



UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN
ABDELLAH
Faculté des sciences technique Fès



SOUTENANCE DE STAGE DE FIN D'ETUDES

Pour l'obtention du diplôme de Master Sciences et Techniques

VALIDATION DE DOSAGE DES
MEDICAMENTS PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE UV-VISIBLE
« CAS D'IOHEXOL »

Présenté par :
EL-ADRAOUI NAIMA

Encadré par :
Pr : BENTAMA Abdeslam
Pr : KHABBAL Youssef

Introduction

Le rein est un organe extrêmement important, non pas par sa taille, mais par son fonctionnement.

La maladie rénale est une priorité de santé publique qui touche près de 10 % de la population adulte dans le monde, et plus d'un million de Marocains.

Elle est définie comme une diminution progressive des fonctions rénales déterminée par une diminution permanente du débit de filtration glomérulaire (DFG). Elle est définie par la présence, pendant plus de 3 mois, de marqueurs d'atteinte rénale ou d'une baisse du DFG au dessous de 60 mL/min/1,73 m².

Dans la première partie de ce mémoire, on va définir la maladie rénale, ses types, les méthodes de détermination du débit de filtration glomérulaire(DFG),et on va décrire les propriétés pharmacologiques de l'iohexolet et la méthode de dosage par spectrophotométrie UV-visible .

Dans la deuxième partie, on va présenter nos travaux effectués au sien du laboratoire pharmacotoxicologie du CHU Hassan II Fès, dont on va bien développer les différentes étapes de la validation du dosage de l'iohexol par spectrophotométrie UV-Visible avec une discussion générale sur ensemble de ces étapes et de leurs résultats.

Le but de la présente étude est de valider une méthode simple, méthode rapide et fiable pour l'estimation de l'iohexol utilisant la technique spectrophotométrie UV.

Dans le cadre du projet de fin d'étude en deuxième année Master, j'ai effectué un stage de 5 mois dans le laboratoire de pharmacotoxicologie, du laboratoire central des analyses médicales, au centre hospitalier universitaire (CHU) Hassan II de Fès. Le complexe Hospitalier Universitaire « CHU » Hassan II de Fès a été inauguré par SM le Roi Mohammed VI. Cet édifice sanitaire, prévu pour répondre aux besoins de plus de quatre millions d'habitants (régions de Fès Boulomane, Meknès-Tafilalet et Taza-Al Hoceima-Taounate), a pour objectif d'améliorer le taux de couverture médicale de cette population et de décongestionner les structures sanitaires déjà existantes dans ces régions.



Figure A : Centre Hospitalier Universitaire Hassan II Fès

Le CHU de Fès se compose d'un hopitale des spsalités, dun hopitale mère-enfant, d'un hopitale d'oncologie et de médecine nucléaire, d'un laboratoire centrale d'analyses médicales et d'un centre de consultations externes.

Le matériel médical haut gamme dont est doté le CHU Hassan II (pharmacie avec gestion informatisé et automatisé des médicaments, bloc opératoire multimédias avec télémédecine, appareils radiologie sophistiqués...) permet d'offrir aux patients les meilleures soins et de garantir aux étudiants et aux sanitaires un cadre d'apprentissage adéquat.

Le laboratoire centrale d'analyses Médicales est situé au bâtiment J et conçu comme un pole d'activité hospitaliere comportants plusieurs spécialités d'analyses médicales :

Le laboratoire central des analyses médicales se compose de :

- Salle de réception
- Salle de prélèvements
- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie
- Laboratoire d'hématologie
- Laboratoire de bactériologie /Immunologie
- Laboratoire de parasitologie
- Laboratoire de génétique
- Laboratoire d'anatomie pathologique



*Figure B: laboratoire
d'analyse CHU Hassan II*

L'organigramme de l'unité de Laboratoire central d'analyse médicale

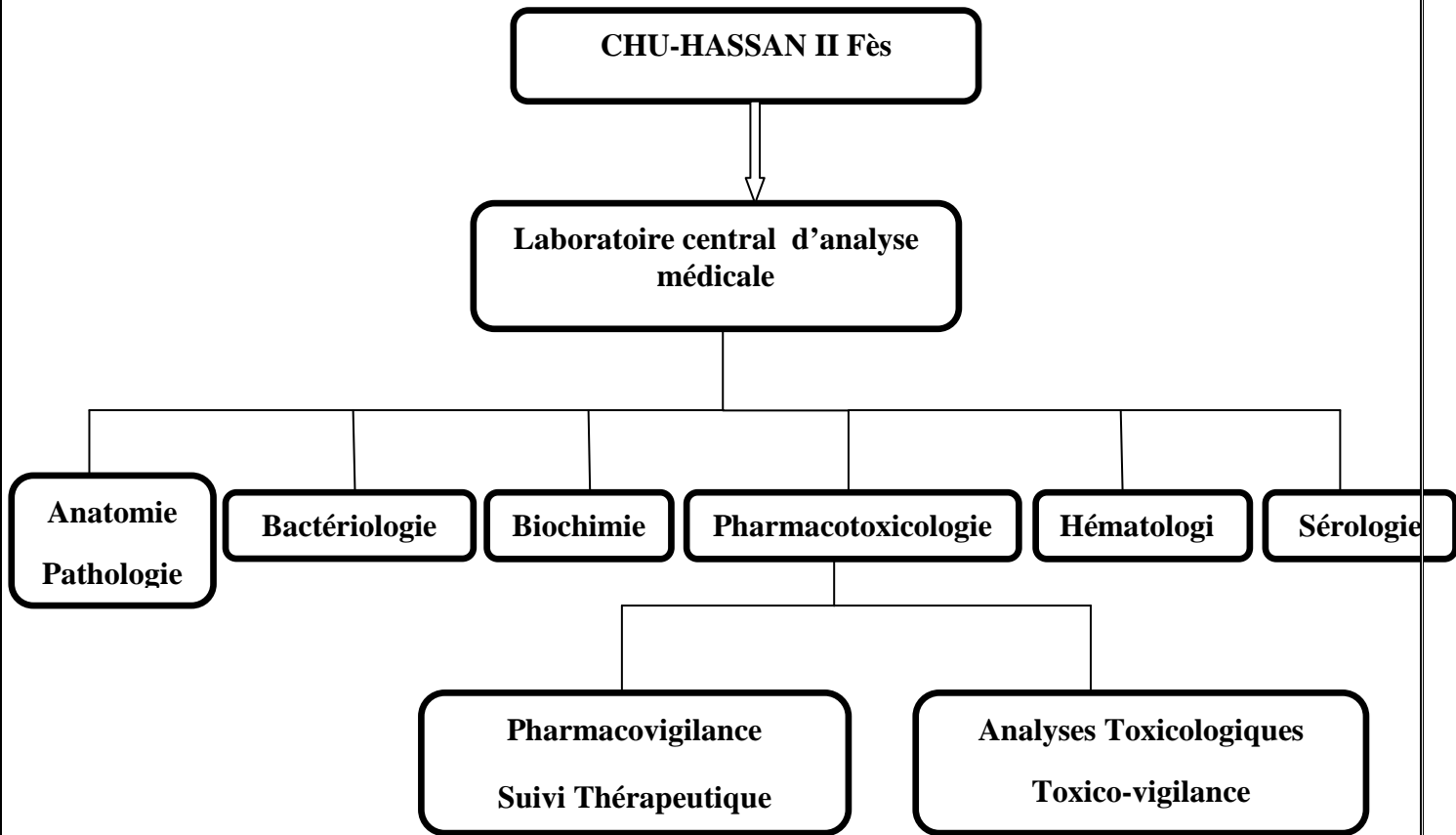


Figure C : organigramme de l'unité de pharmacotoxicologie de CHU- Fès

I- L'insuffisance rénale

1- Définition de l'insuffisance rénale

L'insuffisance rénale (IR) caractérise un état pathologique durant lequel les reins ne peuvent plus assurer leur travail de filtration sanguine. Cela s'accompagne de déséquilibres en eau et en minéraux dans l'organisme, pouvant mener à une situation mortelle [1].

L'insuffisance rénale correspond à l'altération du fonctionnement des deux reins qui ne filtrent plus correctement le sang. La maladie est dite aiguë si le dysfonctionnement est transitoire et réversible et chronique si la destruction est irréversible, sans possibilité de guérison. Dans ce cas, la maladie peut être stabilisée. Si l'insuffisance rénale est majeure, la fonction rénale peut être supplantée par dialyse ou transplantation. La dialyse permet de filtrer le sang par un circuit dérivé, le plus souvent extérieur à l'organisme.

