation.

Les résultats de l'évaluation statistique (*Tableau IV*) ont confirmé la

spécificité/sélectivité de la méthode ainsi que l'absence de l'erreur systématique et la comparaison des deux pentes entre elles confirment l'absence d'un effet matrice.

III.2 Effet matrice

Le CV (%) des six matrices différentes ainsi que ceux des plasma lipémique et hémolysé sont inférieurs à 15% dans toutes les sources matricielles individuelles et les résultats n'ont montré aucun effet matrice sur la répétabilité des résultats.

Le biais (%) est compris dans l'intervalle de $\pm 15\%$ de la concentration nominale dans toutes les matrices (absence d'effet matrice) sauf pour le niveau Bas du plasma lipémique, donc le dosage du tryptophane est déconseillé chez les patients qui ont un bilan lipidique perturbé (*Tableau VI*).

III.3 Limite de quantification

Les résultats de l'amplitude maximale du bruit de fond ainsi que la hauteur du pic du Trp à 90 $\mu\text{mol/l}$ sont représentés dans le *tableau V*.

Tableau V: Evaluation de la limite de quantification

Concentration nominale ($\mu\text{mol/L}$)	90
H	188161
h	257
LBQ ($\mu\text{mol/L}$)	1,23

La limite de quantification calculée est de 1,23 $\mu\text{mol/L}$ (≈ 2), ce qui représente une valeur assez basse. Cette faible limite de quantification est un avantage significatif, car elle permet de quantifier avec exactitude des concentrations faibles en Trp. Cela permet d'obtenir des résultats fiables même dans des échantillons où l'analyte est présent en faibles quantités.

III.4 Courbe d'étalonnage

Durant les 3 jours de validations les courbes d'étalonnages obtenues ainsi que leurs paramètres de régression sont représentés sur la *figure 5*.

La fonction $y = bx + a$ a été choisie comme modèle d'étalonnage pour sa simplicité et ses résultats satisfaisants.

Les résultats de vérification de la courbe d'étalonnage sont présentés dans le *tableau VII*. Le Taux des résultats conforme est $> 75\%$ ce qui approuve la conformité de la courbe d'étalonnage selon l'ICH M10.

III.5 Justesse

Les résultats sont présentés dans le *tableau VIII*.

Selon l'ICH M10 notre méthode est juste puisque le biais relatif des niveaux Bas, moyen et Elevé est $< 15\%$ et celui de la LBQ est $< 20\%$ avec des taux de recouvrement inclus dans l'intervalle de $100\% \pm 20\%$ et $100\% \pm 15\%$ pour le niveau de LBQ et les autres niveaux respectivement.

Tableau VI: Evaluation de l'effet matrice

		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M hémo	M lip
Bas	Justesse (biais %)	10,7	-11,1	9,3	10,9	-5,7	-13,2	5,4	18,8*
	Fidélité (CV%)	10,0	12,8	11,6	7,8	10,6	6,8	10,5	14,6
Elevé	Justesse (biais %)	0,54	4,9	3,1	7,7	6,7	3,1	4,9	6,9
	Fidélité (CV%)	2,59	3,6	3,4	0,9	4,8	4,1	3,3	5,2

