



Année universitaire : 2011-2012



Licence en Biologie et Santé

Rapport de stage effectué :

Au laboratoire de pharmacologie au CHU Hassan II-Fès.

Validation statistique du dosage des Phénothiazines par spectrophotométrie UV- Visible.

Présenté par :

EL FATRI Madiha.

Encadré par :

Pr. HALOTI Said : FST Fès.

Pr. KHABBAL Youssef : CHU Hassan II-Fès.

Soutenu le 15/06/2012 devant le jury composé de :

- Pr. HALOTI Said : Président.
- Pr. KHABBAL Youssef: Examineur.
- Pr. SEFRIQUI Samira : Examinatrice.

Sommaire

Partie I : Rappels théoriques

Introduction	1
Les psychotropes	2
1- Définition et classification	3
2- Les psycholeptiques	3
2-1 Les neuroleptiques	4
a- Classification des neuroleptiques	4
b- Pharmacocinétique des neuroleptiques	5
c- Pharmacodynamie des neuroleptiques	6
2-2 Les phénothiazines	6
a- Définition	6
b- Utilisation	6
c- Structure chimique	7
d- Pharmacocinétique	7
e- Pharmacodynamie	8
f- Effets indésirables	8
2-3 Lévomépromazine	9
a- Structure chimique	9
b- Indications thérapeutiques	9
c- Intoxication par Lévomépromazine	10
3- La spectrophotométrie	10
a- Domaine de l'ultraviolet et de visible	10
b- Principe de la spectrophotométrie	11
c- Les spectres dans l'UV Visible	11

d-Loi Beer-Lambert	11
4- validation d'une méthode analytique	12
a- Sensibilité	12
b- Linéarité	12
c- Répétabilité	13
d- Limite de détection	13
e- Limite de quantification	13
Partie II : Validation du dosage de la phénothiazine par spectrophotométrie.	
Matériel et méthodes	15
1- Matériels et réactifs	16
2- Notion de base statistique	17
a- Moyenne	17
b- Ecart type	18
c- Coefficient de variation	18
d- Coefficient de corrélation	18
e- Coefficient de détermination	19
f- Loi normale	19
g- Teste des valeurs aberrantes (Test de Dixon)	20
<u>Résultats et Discussion</u>	21
Résultats	22
1- Sensibilité	23
2- Linéarité	23
3- Répétabilité	24
4- Limite de détection	25

5- Limite de quantification	25
6- Coefficient de détermination	26
7- Coefficient de corrélation	26
Discussion	27
1- Sensibilité	27
2- Linéarité	27
3- Répétabilité	27
4- Limite de détection	27
5- Limite de quantification	27
6- Limite de quantification	27
7- Coefficient de détermination	28
8- Coefficient de corrélation	28
9- Conclusion	29
Annexe	
Références bibliographiques	

Introduction

Les phénothiazines est une famille médicamenteuse connue principalement pour ses propriétés neuroleptiques, indiquée pour le traitement des psychoses dont la plus représentative est la schizophrénie.

Ainsi, à dose thérapeutique, les phénothiazines présentent de puissantes actions sédatives et antipsychotiques, avec réduction de la tension émotionnelle, de l'agitation, de l'agressivité et des productions délirantes.

Le traitement par ces médicaments présente souvent une efficacité thérapeutique. Des effets indésirables sont observés notamment l'hépatotoxicité. Ces effets sont souvent liés aux doses administrées non adaptées de ces médicaments. Le suivi thérapeutique par le dosage de médicaments permet d'ajuster la posologie à chaque patient pour mieux optimiser le traitement et minimiser le risque d'effet indésirable.

Le dosage des phénothiazines qui s'inscrit dans le cadre du suivi thérapeutique adapté par laboratoire du Centre Hospitalier Hassan-II est réalisé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et spectrophotométrie.

L'objectif de ce travail, est le dosage des phénothiazines pour le suivi thérapeutique afin d'offrir aux cliniciens un outil pratique pour améliorer l'efficacité du traitement. Ce projet porte essentiellement sur la validation du dosage des phénothiazines par spectrophotométrie. Ce rapport s'articule sur deux axes :

- Une partie théorique introduisant les psychotropes et les techniques de dosage des phénothiazines.
- Une partie expérimentale qui traitera de la validation du dosage des phénothiazines.

Les psychotropes

1- Définition et classification :

Les médicaments psychotropes regroupent un ensemble hétérogène de molécules pouvant avoir une influence sur l'humeur, les émotions, les sensations, la conscience et les autres fonctions psychologiques et comportementales. Il peut être d'origine naturelle ou synthétique.

Les psychotropes ont la propriété de **modifier l'activité mentale**, soit par leurs :

- **Propriétés sédatives.**
- **Propriétés stimulantes.**

On distingue cinq classes des psychotropes :

Ⓢ **Les psycholeptiques** : (leptique vient du grec leptein ; saisir) action sédative sur l'activité mentale.

Ⓢ **Les psychoanaleptiques** (du grec ana : vers le haut) action **stimulatrice** sur l'activité mentale.

Ⓢ **Les thymoanaleptiques** (du grec thymos : le cœur) stimulation de l'humeur regroupant les antidépresseurs.

Ⓢ **Les psychodysleptiques** (du grec dys : de travers) action qui modifie l'activité mentale.