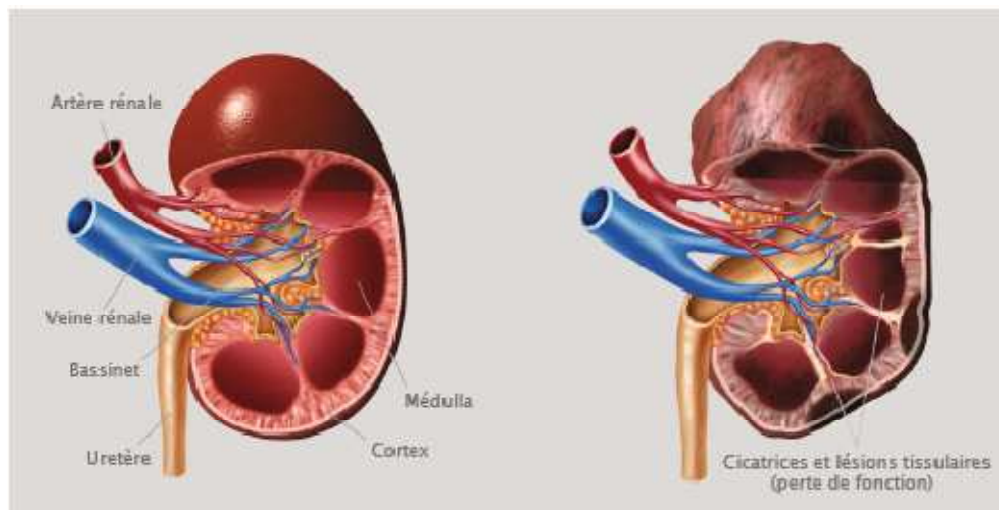


Figure 1 : Un rein sain (à gauche) et un rein atteint de maladie rénale (à droite)

2- Les types de l'insuffisance rénale

a- Insuffisance rénale aiguë

Se traduit par un brusque arrêt de la filtration des déchets du sang et de la production d'urine. Associée à un déséquilibre de l'organisme en sel et en eau et à des difficultés de régularisation de la pression du sang (tension artérielle).

Dans la plupart des cas, cette affection survient au cours de circonstances graves (hémorragie importante ou intoxication, par exemple). Globalement, une insuffisance rénale se caractérise par une diminution de la fonction et du nombre des néphrons (unités de base constituant le rein et servant à débarrasser le sang des toxines qu'il contient, en élaborant l'urine primitive). L'insuffisance rénale aiguë, contrairement à l'insuffisance rénale chronique, est généralement réversible et guérit le plus souvent. [2]

b- Insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique (IRC) aboutissant à l'insuffisance rénale terminale (IRT) nécessitant une dialyse ou une transplantation est un problème de santé publique majeur. [3]

L'insuffisance rénale chronique (IRC) correspond à la perte progressive et irréversible des fonctions des reins. Elle résulte de la réduction du parenchyme rénal fonctionnel. Son diagnostic repose sur la diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG), qui se traduit par une augmentation progressive des concentrations plasmatiques de la créatinine.

Au cours de l'IRC, les néphrons qui restent fonctionnels s'adaptent remarquablement au surcroît de travail qui leur est demandé par l'organisme urémique pour assurer l'excrétion des substances azotées et maintenir l'homéostasie de l'eau et des électrolytes. [4]

La MRC est classée en 5 stades de sévérité selon le niveau de débit de filtration glomérulaire.

Stades	DFG estimé (mL/min)*	Définition
1	≥ 90	Maladie rénale ** sans insuffisance rénale chronique
2	Entre 50 et 89	Maladie rénale * avec insuffisance rénale chronique légère
3	Entre 30 et 49	Insuffisance rénale chronique modérée
4	Entre 15 et 29	Insuffisance rénale chronique sévère
5	< 15	Insuffisance rénale chronique terminale

Figure 2: Classification de la maladie rénale chronique et de sévérité de l'insuffisance rénale chronique.

Le DFG est le volume de liquide filtré par le rein par unité de temps. C'est une grandeur qui permet d'évaluer les fonctions de filtration et d'excrétion du rein, et s'exprime en ml/min/kg.[5]

II- Méthodes d'évaluation de la fonction rénale

Le diagnostic de la maladie rénale se fait par la recherche de marqueurs d'atteinte rénale et par l'évaluation du DFG. Ce dernier peut être soit mesuré à partir de la clairance d'un marqueur exogène ni sécrété ni réabsorbé par les tubules rénaux, soit estimé, à l'aide de différentes équations, à partir du dosage de la créatinine. [6]

L'évaluation de la fonction rénale est un élément fondamental de la prise en charge des malades âgés hospitalisés. Le diagnostic d'une insuffisance rénale est effet important car il apparaît de plus en plus certain qu'il s'agit d'un facteur de risque de mortalité et de morbidité cardiovasculaire. [7]

1- Clairance urinaire de la créatinine :

La créatinine (Cr) est un dérivé d'acides aminés filtré par le glomérule. Sa concentration est liée à la dégradation des protéines musculaires et des produits carnés ingérés. Les limites de l'utilisation de la mesure de la Cr sérique (sCr) sont connues et la technique de dosage n'est pas encore standardisée selon des normes internationales. Ceci affecte considérablement la fiabilité du dosage de la sCr dont une part non négligeable peut être éliminée par le tubule rénal. La conséquence est une surestimation du DFG et donc une sous-estimation de la dysfonction rénale.

L'excrétion tubulaire est élevée dans plusieurs circonstances : la déshydratation, la fièvre, la baisse des valeurs tensionnelles...De plus, certains médicaments modifient considérablement le métabolisme de la sCr rendant son évaluation biologique aléatoire. En conséquence, la reproductibilité du dosage de la Cr reste médiocre bien que la technique soit simple et peu onéreuse.

La clairance urinaire de la Cr a été progressivement abandonnée de la pratique quotidienne en raison des difficultés liées à la récolte urinaire de 24h et surtout de la surestimation permanente du DFG en cas d'insuffisance rénale. [8]

2- Clairances à l'inuline

L'inuline est un polymère du fructose, elle est librement filtrée à travers les glomérules, elle n'est ni sécrétée ni réabsorbée, sa clairance est égale au débit de filtration glomérulaire (DFG), c'est la meilleure technique pour calculer la clairance urinaire ou plasmatique de l'inuline. [9]

3- Cystatine C sérique :

La cystatine C est un polypeptide non glycosylé, basique (pH à 9,3), composé de 122 acides aminés. La cystatine C, produite de manière constante par les cellules de l'organisme, est librement filtrée au niveau glomérulaire puis entièrement catabolisée au niveau du tube proximal. Son dosage plasmatique permet dès lors d'estimer le DFG.

L'estimation du débit de filtration glomérulaire sur la base des taux sériques de cystatine C a démontré son intérêt, bien que plus coûteuse. Les taux sériques sont moins liés à la masse musculaire et particulièrement sensible pour la détection précoce d'une diminution du DFG. Une formule permet d'extrapoler le DPG sur la base du taux sérique de cystatine C (CysC, mg/L): [10]

$$\text{DFGe} = 127.7 \times (\text{CysC}) - 1.17 \times (\text{âge}) - 0.13$$

4- Iohexol

L'Iohexol est un produit de contraste iodé, non ionique et faiblement hyperosmolaire utilisé comme traceur de filtration glomérulaire, il est librement filtré et n'est pas métabolisé ni sécrété ni réabsorbé.

Autres techniques d'évaluation du DFG

5- L'équation de Cockcroft-Gault

En clinique, la fonction rénale est régulièrement évaluée notamment lors de prescriptions de médicaments ou d'investigations radiologiques. Dans ces situations, l'estimation du DFG au moyen d'équations permet une meilleure approche diagnostique que le dosage de la sCr. L'une d'entre elle, l'équation de Cockcroft-Gault proposée en 1976 demeure toujours en vigueur. [11]

Cette dernière calcule la clairance de la Créatine : (ClCr) en ml/min :

$$\text{ClCr} = \frac{((140 - \text{âge [années]}) \times \text{poids [Kg]})}{\kappa} / \text{sCr [mol/l]} \times$$

Où $K = 1,23$ pour les hommes et $1,04$ pour les femmes.

La formule de Cockcroft-Gault estime la ClCr et non le DFG.

6- L'équation de MDRD

La formule du MDRD a été largement validée pour les patients entre 18 et 70 ans. Elle est probablement valable aussi pour l'estimation du débit de filtration glomérulaire au-delà de 70 ans.

L'équation ne requiert pas le poids. Elle est normalisée pour $1,73 \text{ m}^2$ (surface corporelle moyenne chez l'adulte).

$$\text{DFGe} = 175 \times (\text{sCr en mg/dl})^{-1,154} \times (\text{âge})^{-0,203} \times (0,742 \text{ si femme}) \times K$$

III- Les produits de contraste

La nécessité d'utiliser des produits de contraste (PC) apparaît dès la découverte des rayons X en 1895. L'injection IV d'un composé iodé hydrosoluble pour visualiser le tractus urinaire est décrite par Osborne en 1923. Le premier PC ionique (diatrizoate) naît en 1955 et le premier PC non ionique (métrizamide) en 1968. Les PC iodés hydrosolubles figurent parmi les médicaments les plus souvent injectés (17 millions d'injections annuelles aux États-Unis). Leur toxicité est finalement faible, si on tient compte des posologies nécessaires très élevées.