M : matrice, *M hémo* : matrice hémolyse, *M lip* : matrice lipémique

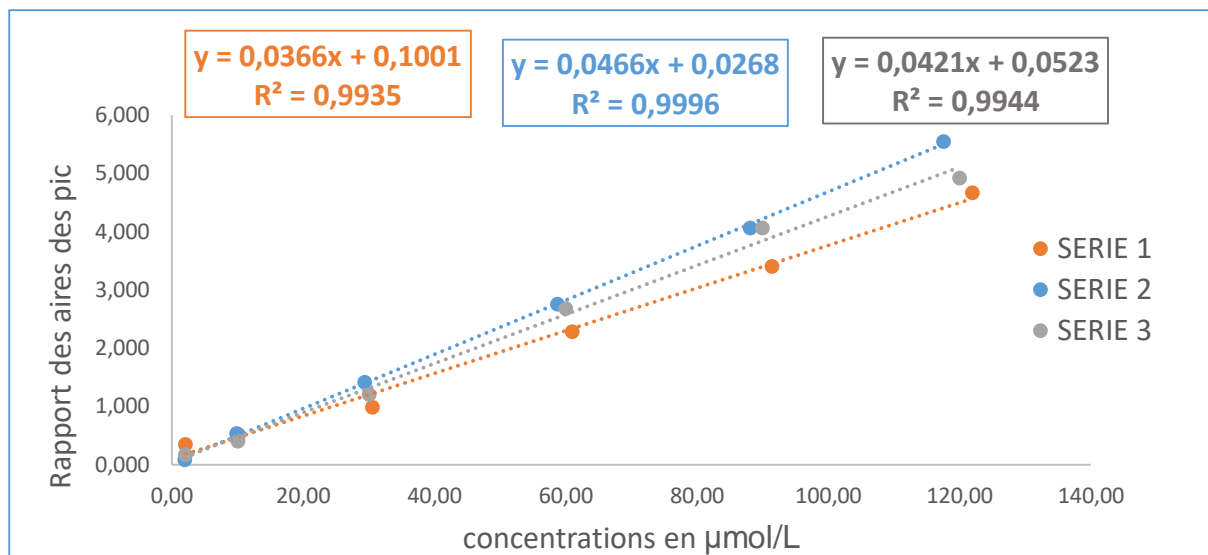


Figure 5: courbe d'étalonnage du Trp dans le plasma

Tableau VII: Vérification de la validité de la courbe d'étalonnage selon l'ICH M10.

Niveaux ($\mu\text{mol/L}$)	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Spécification
	Justesse (%)	Justesse (%)	Justesse (%)	
2	225,84*	-38,24*	39,92*	< 20
10	11,88	10,23	-15,69*	< 15
30	-10,70	1,26	-8,33	< 15
60	-1,91	-0,41	4,10	< 15
90	-1,34	-1,55	5,77	< 15
120	2,38	0,83	-3,65	< 15
Taux des résultats conformes			77,78%	

Tableau VIII: Evaluation de la justesse.

Niveaux de Concentrations ($\mu\text{mol/L}$)	2	10	60	90
Concentration moyenne théorique ($\mu\text{mol/L}$)	2,02	10,09	60,53	90,8
Concentration moyenne retrouvé	1,69	11,42	59,48	90,26
Biais absolu	-0,33	1,34	-1,05	-0,53
Biais relatif (%)	-16,10	13,23	-1,73	-0,59
Taux de recouvrement	83,90	113,23	98,27	99,41

III.6 Fidélité

Les résultats sont résumés dans le *tableau IX* :

Tableau IX: Evaluation de la fidélité

CV_{Fi} (%)	19,3	10,6	6,9	9,0
CV_{rép} (%)	19,3	9,9	5,5	5,2

Selon l'ICH M10 dans une matrice biologique, la méthode est fidèle si le CV de répétabilité et le CV de la fidélité intermédiaire sont tous les deux inférieurs à 15% pour tous les niveaux sauf pour la LBQ où ils devraient être inférieurs à 20%. Nos résultats sont conformes à ces limites ce qui témoigne de la bonne précision de cette méthode.

III.7 Linéarité des concentrations prédites

L'étude de la linéarité se fait sur la droite de régression obtenue (*figure6*). Celle-ci est soumise à une analyse statistique en comparant la pente à la valeur de référence 1 et l'ordonnée à l'origine à la valeur de référence 0 en appliquant le test de *Student*(TableauX).

Les paramètres de la régression (*Figure 6*) ainsi que les résultats du test de *Student* sont satisfaisants, par conséquent, la méthode est linéaire, ce qui signifie qu'il existe une bonne corrélation (supérieure à 99%) entre la concentration introduite et prédite.