Ⓢ **Les thymorégulateurs** : action régulatrice **de l'humeur** (12).

2- Les psycholeptiques :

Les psycholeptiques regroupent trois classes principales (Les neuroleptiques, Les anxiolytiques, et Les hypnotiques), au sein desquels existent des sous classes.(Tableau 1)(12).

Tableau 1 : les classes des psycholeptiques

<i>Classes</i>	<i>Sous classes</i>
▪ LES NEUROLEPTIQUES	-LES SEDATIFS - LES POLYVALENTS -LES DESINHIBITEURS
▪ LES ANXIOLYTIQUES	-LES BENZODIAZEPINES -LES NON BENZODIAZEPINES
▪ LES HYPNOTIQUES	-LES BARBITURIQUES - LES BENZODIAZEPINES

2-1 Les neuroleptiques (NL) :

Les neuroleptiques sont des médicaments psychotropes, également appelés antipsychotiques.

Les psychotropes sont présents dans 70 à 85 % des intoxications médicamenteuses volontaires.

En 1957, Delay et Deniker **(3)** caractérisent les neuroleptiques en fonction de leurs propriétés psychophysiologiques à savoir :

- ✓ Création d'un état d'indifférence psychomotrice,
- ✓ Efficacité vis-à-vis des états d'excitation et d'agitation,
- ✓ Réduction progressive des troubles psychotiques aigus et chroniques,
- ✓ Production de symptômes extrapyramidaux et végétatifs,
- ✓ Effets sous corticaux prédominants **(7)**.

a- Classification des neuroleptiques

- ✓ selon leurs structures chimiques :
- Neuroleptiques de première génération, il en existe quatre principales classes :
 - Phénothiazines (Lévomépromazine).

-Thioxanthenes (ex : flupentixol).

-Butyrophénones (ex : halopéridol).

-Benzamides (ex : sulpiride).

- Neuroleptiques de seconde génération appartiennent aux classes suivantes :

- Dibenzodiazépines

- Benzoxazoles (respéridone)

- Quinolinone (aripiprazol)

- Selon leurs effets thérapeutiques

- **Effet sédatif** : qui va soulager l'agitation et l'angoisse des patients souffrant de psychose,
- **Effet anti-délicirant** : qui va modifier les hallucinations et les idées délirantes des sujets traités.
- **Effet désinhibiteurs** : des effets neuroleptiques très puissants « stimulante ».
- **Effet polyvalents** : qui exerce à la fois une action sédatrice, réductrice sur les hallucinations et le délire (7).

b- Pharmacocinétique des NL (7)

Absorption :

Les neuroleptiques sont administrés par voie orale, intramusculaire ou intraveineuse. Leur absorption intestinale est extrêmement variable d'un individu à l'autre, globalement elle varie entre 70 et 90%. Le délai d'apparition du pic plasmatique dépend avant tout de la voie d'administration

Distribution :

Les neuroleptiques sont très fortement liés aux protéines plasmatiques, principalement sur l'albumine (de 60 à 90%). Leur volume de distribution est élevé en raison de leur importante lipophilie (variant de 5 à 20 L/kg) et une diffusion dans tous les tissus. Du fait de leur grande affinité tissulaire, le stockage des neuroleptiques est prolongé, et le relargage tardif est possible. Il est possible d'en retrouver dans le sang plusieurs semaines ou mois après l'arrêt du traitement.

Métabolisme :

Le métabolisme des neuroleptiques varie quantitativement et qualitativement selon l'espèce, l'âge, l'individu, le contexte de l'administration. En outre, ils subissent un effet de premier passage hépatique important et très variable lorsqu'ils sont administrés par voie orale.

Les neuroleptiques sont des molécules liposolubles et basiques qui ne peuvent donc pas être éliminées telles qu'elles dans les urines. La plupart des neuroleptiques sont métabolisés au niveau hépatique par les cytochromes P450. Leur métabolisme génère des produits hydrosolubles non liés aux protéines plasmatiques, pouvant être rapidement éliminés par le rein.

Elimination :

Les neuroleptiques sont essentiellement éliminés par voie rénale après biotransformation en métabolites hydrosolubles, accessoirement par voie biliaire et se retrouvent en faible quantité dans les fèces. La demi-vie d'élimination varie considérablement selon les molécules, de l'ordre de 12 à 30h.

c- Pharmacodynamie des NL (7)

Les neuroleptiques bloquent les récepteurs centraux de la dopamine mais il demeure attentif à leurs interactions avec d'autres neuromédiateurs :

- action adrénolytique (anti noradrénergique en particulier α_1).
- action atropinique (anticholinergique antimuscarinique M1, M2).
- action antihistaminique, en particulier anti-H1.
- action antisérotinergique (5HT2 notamment).