Le développement récent de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'aide de PC non iodés, introduits au Japon et aux États-Unis en 1988, ouvre de nouvelles perspectives.

Caractéristique physicochimique de PDCI :

a- Concentration en iode :

Elle conditionne le pouvoir contractant du pic, de son efficacité. Elle s'exprime en g/100 ml ou en mg/ml suivant la classe de produit. Le choix dépend de l'examen, du patient et de l'appareillage.

b- L'osmolalité :

- Elle dépend du nombre de particules en solution.

- Elle conditionne en partie la diffusion du PDCI hors du vaisseau et dans le parenchyme (et par conséquence sa rémanence vasculaire).
- Elle s'exprime en mOsm/kg
- La viscosité : dépend de la molécule et de la concentration en iode, la température également.

c- L'hydrophilie :

- Elle dépend de la structure de la molécule (présence de radicaux OH).
- Elle conditionne en partie la diffusion du PDCI dans les tissus.
- Elle conditionne en partie sa tolérance.

d- Le caractère ionique ou non ionique :

- Produit ionique peut contenir du sodium qui joue un rôle dans la contractilité myocardique.
- Les études sur le sang humain montrent que les produits ioniques s'opposent d'avantage à l'activation plaquettaire que les produits non ionisés. [12]

L'Osmolalité et la viscosité à 37 °C pour des solutions à 300 mg/ml d'iode et ratio R égal au nombre d'atomes d'iode sur le nombre de molécules osmotiquement actives.[12]

DCI	Nom commercial	Osmolalité (mOsm/kg d'H ₂ O)	Viscosité (cp)	R
<i>Monomères ioniques tri-iodés de haute osmolalité</i>				
amidotrizoate	Radiosélectan [®]	2100	8,9	3/2
ioxitalamate	Télébrix [®]	1710	5,2	
<i>Dimères ioniques hexa-iodés de basse osmolalité</i>				
ioxaglate	Hexabrix [®]	600	7,5	6/2
<i>Monomères non ioniques tri-iodés de basse osmolalité</i>				
iopamidol	Iopamiron [®]	616	4,7	3/1
iohexol	Omnipaque [®]	640	6,1	
ioméprol	Ioméron [®]	521	4,5	
iopentol	Ivépaque [®]	640	6,5	
ioversol	Optiray [®]	630	5	
ioversol	Optiject [®]	630	5,5	
iopromide	Ultravist [®]	607	4,6	
iobitridol	Xenetix [®]	695	6	
<i>Dimères non ioniques hexa-iodés iso-osmolaires</i>				
iodixanol	Visipaque [®]	290	11,4	6/1

Figure 3 : Propriétés physicochimiques des produits de contraste iodés

L'osmolalité d'une solution exprime le nombre de particules osmotiquement actives par kg d'H₂O et dépend notamment de la concentration en iode de la solution. [12]

Le comportement pharmacocinétique d'un PC hydrosoluble, identique quelle que soit sa structure. Les PC ne passent ni la barrière cellulaire ni la barrière hémato-encéphalique. Le volume de distribution correspond au volume extracellulaire. La demi-vie est d'environ 2 heures et l'élimination rénale à 98 %. En cas d'insuffisance rénale, l'élimination est assurée par voie hépatique, salivaire, digestive et sudorale.

IV- Iohexol

a- Définition l'iohexol :

Ce médicament est à usage diagnostique uniquement. L'iohexol est un produit de contraste iodé utilisé pour l'estimation de la clairance rénale.

L'iohexol est un moyen de contraste radiographique, hydrosoluble, non ionique qui contient 46,36% d'iode. Les solutions d'iohexol peuvent être autoclavées, mais doivent être protégées de la lumière. Iohexol par voie intrathécale: il passe du liquide céphalo-rachidien au sang et s'élimine totalement par l'urine en 24h.

Le contraste radiographique optimum se maintient pendant 30 minutes après son administration intrathécale. Si une myélographie tomographique est prévue, il faut laisser s'écouler plusieurs heures pour permettre au contraste par iohexol résiduel de disparaître.

L'iohexol Solution injectable est un agent de contraste, vendu sous la dénomination commerciale Omnipaque, et livré prêt à l'emploi, sous forme d'une solution stérile aqueuse, clair et incolore à jaune pâle. [13]

a- Dénomination du médicament

Il est disponible en diverses concentrations, de 180 à 350 milligrammes d'iode par millilitre.

- Omnipaque 180 mg I/ml solution injectable
- Omnipaque 240 mg I/ml solution injectable
- Omnipaque 300 mg I/ml solution injectable
- Omnipaque 350 mg I/ml solution injectable



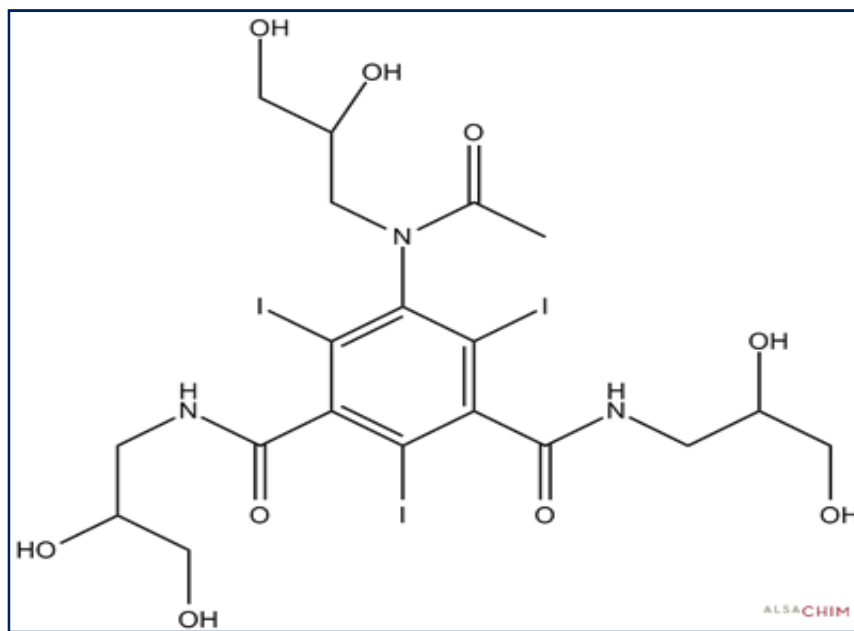
Figure 4 : image de l'iohexol

b- Structure d'iohexol

La structure de base des PCI hydrosolubles (seuls utilisés en angiographie et scanner) est un composé organique de type cycle benzénique sur lequel sont fixés trois atomes d'iode en position 2, 4 et 6. La fixation de l'iode est covalente, et de ce fait solide.

Ce produit est un monomère non ionique et en solution, pour trois atomes d'iode, ne comportent qu'une particule osmotiquement active avec rapport iode/particule 3 rapport iode/particule 3/1.

3 atomes d'iode / 1 particule



Iohexol, N, N' - Bis (2,3-dihydroxypropyl)-5-[N- (2,3-dihydroxypropyl acetamido)]-2, 4,6-triiodo-isophthalamide

Figure 5 : structure de l'iohexol

Formule chimique: $C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$

Masse molaire : 821.14 g.mol⁻¹

L'iohexol est incolore, hydrosoluble et stable dans de bonnes conditions de conservation : à l'abri de la chaleur mais également de la lumière et des rayons X (les rayonnements électromagnétiques étant susceptibles de fragiliser la liaison iode – noyau benzénique, avec apparition de iodures).

Les PCI sont inertes et soumis aux seules forces osmotiques. Leur taille permet une diffusion à travers les membranes basales capillaires selon un gradient de concentration, à l'exception de la barrière hémato-encéphalique.

V- indication thérapeutique d'iohexol

a- Composition qualitative et quantitative

Substance active	Dosage	Quantité par ml
Iohexol	180 mg I/ml	388 mg, soit 180 mg I
Iohexol	240 mg I/ml	518 mg, soit 240 mg I
Iohexol	300 mg I/ml	647 mg, soit 300 mg I
Iohexol	350 mg I/ml	755 mg, soit 350 mg I

L'osmolalité et la viscosité d'Omnipaque sont les suivantes:

Concentration (mg I / ml)	Osmolalité* (Osm/kg.H ₂ O) 37 °C	Viscosité (mPa.s)	
		20°C	37°C
180	0,36	3,2	2,0
240	0,51	5,6	3,3
300	0,64	11,6	6,1
350	0,78	23,3	10,6

Figure 6 :L'osmolalité et la viscosité d'Omnipaque

b- Posologie et mode d'administration

La posologie dépend du type d'examen, de l'âge, du poids, du débit cardiaque et de l'état général du patient. Normalement, on recommande d'administrer la même concentration d'iode et le même volume, qu'avec les autres produits de contraste radiographiques iodés actuellement utilisés.