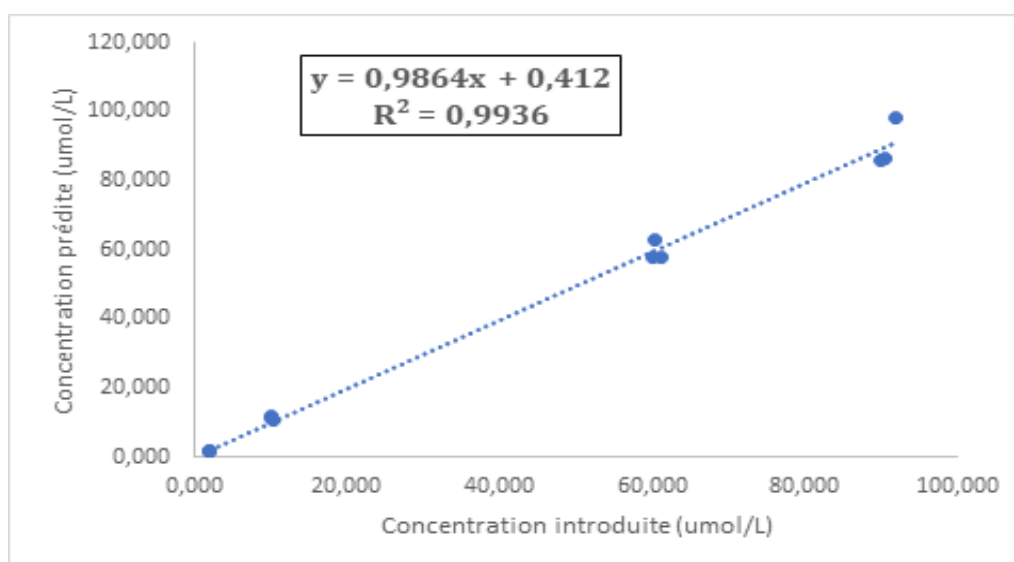


Figure 6: courbe des concentrations prédites en fonction de celles introduites

Tableau X: évaluation statistique de la linéarité

Comparaison de la pente avec 1	t calculé	0,54	Différence non significative
	t°(α ; 10)	2,23	
	Condition	t calculé < t°(α ; 10)	
Comparaison de l'ordonnées à l'origine avec 0	t calculé	0,32	Différence non significative
	t°(α ; 10)	2,23	
	Condition	t calculé < t°(α ; 10)	

III.8 Carry-over

Les résultats de cette évaluation sont montrés dans le *tableau XI*.

	EI	Analyte
LBQ (aire)	3616696	2501065
Blanc (aire)	0	42483
Temps de rétention	5,29	8.057
Ratio (%)	0,00	1,70

Tableau XI: Evaluation du carry-over.

On a calculé les aires de pics de l'EI et du Trp puis le ratio comme suit

$$\text{Ratio} = \frac{\text{aire du pic du blanc}}{\text{aire du pic (EI ou Trp)}} \times 100$$

Le ratio est inférieur à 5% pour l'EI et inférieur à 15% pour l'analyte. Nous pouvons donc affirmer que notre méthode de dosage est exempte d'effet carry-over. Par conséquent, les concentrations mesurées ne sont pas influencées par les analyses précédentes.

III.9 Intégrité de dilution

Nous avons calculé les concentrations des 5 répétitions pour chaque niveau de dilution ainsi que le biais et le coefficient de variation (CV) puis les avons comparés à la concentration nominale, l'intervalle de conformité est fixé à 90 µmol/L ±15% (*Tableau XII*).

On remarque que les valeurs des biais et des CV sont toutes inférieures à 15% pour les trois niveaux de dilution.

Ces résultats confirment que la dilution n'affecte pas les concentrations du Trp déterminées par notre méthode de dosage. Par conséquent, lors des analyses de

routine, si les concentrations dépassent la limite supérieure de l'intervalle de dosage, une dilution peut être effectuée.

III.10 Stabilité

Les valeurs des biais relatifs calculés lors de l'étude de la stabilité sont représentées dans le *tableau XIII*.