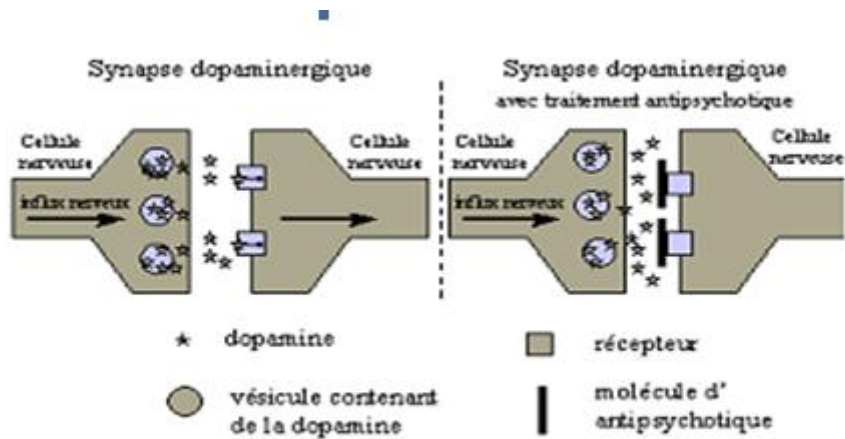


Figure 1 : Mécanisme d'action des neuroleptiques (4)

Figure 1 montre que le principal mécanisme d'action des neuroleptiques est l'inhibition des récepteurs Dopaminergiques.

2-2 Les phénothiazines (10) :

Ce sont des médicaments qui appartiennent à la première classe des neuroleptiques

a- Définition :

La phénothiazine est un [composé chimique](#) qui a donné son nom à la [classe pharmacologique](#) des [phénothiazines](#), c'est un agent [insecticide](#) et [anthelminthique](#) synthétisé initialement en 1883 à partir de [bleu de méthylène](#).

b- Utilisation :

La Phénothiazine est utilisée dans la fabrication de colorants, dans la synthèse des médicaments antipsychotiques, comme inhibiteur de polymérisation, et comme antioxydant

Il est utilisé en tant que pesticide pour lutter contre les insectes et est employé dans la médecine vétérinaire.

c- Structure chimique :

Ces composés possèdent une structure tricyclique (figure2) correspondant à la fusion d'un cycle thiazine -1,4 avec deux cycles benzéniques. Deux substituants se greffent sur cette structure de base :

- R1 : une chaîne azotée, l'amine latérale étant toujours séparée par trois carbones de l'azote intranucléaire.

- R2 : détermine la sous- classe de la substance elle peut être :

Aliphatiques : propriétés sédatives et neurovégétatives, qui comportent la chlorpromazine (Largactil), la Lévomépromazine (Nozinan).

Pipéridines : effets incisifs et neurologique puissants, sont représentées par la Thiopropérazine (*Majeptil*).

Pipérazine : exercent des effets antipsychotiques réducteurs .Sont la Thioridazine (*Melleril*), la Propéciazine (*Neuleptil*).

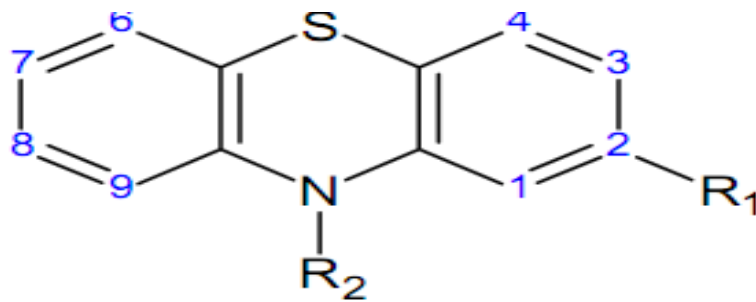


Figure 2 : Structure chimique des phénothiazines (6).

d- Pharmacocinétique des phénothiazines (6)

Absorption :

Les phénothiazines administrées par voie orale sont bien absorbées par l'intestin grêle .Après l'administration orale d'une dose unique, les concentrations plasmatiques maximales moyennes sont atteintes au bout de 3 à 5 heures.

Distribution :

Les phénothiazines sont bien distribuées dans les tissus corporels et se fixe à haut degré aux protéines plasmatique (90% - 95%).

Métabolisme:

Les phénothiazines sont bien métabolisées dans une large mesure au premier passage, ceci se traduisant en générale par de faibles concentrations plasmatiques du principe actif inchangé. Le processus métabolique varie fortement d'un patient à l'autre et un grand nombre de métabolites peut être mis en évidence.

Elimination :

La demi-vie d'élimination est de 2 à 35 heures. Environ 33% du principe actif administré est éliminé dans les urines sous forme de 26-30 métabolites. La quantité restante du principe actif est excrétée par voie fécale.

e- Pharmacodynamie des phénothiazines (6)

Les phénothiazines sont des antagonistes, plus ou moins puissants, des récepteurs dopaminergiques D2, histaminergiques H1, cholinergiques muscariniques et adrénergiques.

f- Effets indésirables:

La toxicité des médicaments antipsychotiques, peut se manifester lors de l'ingestion accidentelle ou l'apparition d'effet secondaire ou indésirable au cours de l'usage thérapeutique. Ces effets indésirables peuvent être souvent des :

Troubles neurologiques centraux :

Syndrome extrapyramidal

Dyskinésies précoces et tardives

Troubles endocriniens et métaboliques :

Hyperprolactinémie

Prise de poids

Hyperglycémie

Troubles neuropsychiques :

Sédation

Troubles neurovégétatifs.

Effets anti cholinergiques

- ✚ Troubles cardiaques :
Allongement de l'intervalle QT d'électrocardiogramme (ECG)
Troubles du rythme (15).