Une hydratation adéquate est nécessaire, avant et après l'administration du contraste. Cette précaution vaut également pour les autres produits de contraste.

Utilisation par voie intraveineuse, intra-artérielle et intrarachidienne, ainsi que dans les cavités naturelles. [13]

c- Principaux effets indésirables des PDCI :

· Effets liés à l'osmolalité : sensation de chaleur ou de douleur, effets hémodynamiques.

- Risque de thrombose.
- Risque allergoïde.
- Extravasation de PDCI.

Remarque : les effets indésirables peuvent survenir dans les 60 minutes qui suivent l'examen radiologique (effets immédiats) ou dans les 7 jours suivants (effets retardés).

VI- Iohexol et son intérêt dans l'évaluation de l'insuffisance rénale

La détermination du débit de filtration glomérulaire (DFG) joue un rôle important dans la pratique néphrologique quotidien. En effet, sa détermination est cruciale pour diagnostiquer des maladies rénales.

a- Choix du marqueur de filtration

Plusieurs étapes sont nécessaires pour parvenir à un taux de filtration glomérulaire fiable. Le premier point est la sélection du marqueur de filtration glomérulaire, la substance qui sera surveillée afin de déterminer le taux de filtration. Les caractéristiques idéales de la substance à surveiller, afin d'évaluer le taux de filtration glomérulaire sont à apparaître de manière endogène dans le plasma à une vitesse constante, de filtré librement par le glomérule sans absorption du tubule rénal ou la sécrétion et sans élimination extra- rénale.

Cette substance idéale existe mais est exogène : l'inuline (un polymère de fructose). La clairance rénale de l'inuline est ainsi le pour la mesure de la DFG. Cependant, son application est coûteuse et fastidieux. De plus, l'inuline n'est pas toujours facilement disponible sur le marché. Le marqueur le plus utilisé dans la pratique clinique est endogène et est sérum créatinine. , elle n'est pas conforme à l'ensemble des ces dernières fonctions et il est en effet un mauvais marqueur de DFG,

en particulier dans une certaine population spécifique, comme les patients obèses, anorexiques et transplantés. Chez ces patients spécifiques et dans les études cliniques néphrologiques, une précise Mesure du DFG est nécessaire. Comme mesure de la clairance de l'inuline n'est pas facile.

Les agents de contraste comme iohexol (N , N'-bis (2,3- dihydroxypropyl) -5 - (N- 2 ,3- dihydroxypropyl) acétamido) - 2, 4,6- triiodoisophtalamide) sont également disponibles et ont les caractéristiques de le marqueur idéal avec étant facilement disponible et sûre . Ainsi clairance de la iohexol remplace clairance de l'inuline comme marqueur de choix pour estimation de DFG.

b- Mesure de DFG par l'iohexol

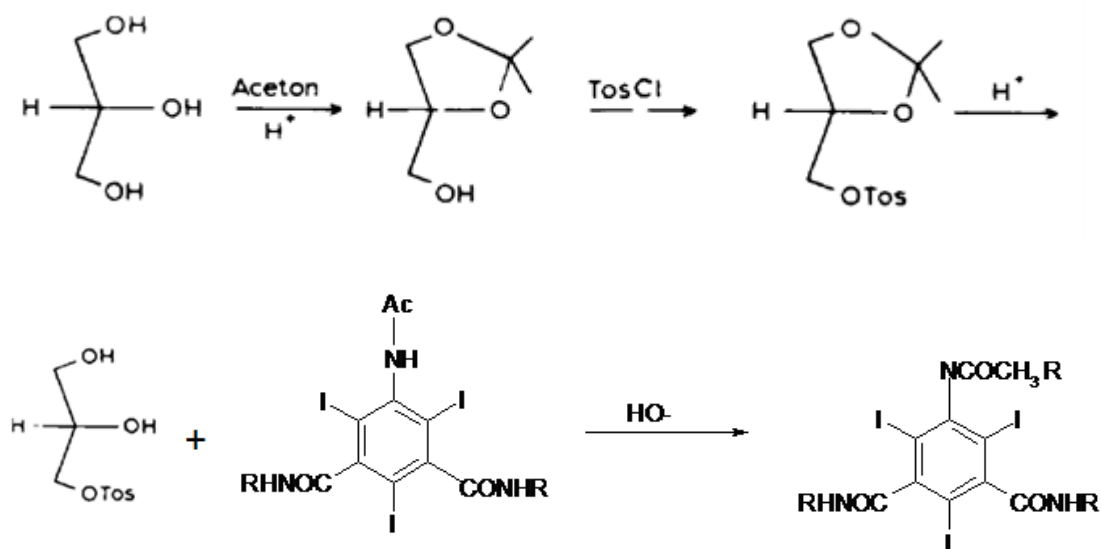
Une fois le marqueur idéal a été choisi, la prochaine étape est le développement d'une méthode d'analyse quantitative précise pour obtenir les valeurs de concentration fiables de ce marqueur dans le sérum.

L'iohexol avec le nom de marque d'OmnipaqueTM a un poids moléculaire de 821 Da. Il est communément utilisé comme un contraste aux rayons X un agent de support non- ionique [5] et pour la mesure du DFG. Iohexol ne lie pas aux protéines sériques et est filtré à travers glomérule à 100%, sans indication de la sécrétion tubulaire ou réabsorption. Par conséquent, la clairance de la iohexol devrait représenter la valeur de DFG et ce qui rend iohexol un marqueur idéal pour la détermination. [13]

VII- Synthèse d'iohexol

Méthode 1

Dans une synthèse en trois étapes le glycérol efficace a été converti en d-tosyl glycérol (rendement: 77%), à partir de laquelle iohexol était préparé dans un rendement radiochimique globale de 25%. le rendement global a diminué 4%, mais une iohexol pur à 99% de avec une activité spécifique de 1 Ci / mmol a été obtenu. [14].



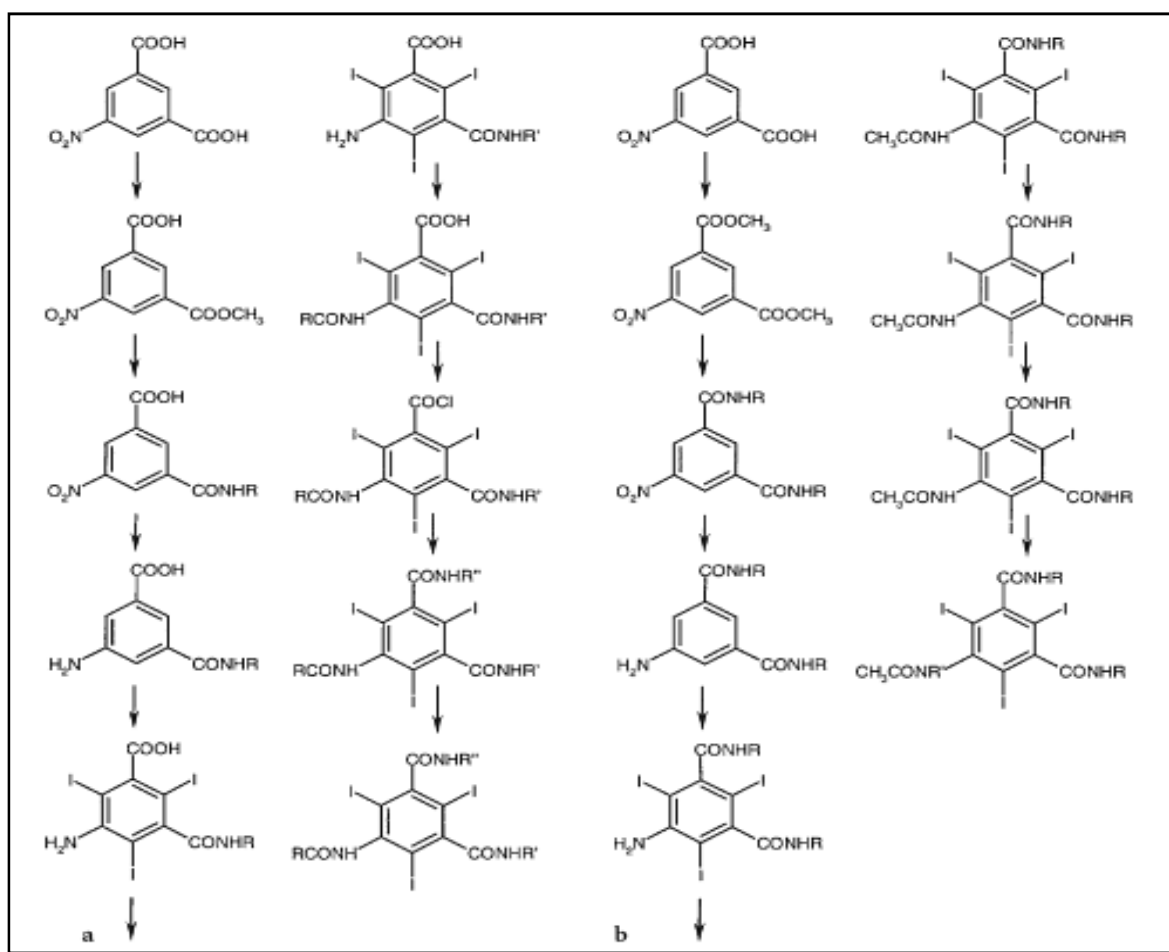
R = 2,3-propanediol

Schéma 1 : synthèse de iohexol a partir de glycérol

b- Méthode 2

L'étape la plus importante dans la synthèse des produits de contraste iodés est l'introduction de l'iode dans la molécule qui est introduite soit par une réaction de substitution ou par réaction d'addition.