L'objectif pour la solution stock c'était d'estimer sa stabilité durant son utilisation pour effectuer la validation. Les solutions stock sont préparées instantanément pour chaque jour de validation c'est pour cela que l'évaluation n'a été effectuée que pendant une journée et à température ambiante. La solution stock s'est avérée stable dans ses conditions d'utilisation ce qui confirme la fiabilité de nos résultats de validation.

La stabilité de l'échantillon préparé a été aussi estimée pendant une journée (avec deux temps) et à température ambiante vu que la finalité c'était de s'assurer de la fiabilité des résultats en cas de réinjection de la même vial. Les biais sont dans les normes ce qui signifie qu'on peut réanalyser les échantillons pendant toute une journée.

Concernant la stabilité à court terme, on a pu démontrer qu'elle est satisfaisante pendant une journée à deux températures ce qui permet de manipuler plus aisément la conservation des échantillons reçus pendant le jour de l'analyse.

Afin de définir des modalités pour la conservation des échantillons à long terme, une étude a été effectuée sur 14 jours avec deux températures. Les échantillons sont stables entre 2 – 8°C pendant la durée de stockage, tandis qu'il y a quelques valeurs qui sortent légèrement des limites pour les

échantillons congelés, surtout pour le niveau Bas, indiquant d'éventuelle instabilité à la décongélation ou probablement une erreur de manipulation.

Ses résultats sont confirmés par l'évaluation des cycles de congélation – décongélation ce qui nous laisse préconiser de ne pas congeler les échantillons ou de manipuler avec précaution si c'est nécessaire.

III.11 Contrôle de qualité

Nous pouvons utiliser ce lot de contrôles comme référence pour les dosages de

routine. Cela permettra de vérifier la précision et la fiabilité des résultats ultérieurs.

Tableau XIV : intervalles du Lot 01 des contrôles de qualité.

	Bas	Elevé
Moyenne	8,29	89,05
Ecart type (σ)	0,89	4,75
Intervalle	8,29 \pm 1σ, 2σ, 3σ	89,05 \pm 1σ, 2σ, 3σ

Tableau XIV: Evaluation de l'intégrité de dilution.

	FD 1/2 (180 μ mol/L)	FD 1/4 (360 μ mol/L)	FD 1/8 (720 μ mol/L)
Justesse (biais%)	0,99	10,97	-3,28
Fidélité (CV%)	5,25	11,22	1,59

FD : Facteur de dilution

Tableau XV: Résultats de l'évaluation de la stabilité.

Stabilité	Niveau	T4(%)	T7 (%)	J1 (%)	J3 (%)	J7 (%)	J14 (%)	
Solution stock	Bas	-5,01						
	Elevé	-3,86						
Cong. - décong.	Bas			-17,61*	-17,05*	-2,87		
	Elevé			-13,28	-3,65	3,18		
Court terme (Bench top)	T° amb.	Bas	3,29	-3,22				
		Elevé	2,80	-3,31				
	2 – 8°	Bas	1,37	-13,98				
		Elevé	1,13	1,59				
Long terme	2 – 8°	Bas			-2,54	15,61*	-3,07	
		Elevé			-4,19	-0,87	4,37	
	-20°	Bas			-14,26	-18,35*	-0,62	-18,09*
		Elevé			-2,76	-9,27	17,29*	1,46
Echantillon préparé	Bas	5,00	-0,90					
	Elevé	-0,96	-0,60					

I. Conclusion

Le tryptophane est un acide aminé qui trouve toute son importance dans l'analyse biologique. La mise au point de sa méthode de dosage par HPLC-Fluorimétrie, conforme aux normes de validation de l'ICH M10, représente une avancée significative dans le domaine de la bio analyse.