2-3 Lévomépromazine (NOZINAN : nom commercial) :

La Lévomépromazine est un neuroleptique de la famille des phénothiazines, il permet d'améliorer le fonctionnement neuroleptique de cerveau. Elle a une activité antipsychotique et sédative.

a- Structure chimique

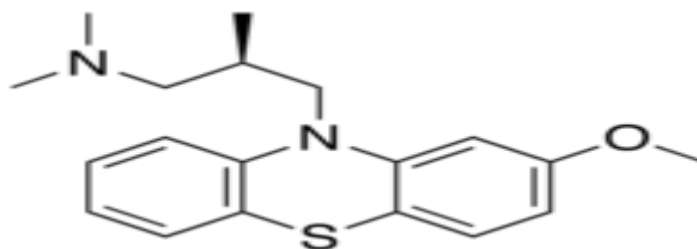


Figure 3: Structure de Lévomépromazine (4)

b- Indications thérapeutiques

Lévomépromazine est indiqué dans les cas suivants :

- Troubles psychotiques : schizophrénies aiguës et chroniques.
- Troubles accompagnés d'anxiété et de tension : troubles du système nerveux autonome, troubles de la personnalité, troubles émotionnels secondaires à des affections physiques comme le prurit rebelle ... etc.

Lévomépromazine est également employé comme analgésique : pour soulager les douleurs dues au cancer, les douleurs musculaires.

c- Intoxication par Lévomépromazine

- Les symptômes d'intoxication aiguë comprennent : la dépression du SNC, les spasmes, les tremblements, les convulsions toniques, le coma accompagné d'hypotension et de dépression respiratoire.

-Traitement : Il n'y a pas d'antidote spécifique. Après lavage gastrique, amorcer un traitement Symptomatique. Les émétiques à action centrale sont inefficaces en raison des effets antiémétiques de Lévomépromazine **(4)**.

Le dosage de Lévomépromazine s'effectue par plusieurs méthodes dont l'HPLC, la spectrophotométrie...etc.

Dans ce but, nous avons choisi la spectrophotométrie dans l'ultraviolet et le visible comme technique de travail, cette dernière est souvent utilisée pour doser les principes actifs médicamenteux, grâce à la grande sensibilité des mesures. C'est en fait une méthode rapide car elle permet d'obtenir les résultats en une fraction de seconde, ce qui permet d'augmenter le nombre d'analyses à réaliser.

3- La spectrophotométrie (18)

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance donnée en solution.

Plus cette solution est concentrée, plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de **Beer-Lambert**.

a- Domaine de l'ultraviolet et de visible

Le domaine du spectro ultraviolet utilisable en analyse s'entend de 185 à 400 nm, alors que celui du spectro visible s'entend de 400 à 800 nm (Figure 4).

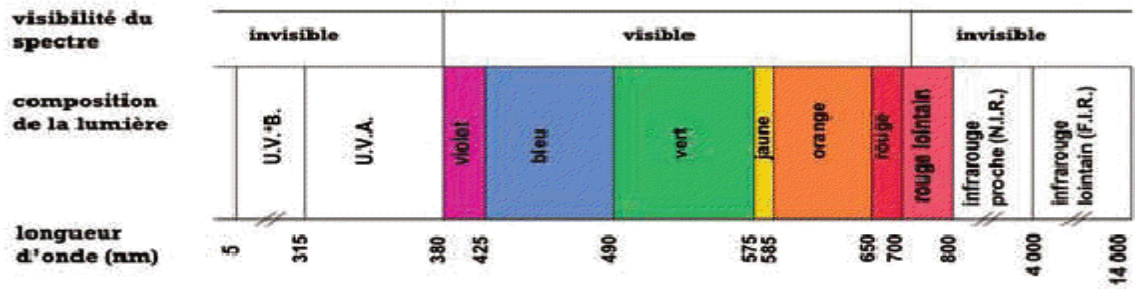


Figure 4 : Les types de spectres (19)

b- Principe de la spectrophotométrie

Lorsqu'un faisceau de lumière blanche d'intensité I_0 traverse une solution d'un chromophore, ce dernier absorbe plus que d'autres certaines longueurs d'onde (la solution apparaît colorée) et restitue une intensité I du faisceau initial (figure5).

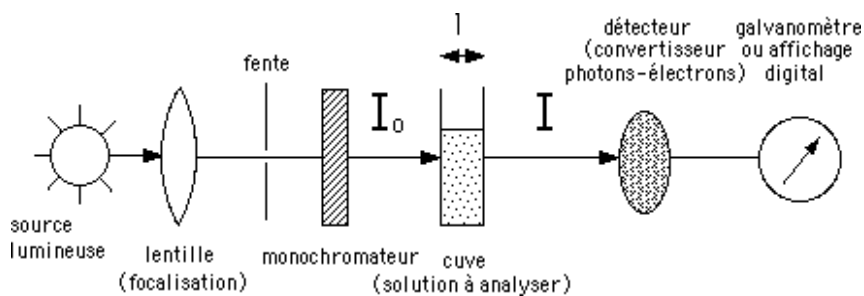


Figure 5 : Schéma de base de la spectrophotométrie UV-Visible (19)

c- Les spectres dans l'UV Visible :

Les spectres dans l'UV-Visible donnent l'absorbance de l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde du rayonnement.

