
Année universitaire : 2011-2012



Licence en Biologie et Santé

Projet de fin d'études:

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

Présenté par :

DAHA Hanae.

Encadré par :

✚ Pr. EL. ABIDA Kaouakib: FST Fès.

✚ Pr. KHABBAL Youssef: CHU Hassan II-Fès.

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

✚ Pr. EL. ABIDA Kaouakib : Présidente.

✚ Pr. KHABBAL Youssef : Examineur.

✚ Pr. MAAZOUZI Nadia : Examinatrice.

Stage effectué au laboratoire de pharmacologie au CHU Hassan II-Fès.

Remerciements

Je profite de cette occasion pour exprimer mes profonds remerciements à toute personne qui a participé à la réalisation de ce travail.

Un grand remerciement à Madame EL. ABIDA Kaouakib, pour le temps consacré, pour son effort, ses enseignements, ses conseils et sa disponibilité.

A Pr KHABBAL Youssef, qui, malgré ses innombrables occupations, a accepté de diriger ce mémoire. Je salue sa rigueur scientifique qu'il a maintenue tout au long de ces deux mois de stage.

Je remercie Pr. MAAZOUZI Nadia d'accepter d'évaluer ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à

Mr. ERRESFA, chef du laboratoire de pharmacologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie, qui a accepté de m'accorder ce stage dans son laboratoire.

J'adresse mes remerciements aussi à Mr. EL Atari pour son aide et ses conseils.

Sans oublier les professeurs de ma faculté des Sciences et Techniques, plus particulièrement ceux du département de Biologie et Santé artisans de notre formation universitaire, et personnellement à Mr. TAZI Abdelali, notre chef de département.

Dédicaces

Au meilleur Papa dans ce monde et au meilleure
Maman,

Les mots me manquent pour vous qualifier, tout ce que j'aurais à dire ne saurait exprimer à fond tout le sacrifice et l'endurance que vous avez du subir pour m'élever.

Vous avez fait toujours plus que vos efforts pour me facilitée la vie au maximum et rendre tout a ma portée et facile à avoir et grâce a vos conseils et vos soutiens que j'ai pu réaliser ce travail. Toutes les dédicaces du monde ne peuvent vraiment exprimer mes sentiments.

A mon frère Amine et ma sœur Kenza,

Je vous dédie ce travail et pour vous exprimer mes remerciements d'être compréhensifs et patient tout ces deux mois.

A une personne très spéciale ; Oussama,

Je te dédie ce travail et je te représente mes chaleureux remerciements pour le temps que tu me donnes, pour ta patience et ta générosité. T'étais toujours là pour m'aider et me soutenir à tout moment.

A mes oncles et mes tantes,

Pour tant de confiance, d'amour et de tendresse, je vous dédie ce travail.

A mes grands parents,

Pour vos prières et votre bénédiction, qui ont été un sur plus sur celui de mes parents.

A mes amies,

Pour les bons moments qu'on a passés ensemble.

Sommaire

Introduction	1
Partie théorique	2
Synthèse bibliographique	3
I-Les psychotropes	3
1- Définition	3
2- Classification	3
3- Mécanisme d'action	4
II-Les neuroleptiques	6
1- Définition	6
2- Effets pharmacologiques	7
a- Effets précoces	7
b- Effets prolongés	8
3- Pharmacocinétique	8
4- Pharmacodynamique	8
5- Classification	9
a- Selon les effets cliniques	9
b- En fonction de la puissance	10
c- Selon leur structure chimique	10
III-Les phénothiazines	11
1- Définition	11
2- Pharmacocinétique	11
IV-La chlorpromazine	13
a- Indications thérapeutiques	14
b- En cas de surdosage	14

c- Les effets secondaires possibles de la chlorpromazine	14
Validation statistique	16
I-Le processus de validation d'une méthode d'analyse	16
1- Définition	16
2- Types de validation	17
II-Les performances statistiques d'une méthode de mesure basée sur la courbe d'étalonnage	18
1- La sensibilité	18
2- La linéarité	18
3- La limite de détection, la limite de quantification	18
4- La fidélité: répétabilité	19
Rappels statistiques	20
1- La moyenne	20
2- La variance	20
3- L'écart-type	20
4- La loi normale/ loi gaussienne/ loi de Laplace-Gauss	21
5- Le test de Dixon	21
6- La loi de Student	22
7- Le coefficient de corrélation	22
8- Le coefficient de détermination	23
9- Le coefficient de variation	23
Matériel et méthodes	24
Matériel	25
1- Introduction du sujet	25
2- Spectrophotomètre	26
3- Loi de Beer-Lambert	27
4- Les spectres dans l'UV/ visible	28
Méthodes	28
1- Protocole de fabrication de FPN	29
a- Solutions mère	29
b- Protocole expérimental	29
2- Etude spectroscopique de l'échantillon	29
Résultats	29
1- Recherche de la longueur d'onde d'absorption	29
2- Droite d'étalonnage	30
a- Sensibilité	32
b- Linéarité	32
c- Limite de détection	34
d- Limite de quantification	35

e- Coefficient de détermination	35
f- Coefficient de corrélation	35
g- Fidélité: répétabilité	36
Discussion	37
Conclusion	38
Annexe	
Références bibliographiques	

Liste des abréviations :

ISO : International Organisation for Standardization :
Organisation International de normalisation.