L'iodation des doubles liaisons pour la synthèse de Lipiodol (formulation de lipides iodés) est réalisée soit par action, de I₂, de ClI ou de HI en présence de ICH₂SO₃Na [15] (schéma ci dessous) :



R = R' = 2,3-propanediol

Schéma 2 : synthèse de l'iohexo

VIII- Dosages par spectrophotométrie UV-Visible

1- Principe

La spectrophotométrie UV / Visible repose sur l'interaction du rayonnement électromagnétique et de la matière dans le domaine s'étendant du proche UV au très proche R soit entre 180 et 1100 nm.

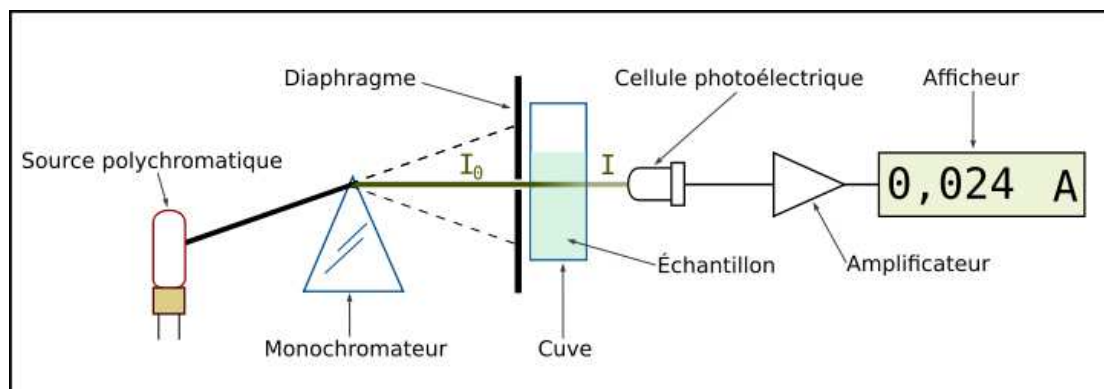


Schéma 3 : décrivant le fonctionnement d'un spectrophotométrie UV-Visible

Cette partie du spectre est relativement pauvre en informations sur la structure des composés moléculaires. En revanche, l'absorbance des composés dans le proche UV et le visible est exploitée en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert.

La méthode s'applique non seulement aux composés qui présentent une absorption dans le visible mais également aux composés dont un dérivé obtenu par une réaction chimique présente une telle absorption.

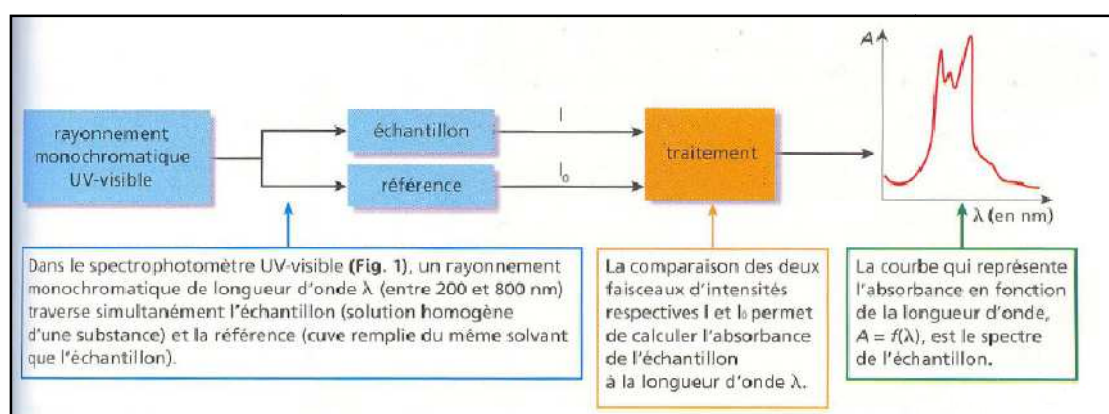


Schéma 3 : principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre

Une source de lumière est rendue monochromatique à travers un système dispersant (prisme) ou un système diffractant (réseau). Le faisceau est dédoublé. Un faisceau traverse la cuve et l'autre sert de référence (passe à travers une cuve de solvant). Un photomultiplicateur enregistre le spectre de transmission $T = I / I_0$ puis traite l'information de façon à donner l'absorption. Le spectre est ensuite affiché et traité par un ordinateur qui détermine les différentes longueurs d'onde d'absorption maximale ainsi que les absorptions correspondantes.

2- Loi de Beer-Lambert

Loi qui traduit la relation entre l'absorbance, et la concentration de solution traversée par la lumière dans la cuve de mesure.

$$A = \log I_0/I \text{ (nbr sans unité)}$$

$$\text{Loi de Beer-Lambert : } A = \epsilon l c$$

C : concentration molaire de la solution (mol.L^{-1})

L : épaisseur de la cuve (cm)

ϵ : coefficient d'absorption molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) qui dépend de la substance, mais aussi de λ . [16].

IX- Validation des méthodes analytiques :

1- Définition et but de la validation

La validation est l'ensemble des opérations pour prouver que la méthode de dosage est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé [17]

En effet la validation d'une méthode peut être définie comme une démarche critique visant à s'assurer de sa qualité ; elle est aussi un processus dynamique qu'on peut adapter en fonction des conditions dans les quelles elle opère.

2- Critères de validation

La validation d'une méthode en bio-analyse comprend une succession de procédures qui a pour objectif de démontrer que la méthode utilisée permet de quantifier un analyte dans une matrice particulière pour une application précise. [14]

- **Spécificité**

La spécificité est la capacité à établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants présents. Il s'agit de démontrer que la substance analysée au sein de la matrice est bien l'analyte recherché se fonde sur une absence d'interférences

- **Fidélité**

Expression quantitative de la précision lorsque le même opérateur applique la méthode avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs, au cours de la même série d'analyses.

- **En pratique**

La fidélité est déterminée par le dosage d'échantillon contrôle-qualité de concentrations connues à doser dans la matrice, par rapport à une gamme d'étalonnage, six fois le même jour et au moins six fois à des jours différents, trois niveaux de concentration sont étudiés et le coefficient de variation $CV < \text{ou} = 20\%$). [14]

- **Linéarité**

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

- **En pratique**

Trois gammes de concentration sont préparées à partir de la même solution mère et analysées le même jour pour déterminer la justesse de valeurs obtenues

- Une droite d'étalonnage est extrapolée à partir de chaque gamme, représentant la concentration en fonction de l'absorbance.

- o La pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination doit être comparé à 1 par un test t de student

- **Justice**

La justice est définie comme l'écart entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et une valeur de référence acceptée.

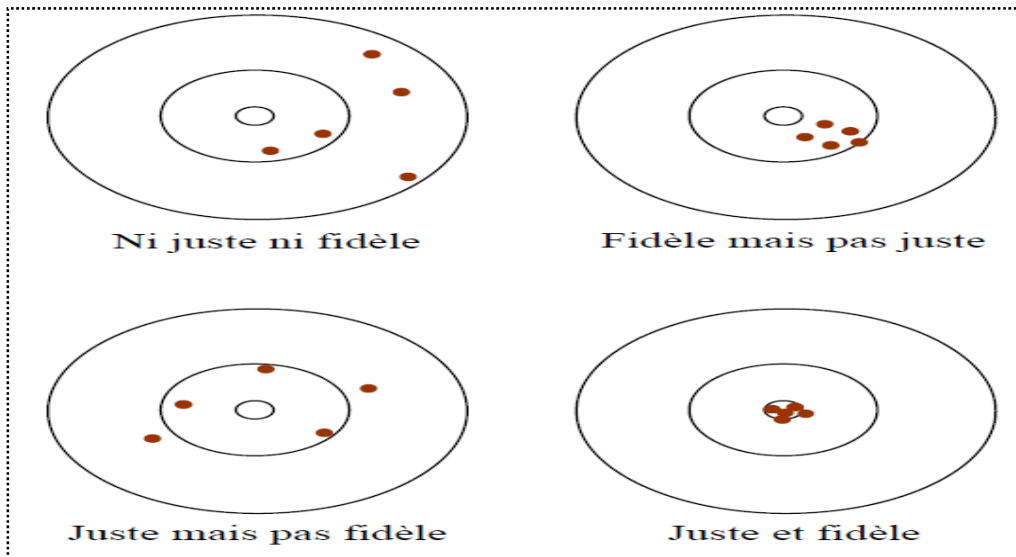


Figure 7 : Image des notions de justesse et de fidélité

. En pratique

La justesse est vérifiée par recouvrement >ou = 80% ou Biais < ou = 20%.