Exemple : pour calculer l'absorbance de Lévomépromazine nous utilisons une longueur d'onde de 460nm.

La transmittance ou l'absorbance, notée T est donnée par :

$$T = I/I_0$$

Où I_0 : l'intensité incidente.

I : l'intensité transmise

d- Loi de Beer-Lambert : **(18)**

La loi de Beer-Lambert est une relation donnant la variation de l'intensité lumineuse en fonction de la distance parcourue dans un milieu transparent. Cette loi stipule que : si un faisceau de photon d'intensité initiale I_0 traverse une cuve de longueur l contenant (généralement 1cm) une solution de concentration C (mol.L^{-1}), l'intensité I une fois la cuve traversée aura comme valeur : $A = \epsilon \times l \times C$

.Avec :

A: absorbance ($A = \ln(I_0/I)$).

I_0 : intensité initiale et I intensité après la cuve Sans unité.

ϵ : coefficient d'absorption en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

l : longueur du trajet optique dans le liquide=largeur de la cuve=1 cm.

C : Concentration du composé étudié en mol.L^{-1} .

Au cours de ce travail, nous avons tenté de valider le dosage de la phénothiazine par spectrophotométrie UV-Visible.

4- validation d'une méthode analytique **(15)** :

La validation d'une méthode analytique peut être définie comme une démarche critique visant à s'assurer de sa qualité ou validité. L'objectif de la validation n'est pas de comparer une méthode à une autre préexistante mais de mieux connaître ses caractéristiques. La validation correspond donc à une étude scientifique des critères de fiabilité de cette technique qui sont :

- Sensibilité
- Linéarité
- La répétabilité
- Limite de détection
- Limite de quantification **(16)**

a- Sensibilité :

Elle caractérise une méthode qui répond à un composé unique et qui ne présente pas d'interférence. Elle se définit comme étant la pente de la courbe d'étalonnage.

$$a = \frac{Y_1 - Y_2}{x_2 - x_1}$$

b- Linéarité :

L'étude de la linéarité revient à une étude de régression. La méthode de la régression consiste à étudier à travers la gamme d'étalonnage. La relation concentration / réponse est exprimée par une courbe d'étalonnage dont l'équation est :

$$y = ax + b$$

Elle peut être complétée par le calcul du coefficient de corrélation « r » et un facteur de réponse. En fait, la détermination du coefficient de corrélation « r » ne permet pas à lui seul de vérifier si la représentation concentration-réponse correspond à une droite. Son calcul n'est intéressant que pour vérifier l'existence d'un lien entre la concentration et la réponse et non pas pour définir de façon absolue la linéarité. Le facteur de réponse est le rapport réponse/concentration. Si la relation concentration/réponse dans une zone déterminée est une droite, le facteur de réponse sera constant quelles que soient les valeurs des couples concentration/réponse. A partir des résultats des facteurs de réponse calculés, on détermine la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (CV). Une faible valeur de ce coefficient permet d'affirmer avec quasi certitude que la représentation concentration-réponse est une droite.

c- Répétabilité :

L'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions identiques : même opérateur, même lots de réactifs, même instrument, même calibrateur. En pratique, cet essai sera réalisé au cours d'une même série. L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (X), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales. Le CV représentera la répétabilité de la méthode en %.

Le coefficient de variation donne l'homogénéité des données, si le coefficient de variation est inférieur à 15%, on considère que les données sont homogènes et inversement, si le coefficient de variation est supérieur à 15%, on dit que les données sont hétérogènes.

d- Limite de détection (LD) :

Elle représente la plus faible concentration de l'analyte qu'il est possible de détecter, mais pas nécessairement de doser, à l'aide d'une méthode spécifique, dans les conditions expérimentales imposées. Cette limite est généralement exprimée sous forme de concentration (par exemple en microgramme par litre).

$$LD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S}$$

σ : La moyenne des écarts-types.

S : La pente de la droite d'étalonnage.

e- Limite de quantification (LQ) :

Il s'agit de la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

Avant de détailler le chapitre concernant des résultats, il est nécessaire de présenter la définition de quelques termes importants en statistiques.

$$LQ = 10 \times \frac{\sigma}{S}$$

σ : La moyenne des écarts-types.

S : La pente de la droite d'étalonnage.

Matériel et méthodes

1- Matériel et réactifs :

➤ Appareillage :

-Spectrophotométrie UV –Visible (Jasco-V-530).



Figure 6 : Photo du spectrophotométrie UV-Visible(Jasco-V-530)

-Vortex.

-Agitateur.

➤ Réactifs :

-Lévomépromazine (comprimé).

-FPN : Acide Ferrique Perchlorique et Nitrique

- chlorure ferrique 50g/l.....5ml

-45ml d'acide perchlorique 200g/l.....45ml

-50ml d'acide nitrique dilué500ml/l.....50ml

2 -Optimisation de la méthode

➤ Gamme d'étalonnage :

Nous avons préparé une gamme d'étalon à partir d'une concentration mère de Lévomépromazine $C_M = 153,05\text{mg/l}$ avec une dilution de $\frac{1}{2}$ additionner d'1ml de FPN qui donne une coloration violette spécifique aux phénothiazines, après nous avons mesuré l'absorbance par spectrophotométrie.



Figure 7: Gamme d'étalon de Lévomépromazine.