En effet, cette méthode permet une analyse rapide, juste, précise et spécifique. En outre la détection par spectrofluorimétrie lui confère la sensibilité requise. Elle offre une opportunité précieuse pour mieux comprendre les déséquilibres métaboliques et les troubles associés à cet acide aminé. Elle s'avère prometteuse dans la surveillance de pathologies telles que la phénylcétonurie, les pathologies cardiaques et inflammatoires ; dans l'ajustement des suppléments à base de tryptophane. En tant que précurseur de la sérotonine et de la mélatonine, le tryptophane possède un potentiel thérapeutique notable, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives stimulantes pour la recherche et la pratique clinique.

Références bibliographiques :

1. Du TT, Cui T, Qiu HM, Wang NR, Huang D, Jiang XH. Simultaneous determination of tryptophan, kynurenine, kynurenic acid and two monoamines in rat plasma by HPLC-ECD/DAD. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018;158:8-14.
2. Cowen PJ, Parry-Billings M, Newsholme EA. Decreased plasma tryptophan levels in major depression. *Journal of affective disorders*. 1989;16(1):27-31.
3. Le Floc'h N, Otten W, Merlot E. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino acids*. 2011;41(5):1195-205.
4. Maneglier B, Rogez-Kreuz C, Cordonnier P, Therond P, Advenier C, Dormont D, et al. Simultaneous Measurement of Kynurenine and Tryptophan in Human Plasma and Supernatants of Cultured Human Cells by HPLC with Coulometric Detection. *Clinical Chemistry*. 2004;50(11):2166-8.
5. Boulet L, Besson G, Faure P, Ducros V, Corne C, editors. Dosage sanguin des métabolites de la voie du tryptophane dans le suivi biologique des patients atteints de phénylcétonurie: étude chez 6 patients adultes et perspectives. *Annales de Biologie Clinique*; 2018.
6. Hényková E, Vránová HP, Amakorová P, Pospíšil T, Žukauskaitė A, Vlčková M, et al. Stable isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitative profiling of tryptophan-related neuroactive substances in human serum and cerebrospinal fluid. *Journal of chromatography A*. 2016;1437:145-57.
7. Ala M, Eftekhari SP. The Footprint of Kynurenine Pathway in Cardiovascular Diseases. *International Journal of Tryptophan Research*. 2022;15:11786469221096643.
8. Gáspár R, Halmi D, Demján V, Berkecz R, Pipicz M, Csont T. Kynurenine Pathway Metabolites as Potential Clinical Biomarkers in Coronary Artery Disease. *Frontiers in immunology*. 2021;12:768560.
9. Favennec M, Hennart B, Caiazzo R, Leloire A, Yengo L, Verbanck M, et al. The kynurenine pathway is activated in human obesity and shifted toward kynurenine monooxygenase activation. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2015;23(10):2066-74.
10. Murray IA, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(12):801-14.
11. Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(1):64-82.
12. Mándi Y, Vécsei L. The kynurenine system and immunoregulation. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. 2012;119(2):197-209.
13. Young SN, Leyton M. The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2002;71(4):857-65.
14. Craske MG, Stein MB. Anxiety. *Lancet (London, England)*. 2016;388(10063):3048-59.
15. Comai S, Bertazzo A, Vachon J, Daigle M, Toupin J, Côté G, et al. Tryptophan via serotonin/kynurenine pathways abnormalities in a large cohort of aggressive inmates: markers

for aggression. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2016;70:8-16.

16. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annual review of medicine*. 2009;60:355-66.

17. Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee AA. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterology and motility*. 2009;21(12):1239-49.

18. de Herder WW. Biochemistry of neuroendocrine tumours. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2007;21(1):33-41.

19. Camargo SM, Bockenhauer D, Kleta R. Aminoacidurias: Clinical and molecular aspects. *Kidney international*. 2008;73(8):918-25.

20. TECHNICAL ICFHO, USE RFPFH. BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION M10. 201926 February.

21. Caporal-Gautier J, Nivet JM, Algranti P, Guilloteau M, Histe M, Lallier M, et al. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. II : Exemples d'application. *STP pharma pratiques : techniques réglementations*. 1992;2(4):227-39.