Nous comparons pour les trois déterminations de chaque point de gamme la moyenne obtenue (m) à la valeur attendue (v) selon

$$\text{Recouvrement (\%)} = X_c / X_i * 100$$

$$\text{Biais} = \frac{X_c - X_i}{X_i} * 100$$

Avec :

X_c : Concentration calculée

X_i : concentration introduite

- **Limite de détection**

La limite de détection est le plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc réalisé dans la meilleure condition. C'est la quantité minimale détectable pour laquelle la réponse (en signal mesuré) peut être distinguée avec une probabilité donnée d'un blanc. [17]

[CHU Amiens 2011]

- **Limite de quantification d'une méthode (LQM)**

La limite de quantification correspond à la plus petite valeur exprimée en concentration. C'est la valeur pour laquelle le CV et l'écart à la valeur théorique sont inférieure à la limite d'acceptabilité. (Souvent : recouvrement $>$ ou $=$ 80% ou Biais $<$ ou $=$ 20% CV $>$ 20%). [17]

- **En pratique**

- Le premier point de la gamme d'étalonnage correspond le plus souvent au seuil de quantification.
- Il peut être déterminé en réalisant des essais de respectabilité et de fidélité intermédiaire sur des concentrations de plus en plus faibles. [CHU

AMIENS 2011]

I- Objectif du travail

Les objectifs de notre travail c'est de valider la méthode du dosage par spectrophotométrie UV de « iohexol » pour démontrer que la procédure correspond à l'usage auquel elle est destinée.

1- L'appareil spectrophotomètre

Un spectrophotomètre est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution, à condition de se placer à la longueur d'onde à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux. C'est pourquoi la longueur d'onde est réglée en fonction de la substance dont on veut connaître la concentration.

Spectromètre JASCO V 530 série .avec les paramètres suivants : band width : 2 nm ; réponse : médium ; measurement range : 1000-200nm ; data pitch : 1nm.



Figure 8 : Spectrophotomètre UV-Visible

II- Matériels et méthodes

1- Réactifs

- ▶ Iohexol (omnipaque 300 mg/ml d iode)
- ▶ Eau : PI

2- Matériels

- ▶ Micropipette
- ▶ Tubes à vortex

- ▶ Des béchers
- ▶ Cuve photométrique OS (verre) de 10 mm diamètre.

3- Spectromètre

Méthode

A partir d'une solution d'iohexol à 300 mg/ml, une gamme d'étalonnage est préparée dans des tubes (15ml).

a- Application du dosage

Pour effectuer le dosage nous avons besoin de 2 cuves

- une cuve où le produit dont on veut le spectre est dilué dans un solvant
- une cuve de solvant pur qui servira de référence (appelé le " blanc ")

Le blanc est nécessaire. En effet, si le solvant absorbe dans le domaine de longueur d'onde choisit pour tracer le spectre, on va avoir superposition des courbes. Le spectrophotomètre fait la différence des deux signaux de transmission : il ne reste plus que le spectre du produit dilué.

b- Détermination de la longueur d'onde maximale

Certes, la question qui se pose est : à quelle longueur d'onde allons- nous réaliser notre mesure ?

Pour répondre à cette question nous allons effectuer des mesures d'absorbance d'une solution dosée à 65µg/ml (100 µl SM+900 µl d'eau PPI) d'iohexol, préparé dans un tube.

On réalise par la suite un balayage de 220 nm à 400 nm, la zone du spectre de notre iohexol.

c- Préparation de la solution mère

- ❖ 100 µl de la solution d'omnipaque de 300 mg/ml dans 900 µl Eau distillé PPI

Calculs de la concentration

L'équation d'équivalence on a

$$C_0V_0=C_fV_f$$

$$V_0= C_fV_f/C_0 \quad V_0= 0.008*5/30$$

$$V_0 = 0.001$$

Avec $C_f = 0.008$ mg/ml et $v_f = 5$ ml et $C_0 = 30$ mg/ml la concentration de la SM

	Solution 1	Solution 2	Solution 3	solution 4	Solution 5	Solution 6	Solution 7
Concentration de la solution filles (mg/ml)	0.008	0.016	0.032	0.064	0.108	0.216	0.433
Volume de SM (ml)	0.001	0.002	0.005	0.01	0.018	0.036	0.072
Volume ajouté d'eau ml	4.999	4.998	4.950	4.99	9.82	4.964	4.92
Volume totale (ml)	5	5	5	5	5	5	5

Tableau 1: tableau représentant la concentration de la gamme d'étalonnage

2- Résultat et discussion

Pour les différents spectres obtenus, on constate une légère fluctuation de la valeur de la longueur d'onde maximale autour de 300 nm, valeur que nous allons retenir comme longueur d'onde maximale pour le reste des mesure.

- 1 er la gamme d'étalonnage

	Concentration μ l/ml	Absorbance
S1	0.008	0.0293
S2	0.016	0.1265
S3	0.032	0.2513
S4	0.064	0.3021
S5	0.108	0.4623
S6	0.216	0.6347
S7	0.432	1.1756

Tableau 2 : tableau representant les concentration en fonction de l'absorbance

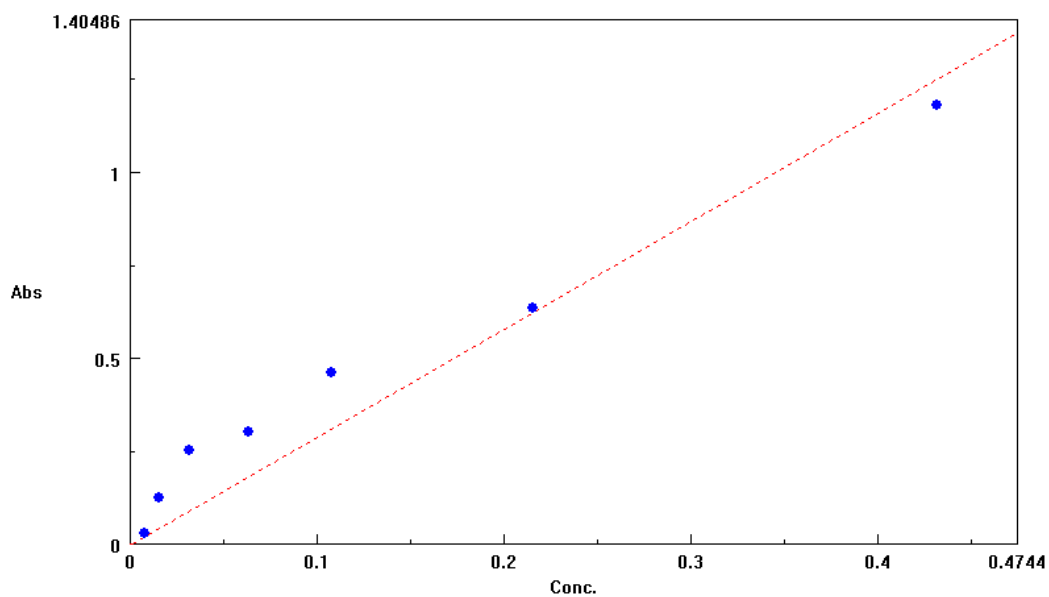


Figure 9 : courbe representant les concentration en fonction de l'absorbance

- 2 éme la gamme d'etalonnage

Solution	Concentration	Absorbance
1	0.008	0.0182
2	0.016	0.12311
3	0.032	0.1859
4	0.064	0.1914
5	0.108	0.3830
6	0.216	0.6410
7	0.432	1.3057