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau(2).

Tableau2 : Préparation des étalons

	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube5	Tube 6
Facteur de dilution	C_M	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$
Concentration mg/l	153,05	76,52	38,26	19,13	9,56	4,78
Moyenne	2,454	1,451	0,809	0,501	0,295	0,194

2- Notion de base statistique (20) :

a- Moyenne :

La moyenne est la somme des grandeurs mesurées divisée par le nombre d'individus.

La moyenne d'une grandeur x est notée « \bar{X} ».

Pour un échantillon de taille n, la moyenne \bar{X} est calculée par la formule suivante :

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n}$$

\bar{X} En utilisant la lettre grecque Σ pour représenter une somme. On obtient la notation compacte suivante :

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

b- Ecart type :

L'écart type mesure la dispersion d'une série de valeurs autour de leur moyenne. C'est la racine carrée de la variance. Il est noté S.

L'écart type d'un échantillon de taille n est de moyenne \bar{X} est calculé par la formule suivante :

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

c- Coefficient de variation :

Le coefficient de variation indique la dispersion relative, il se calcule comme rapport entre l'écart type et la moyenne.

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

d- Coefficient de corrélation :

Quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écart-types.

Il exprime la relation éventuelle entre deux variables indépendants, ayant une valeur comprise entre -1 et 1

$$r = \frac{(COV(x ; y))}{(\sigma x . \sigma y)}$$

e- Coefficient de détermination :

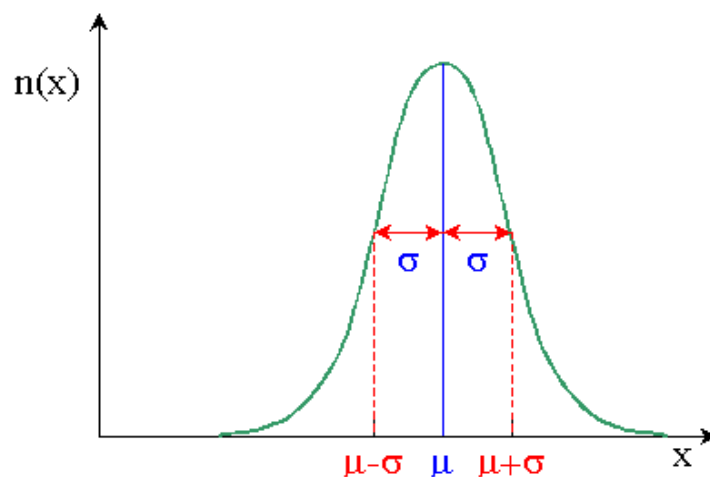
Est un indicateur de juger la qualité d'une régression linéaire, ayant pour valeur comprise entre 0 et 1

$$r^2 = \left(\frac{(COV(x ; y))}{(\sigma x . \sigma y)} \right)^2$$

f- Loi normale :

La loi normale est une loi continue dont la distribution de probabilité a été publiée par Abraham de Moivre en 1733.

Le graphique de cette distribution se présente sous forme de cloche et la courbe résultante est appelée la courbe normale.



- μ est la moyenne (notée aussi m).

- σ est l'écart type.
- $N(x)$ est le nombre d'individus pour lesquels la grandeur analysée a la valeur x .

Si X suit une loi normale de paramètre μ et σ^2 , alors :

- L'espérance mathématique de X est : $E(X)=\mu$.
- La variance de X est $\text{Var}(X)=\sigma^2$ **(25)**.

g- Teste des valeurs aberrantes (Test de Dixon)

On entend par valeur aberrante dans une distribution quantitative, une valeur qui s'écarte « notablement » du reste des autres observations.

Deux alternatives existent :

-La valeur aberrante est le résultat de gros écarts par rapport au mode opératoire habituel, ou provient d'erreurs de calcul ou d'enregistrement. Dans ce cas il faut rejeter l'observation comme ne faisant pas partie de la population, ou la remplacer par la valeur corrigée.

-La valeur aberrante est due à une erreur aléatoire. Dans un tel cas, il convient de conserver la mesure comme faisant partie intégrante de la distribution statistique.

Le Test de Dixon s'applique pour les échantillons de taille $n \leq 30$ et, il ne nécessite pas le calcul de l'écart-type de la série.

Il a pour principe de classer la distribution observée par valeurs croissantes.

$$Y_1 \leq Y_2 \leq \dots \leq Y_{n-1} \leq Y_n$$

En fonction du nombre d'observations dont on dispose, on calcule les rapports suivant :

$$3 \leq n \leq 7 \quad r_{10} = \frac{Y_n - Y_{n-1}}{Y_n - Y_1}$$

$$8 \leq n \leq 10 \quad r_{11} = \frac{Y_n - Y_{n-1}}{Y_n - Y_2}$$

$$11 \leq n \leq 13 \quad r_{21} = \frac{Y_n - Y_{n-2}}{Y_n - Y_2}$$

$$14 \leq n \leq 30$$

$$r_{22} = \frac{Y_n - Y_{n-2}}{Y_n - Y_3}$$

On visualise alors dans la table de Dixon qui donne les valeurs critiques de ces rapport au niveau de risque 5% .La règle à adopter est la suivante : si la valeur du rapport est inférieure à la valeur critique, on dit que le point n'est pas aberrant.