Tableau 3: tableau representant les concentration en fonction de l'absorbance

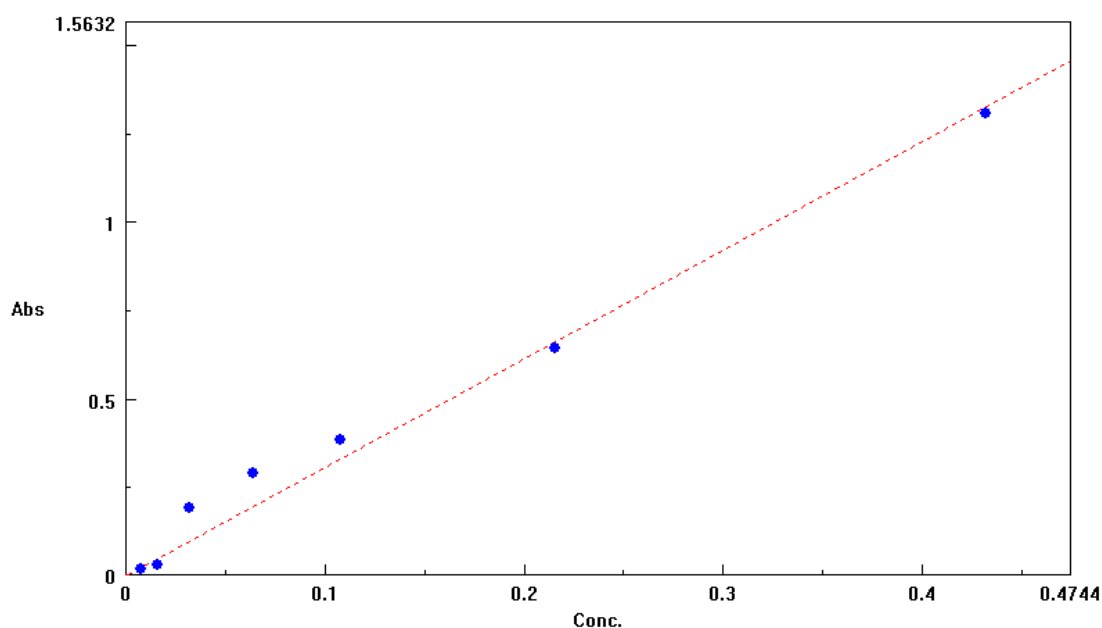
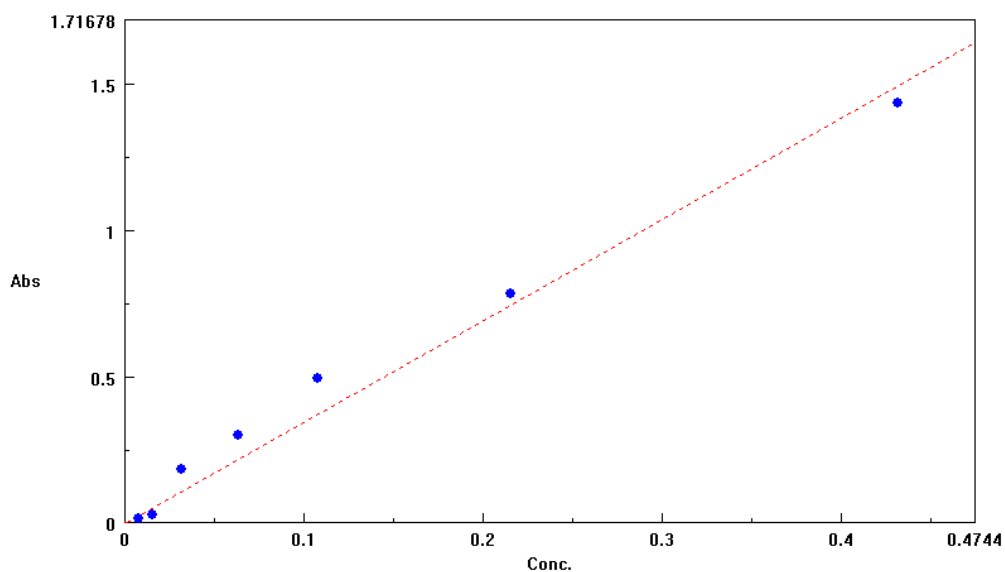


Figure 10 : courbe representant les concentration en fonction de l'absorbance

- 3^{ème} la gamme d'étalonnage

Solution	Concentration	Absorbance
1	0.008	0.0141
2	0.016	0.0279
3	0.032	0.1849
4	0.064	0.2983
5	0.108	0.4946
6	0.216	0.7849
7	0.432	1.430

Tableau 4: tableau représentant les concentration en fonction de l'absorbance



Figure

11: courbe représentant les concentration en fonction de l'absorbance

1- Validation de la méthode analytique :

La validation permet d'étudier les différents critères de fiabilité de la méthode.

Les résultats de la validation de la méthode spectrophotométrie UV optimisée sont évalués selon les critères suivants :

❖ Linéarité :

Nous avons utilisé 7 niveaux de concentration, répétée trois fois.

Concentration	Moyenne de l'absorbance
0.008	0.0207
0.016	0.06183
0.032	0.2092
0.064	0.2639
0.108	0.4466
0.216	0.6868
0.432	1.3037

Tableau 5: tableau de la concentration en fonction de l'absorbance moyenne

R² : Coefficient de corrélation

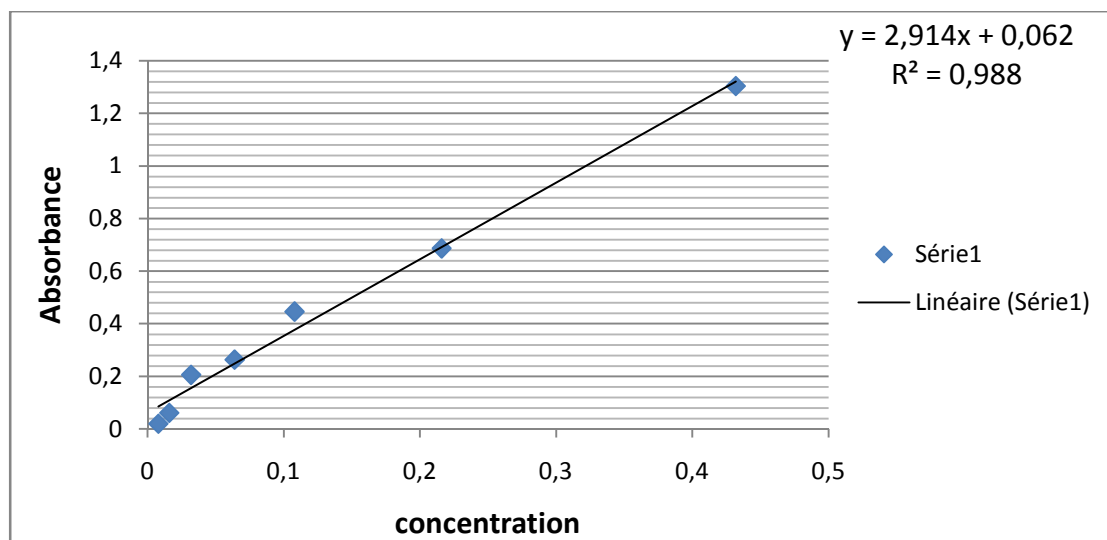


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de linéarité absorbance en fonction de la concentration)

Diagramme montrant l'existence d'une corrélation linéaire entre absorbance UV à 300 nm et la teneur en iohexol.

Les résultats obtenus démontrent une bonne linéarité : $Y = 2.912X - 0,063$ avec un coefficient de détermination qui est égale à 1 ($R^2 = 0.99$).

❖ Spécificité

Une méthode est **spécifique** si elle produit une réponse uniquement pour l'analyte d'intérêt

Le chromatogramme ci-dessus montre qu'il n'y a aucune interférence avec la molécule à la longueur d'onde de l'iohexol 300 nm (λ_{max}).

❖ La fidélité : Répétabilité :

Afin d'évaluer la répétabilité, des calculs ont été effectués et les résultats correspondants figurent dans le tableau 3 :

Coefficient de variation (CV) : Le coefficient de variation est défini comme le rapport entre l'écart-type s et la moyenne \bar{x} :

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

- s : l'écart-type \bar{x} : la moyenne

➤ $Ecart\ type = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$ avec $\bar{x} = \text{moyenne} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$

Niveaux ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Répétabilité		
	Absorbance 1	Absorbance 2	Absorbance 3
0.008	0.0293	0.0182	0.0141
Moyenne	0.0207		
Ecart type	0.0067		
CV%	3.2367		
0.016	0.1265	0.12311	0.0279
Moyenne	0.0901		
Ecart type	0.0860		
CV%	9.1547		
0.032	0.2513	0.1859	0.1849
Moyenne	0.2073		
Ecart type	0.0310		
CV%	14.98		
0.064	0.3021	0.1914	0.2983
Moyenne	0.2639		

Ecart type	0.0513		
CV%	19.44		
0.108	0.4623	0.3830	0.4946
Moyenne	0.4466		
Ecart type	0.0466		
CV%	10.43		
0.216	0.6347	0.6410	0.7849
Moyenne	0.6868		
Ecart type	0.0693		
CV%	10.10		
0.432	1.1756	1.3057	1.430
Moyenne	1.3037		
Ecart type	0.1038		
CV%	0.0796		

Tableau 3 : Résultats de la Répétabilité

La répétabilité est évaluée par le calcul du coefficient de variation. Ce dernier est inférieur à 20% confirmant que la méthode est répétable.