Résultats et discussion

Résultats :

A partir de ce tableau, on a pu tracer le graphe (Figure 9) qui représente la moyenne des densités optiques en fonction de la concentration de Lévomépromazine.

Tableau3 : Résultats du test de linéarité

Concentration des étalons mg/l		Absorbances				Moyenne
		Rép1	Rép2	Rép3	Rép4	
Solution mère	153,05	2,162	2,548	2,464	2,64	2,454
Dilution $\frac{1}{2}$	76,52	1,424	1,352	1,483	1,544	1,451
Dilution $\frac{1}{4}$	38,26	0,781	0,71	0,933	0,813	0,809
Dilution 1/8	19,13	0,465	0,465	0,525	0,547	0,501

Dilution 1/16	9,56	0,241	0,26	0,332	0,345	0,295
Dilution 1/32	4,78	0,147	0,121	0,26	0,248	0,194

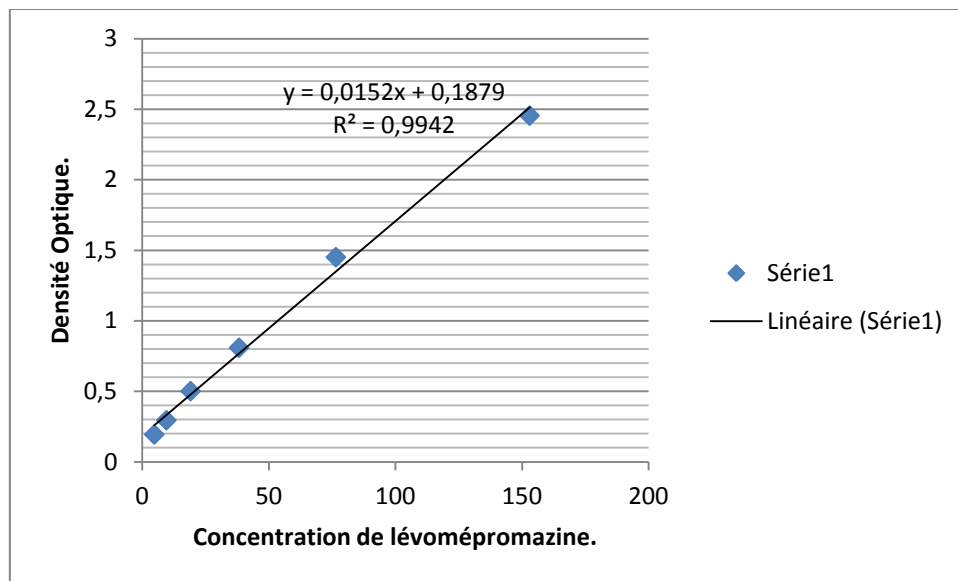


Figure 9: Courbe de la linéarité de Lévomépromazine: la moyenne des densités optiques en fonction de la concentration

1- Sensibilité

D'après la courbe (figure9) obtenue à partir de la gamme d'étalon

On a : $y = ax + b$ \Rightarrow $0,0152x + 0,1879$

Donc : $a = 0,0152$

On a déduit aussi la linéarité :

2- Linéarité :

On effectue un étalonnage basé sur 6 concentrations $n = 6$, chaque étalon donne lieu à 4 mesures de l'absorbance $K=4$ (Figure 9).

Pour s'assurer de la linéarité nous avons appliqué le test de Dixon.

🕒 Application du test de Dixon sur ces résultats :

Puisqu'on a réalisé quatre mesures ($3 \leq n \leq 7$), on calcule les valeurs de r_{10} pour les comparer à la valeur critique donnée par la table de Dixon à un degré de signification ($\alpha=0,05$).

Dans notre cas $n=6$ niveaux de concentration :

-Pour le premier niveau de concentration [153,05 mg/l], les absorbances obtenues :

$$2,162 \leq 2,464 \leq 2,548 \leq 2,640$$

$$r_{10} = \frac{2,640 - 2,548}{2,640 - 2,162} = 0,192$$

-Pour le deuxième niveau de concentration [76,52 mg/l], les absorbances obtenues :

$$1,352 \leq 1,424 \leq 1,483 \leq 1,544$$

$$r_{10} = \frac{1,544 - 1,483}{1,544 - 1,352} = 0,317$$

-Pour le troisième niveau de concentration [38,26 mg/l], les absorbances obtenues :

$$0,710 \leq 0,781 \leq 0,813 \leq 0,933$$

$$r_{10} = \frac{0,933 - 0,813}{0,933 - 0,710} = 0,538$$

-Pour le quatrième niveau de concentration [19,13 mg/l], les absorbances obtenues :

$$0,465 \leq 0,525 \leq 0,547$$

$$r_{10} = \frac{0,547 - 0,525}{0,547 - 0,465} = 0,268$$

-Pour le cinquième niveau de concentration[9,56 mg/l], les absorbances obtenues :

$$0,241 \leq 0,260 \leq 0,332 \leq 0,345$$

$$r_{10} = \frac{0,345 - 0,332}{0,345 - 0,241} = 0,125$$

-Pour le sixième niveau de concentration[4,78 mg/l], les absorbances obtenues :

$$0,121 \leq 0,147 \leq 0,248 \leq 0,260$$

$$r_{10} = \frac{0,260 - 0,248}{0,260 - 0,121} = 0,086$$

D'après la table de DIXON (Voire **Annexe**), $r_{crit} = 0,56$ avec $\alpha = 5\%$ et $n = 6$.

Pour les six niveaux de concentration, on remarque que r_{crit} est supérieure à r_{10} ;

Le test de Dixon atteste qu'aucun extrême n'est aberrant.

3- Répétabilité

La répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions identiques. L'exploitation de ces résultats consiste à calculer la moyenne (X), l'écart-type (s) et le coefficient de variation(CV) représentés par le Tableau(4).

Tableau4 : Résultats du test de Répétabilité

Concentration des étalons mg/l	Absorbances				Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation
	Rép1	Rép2	Rép3	Rép4			
153,05	2,162	2,548	2,464	2,64	2,454	0,207	8,445
76,52	1,424	1,352	1,483	1,544	1,451	0,082	5,656
38,26	0,781	0,71	0,933	0,813	0,809	0,093	11,498
19,13	0,465	0,465	0,525	0,547	0,501	0,042	8,384
9,56	0,241	0,26	0,332	0,345	0,295	0,052	17,544
4,78	0,147	0,121	0,26	0,248	0,194	0,070	36,217

4-Limite de détection :

Pour calculer de la limite de détection nous avons appliqué cette formule :

$$LD = 3,3 \times \frac{\sigma}{s}$$

$$\text{Avec : } \sigma = \frac{0,207+0,082+0,093+0,042+0,052+0,070}{6} = 0,091$$

$$s = 0,015$$

$$LD = 3,3 \times \frac{0,091}{0,015}$$

$$LD=20,02\mu\text{g}$$

4- Limite de quantification

Pour calculer de la limite quantification nous avons appliqué cette formule :

$$LQ=10 \times \frac{\sigma}{S}$$

$$\text{Avec : } \sigma = \frac{0,207+0,082+0,093+0,042+0,052+0,070}{6} = 0,091$$

$$S = 0,015$$

$$LQ = 10 \times \frac{0,091}{0,015}$$

$$LQ = 59,86 \mu\text{g}$$

6- Coefficient de détermination

A partir du graphe nous avons déduit :

$$r^2 = 0,9942$$

7- Coefficient de corrélation

Nous avons appliqué la formule suivante :

$$r = \sqrt{\text{Coefficient de détermination}}$$

$$r = \sqrt{0,9942}$$

$$r = 0,9970$$

Discussion

1- Sensibilité :

A partir de l'équation que nous avons trouvé dans la partie résultat :

$y = 0,0152 + 0,1879x$ nous indique que la pente $a = 0,0152$, ça veut dire quand x (concentration) augmente de 1, y (absorbance) augmente de $a = (0,0152)$.

2- Linéarité :

La linéarité de la méthode est obtenue entre 153,05 et 4,78 mg/l. La courbe d'étalonnage représente une droite qui montre que les deux variables (concentration et absorbance) sont proportionnelles.

Le test de Dixon nous a permis d'apprécier la linéarité de la courbe.

La réalisation de ce test a donné que notre courbe ne contient aucun point aberrant.

3- La répétabilité :

La répétabilité faite sur la même solution de Lévomépromazine dans des conditions identiques. Les coefficients de variation obtenus entre 8,445 et 36,217.

Puisque la valeur du coefficient de variation est supérieure à 15 %, on considère que les données sont hétérogènes.

4- Limite de Détection :

Nous pouvons conclure que $LD = 20,02\mu\text{g}$ c'est la plus faible concentration de Lévomépromazine qu'il est possible de détecter, mais pas nécessairement de doser, à l'aide d'une méthode spécifique.

5- Limite de Quantification :

Nous pouvons conclure que $LQ = 59,86\mu\text{g}$ c'est la concentration minimale de Lévomépromazine qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

6- Coefficient de détermination :

$r^2 = 0,9942$ ce qui signifie que 99,42% de la variation totale de y peut être expliquée par la relation linéaire entre x (concentration) et y (absorbance), le reste qui s'évalue à 0,58% de la variation totale, demeure inexplicable

Autrement dit si la ligne est confondue aux points tels qu'ils sont tracés l'explication de la variance serait donc plausible. Au contraire si la ligne est loin d'être confondue avec les dits points, l'explication serait alors ambiguë.

7- Coefficient de corrélation :

Nous avons trouvé un coefficient de corrélation égal à 0,9970 comme étant une valeur positive ce qui signifie que x et y évoluent dans la même sens, autrement dit, une augmentation de x (concentration) entrainerait simultanément une augmentation de y (absorbance).

Conclusion

Dans le but de raccourcir la durée et d'améliorer l'efficacité des traitements de certaines maladies et de réduire leurs coûts, le laboratoire du CHU de Fès ne cesse de chercher de nouvelles techniques et d'améliorer celles préexistantes. C'est dans ce sens que ce travail s'est porté sur la technique du dosage des phénothiazines afin de l'enrichir.

L'apport de ce travail consistait à valider la technique du dosage de la phénothiazine par spectrophotométrie. Ce dosage a pour but de rendre le traitement plus efficace en diminuant de la gravité des effets indésirables de ces médicaments et aussi pour une meilleure adaptation de la dose administrer.