❖ **La justesse :**

La justesse ou le biais, différence moyenne entre la valeur calculée par une méthode de dosage et celle introduite par la méthode de référence.

	A Sample ID	B Conc.	C Abs	D 300 nm	E	F	G
1	2-01	0.009	0.0176	0.0181			
2	3-01	0.017	0.0179	0.0184			
3	4-01	0.035	0.3754	0.3759			
4	5-01	0.067	0.1452	0.1457			
5	6-01	0.114	0.3315	0.3320			
6	7-01	0.220	0.4213	0.4218			
7	8-01	0.460	1.1967	1.1972			

Tableau La concentration calculée

Niveaux de concentration	Concentration introduite (mg/ml)	Concentration calculée (mg/ml)	Recouvrement %
Niveaux 1	0.008	0.009	112.5
Niveaux 2	0.016	0.017	106.3
Niveaux 3	0.032	0.035	109.4
Niveaux 4	0.064	0.067	105
Niveaux 5	0.108	0.114	106
Niveaux 6	0.216	0.220	102
Niveaux 7	0.432	0.460	106.5

Tableau : calcul de biais de la méthode et la recouvrement

D'après les résultats obtenus au tableau, on remarque bien que la méthode est bien juste. En effet la valeur moyenne de la justesse est supérieure à 80% .

❖ **La limite de détection et la limite de quantification :**

La limite de détection et la limite de quantification sont calculées à partir de la droite de régression $y = ax + b$ en traçant les concentrations introduite en fonction des concentrations calculées:

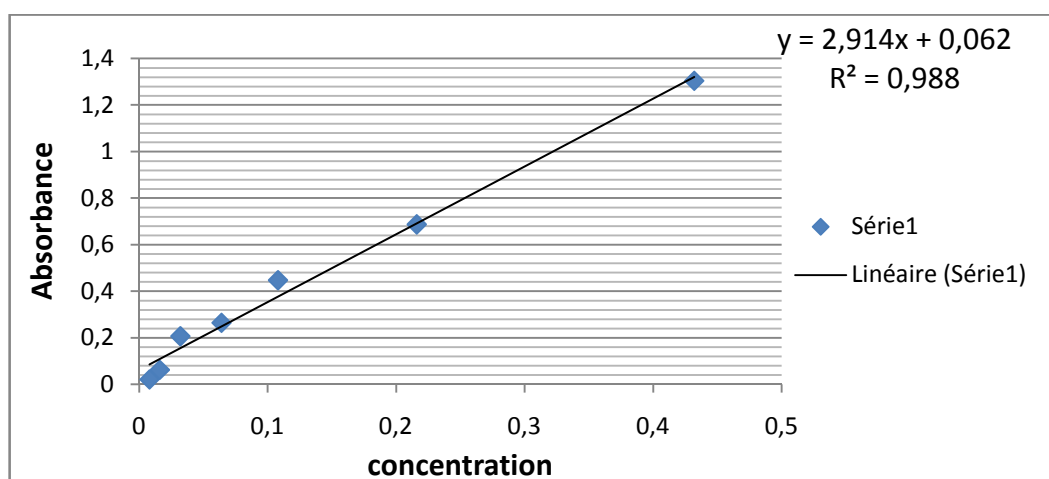


Figure 14 : Droite de régression (concentration théorique en fonction de concentration observée)

- ❖ LD : Plus petite quantité d'analyte dont on puisse dire avec un niveau de confiance donné qu'il est présent dans l'échantillon
- ❖ LQ : Plus petite quantité d'analyte qui peut être quantifiée avec un niveau de confiance donné.

- Elle est estimée en tenant en compte la droite de régression $y=ax+b$:

➤ **Limite de détection LD :**

$$LD = \frac{(b + (3 \times Sb))}{a}$$

Avec Sb = Ecart type de l'origine à l'ordonnée

➤ **Limite de quantification LQ :**

$$LQ = \frac{(b + (10 \times Sb))}{a}$$

LDD	0.028 mg/ml
LDQ	0.044 mg/ml

Ces résultats peuvent que des petites concentrations de la molécule iohexol peuvent être analysé.

CONCLUSION

Ce travail nous a permis de mieux comprendre la validation analytique d'une méthode de dosage de l'iohexol par spectrophotométrie UV-visible.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la longueur d'onde maximale d'absorption qui est fixée à 300nm.

En deuxième lieu, nous avons effectué un plan d'étalonnage et de validation pour pouvoir estimer le biais de la méthode, les résultats obtenus après études des critères de validation par utilisation d'Excel, se résument comme suit :

- ▶ La linéarité est vérifiée le coefficient de détermination qui est proche de 1.
- ▶ La fidélité est vérifiée par le calcul du coefficient de variation de répétabilité
- ▶ La justesse est vérifiée par recouvrement $\geq 80\%$ et Biais $\leq 20\%$.
- ▶ Suite à ces résultats satisfaisants, on peut confirmer que la méthode d'analyse de l'iohexol dans l'eau par spectrophotométrie UV est apte à être appliquée.

Référence

- ❖ [1] Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (Anaes). *Diagnostic de l'IRC chez l'adulte. Recommandations, septembre 2002.*
- ❖ [2] The ad-hoc working group of ERBP : Fliser D, Laville M, Covic A, Fouque D, Vanholder R, Juillard L, Van Biesen W. *A european renal best practice (ERBP) position statement on the kidney disease improving global outcomes (KDIGO) clinical practice guidelines on acute kidney injury : Part 1 : definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2012;0:1-10 (ref doi : 10.193/ndt/gfs375).*
- ❖ [3] Saudan P, Halabi G, Perneger T, Wasserfallen J-B, Kossovsky M, Feldman H, et al. *Variability in quality of care among dialysis units in Western Switzerland. Nephrol Dial Transplant 2005;20:1854–63.*
- ❖ [4] ANDREW TAYLOR STILL, *Osteopathy, Research & Practice, printed in 1910, The Still Project eBook, <http://www.interlinea.org>, May 1, 2005*
- ❖ [5] Morcos S. *Radiological contrast media. In: Dukes M, Aronson J, editors. Meyler's side effects of drugs. 14th Ed. Elsevier; 2000. p. 1596–7.*
- ❖
- ❖ [6] *Service évaluation des actes professionnels / décembre 2011*
- ❖ [7] Pizzarelli F, Lauretani F, Bandinelli S, Windham GB, Corsi AM, Gianelli SV, et al. *Predictivity of survival according to different equations for estimating renal function in community dwelling elderly subjects. Nephrol Dial Transpl 2009;24:1197–205.*
- ❖ [8] Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. *Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from kidney disease : Improving global outcome (KDIGO). Kidney Int 2005;67:2089-100.*
- ❖ [9] Stevens LA, Coresh J, Greene T et al. *Assessing kidney function-measured and estimated glomerular filtration rate. N Engl J Med 2006;354:2473-2482.*
- ❖ [10] Rahn KH, Heidenreich S, Bruckner D. *How to assess glomerular function and damage in humans. J Hypertens 1999; 17 : 309-17.*
- ❖ [11] Froissart M, Rossert J, Jacquot C, Paillard M, Houillier P. *Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function. J Am Soc Nephrol 2005;16(3):763-73.*

- ❖ [12] *Coudert P, Rubat C, Chopineau J. Les produits de contraste iodés : caractéristiques physicochimiques. Actual Pharm 1999;372:17–9. [7] Katayama H, Yamaguchi K, Kozucka T, Takashima T, Seez P, Matsuura K. Adverse reactions to ionic and nonionic contrast media. Radiol 1990;175:621–8.*
- ❖ [13] *Morcos S. Radiological contrast media. In: Dukes M, Aronson J, editors. Meyler's side effects of drugs. 14th Ed. Elsevier; 2000. p. 1596–7.*
- ❖ [14] *Sortland O., Lundervold A. and Nesbakken R. , Acta Radiol.(Suppl.) -335, 403 (1977).*
- ❖ [15] *Contrast Agents II: Optical, Ultrasound, X-Ray Imaging and Radiopharmaceutical Imaging*
- ❖ [16] *Analyse Chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6ème édition F. Rouessac, A. Rouessac, D. Cruché ; Dunod, Paris (2004)*
- ❖ [117] *Ph.hubert, et coll.STP Pharma Pratiques, 13,101-138(2003)*
- ❖ [18] *Ph.hubert, et coll.STP Pharma Pratiques, 16,28-58(2006)*
- ❖ [19] *Procédure générale de validation d'une méthode quantitative en toxicologie et suivi thérapeutique et Pharmacologique. CHU AMIENS Picardie 2011*