CHU : Centre Hospitalier Universitaire.

NL : Neuroleptique.

D1, D2 : Récepteurs Dopaminergiques types 1 et 2.

IM : Intra Musculaire.

T $\frac{1}{2}$: Demi-vie d'élimination.

CYP 450 : Cytochrome 450.

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication.

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire.

UV : Ultra-violet.

CEE : Comité d'Etude Européenne.

Nm : Nanomètre 10^{-9} .

Liste des figures :

Figure 1 : Transmission d'influx nerveux au niveau de la synapse.

Figure 2 : Mode d'action des neuroleptiques au niveau des récepteurs.

Figure 3 : Structure chimique des phénothiazines.

Figure 4 : Comprimés de Chlorpromazine (Largactil).

Figure 5 : Structure chimique de la chlorpromazine.

Figure 6 : Loi normale réduite.

Figure 7 : Image du spectrophotomètre UV-Visible, Marque : Jasco, Modèle : 530.

Figure 8 : Schéma d'un spectrophotomètre à double faisceau.

Figure 9 : Gamme d'étalon de la chlorpromazine.

Figure 10 : Courbe d'étalon de la chlorpromazine.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Classification des neuroleptiques selon Lewin, Delay et Deniker.

Tableau 2 : Préparation des étalons.

Tableau 3 : Résultats des absorbances.

Tableau 4 : Résultats des étalons.

Présentation du lieu de stage



CHU HASSAN II-FES

Le secteur de la santé connaît une nouvelle dynamique avec l'ouverture récente du CHU Hassan II à Fès. En effet, cet établissement public couvre les besoins d'une population estimée à plus de 3 millions d'habitants issus des régions de Fès Boulemane, Meknès-Tafilalet et Taza-Al Hoceima-Taounate. Ce centre est l'une des plus grandes infrastructures médicales réalisées au Maroc depuis l'indépendance.

Historique de CHU Hassan II:

Date de création : 30 Août 2001

Date de mise en service : 05 Août 2002

Date de départ au travail : 01 Septembre 2008

Les missions :

- Dispenser des soins médicaux;
- Conduire des travaux de recherche médicale dans le strict respect de l'intégrité physique et morale et de la dignité des malades;
- Participer à l'enseignement clinique universitaire et postuniversitaire médical et pharmaceutique ainsi qu'à la formation du personnel paramédical.

Organisation :

Le Centre Hospitalier Hassan II de Fès est constitué d'une direction et des formations hospitalières composés de :

- Hôpital des spécialités,
- Hôpital mère et enfant,
- Hôpital d'oncologie et de médecine nucléaire,
- Hôpital OMAR DRISSI,
- Hôpital IBN AL HASSAN.

Introduction

La validation des méthodes est demandée lorsque les laboratoires utilisent des méthodes non normalisées ou hors du domaine d'application de la norme (ISO). Les laboratoires d'analyses ont une longue expérience et une longue tradition de validation de leurs méthodes d'analyse mais éprouvant parfois des difficultés pour évaluer l'incertitude de leurs résultats.

Depuis de très nombreuses années, l'approche des analystes a été de caractériser les performances des méthodes, d'analyse en évaluant à travers des travaux expérimentaux des caractéristiques.

Les performances d'une méthode peuvent s'exprimer à l'aide de caractéristiques les plus souvent cités :

- la sélectivité.
- la spécificité.
- la justesse.
- la linéarité.
- la répétabilité.
- la reproductibilité.
- la robustesse.
- les limites de détection et de quantification.

Ces caractéristiques s'évaluent soit en interne, soit de manière collective en impliquant plusieurs laboratoires.

La connaissance des caractéristiques des méthodes est une information tout à fait pertinente pour l'évaluation de l'incertitude des résultats d'analyse.

Dans ce travail, on s'est intéressé à la validation d'un médicament neuroleptique dérivé des phénothiazines : la Chlorpromazine.

Avant de parler de la méthode d'analyse, on va définir tout d'abord les psychotropes, leur classification nous permet d'en parler spécifiquement des neuroleptiques (NL), la classification chimique des neuroleptiques permet de distinguer différentes classes et on va plutôt s'intéresser à la classe des Phénothiazines, pour en parler de son dérivé la Chlorpromazine.

Partie

théorique.

Synthèse bibliographique

I. Les psychotropes : (16)

1. Définition :

De tout temps et dans toutes les sociétés, les individus ont eu recours à des substances psychotropes pour diverses raisons : pour soulager leurs douleurs physiques ou psychologiques, pour établir un lien social, pour mieux dormir ou être plus performant. Ce sont des médicaments qui ont une action sur le psychisme. Ils possèdent des propriétés à la fois sédatives et stimulantes.

→Un psychotrope est une substance chimique qui agit principalement sur l'état du système nerveux central en y modifiant certains processus biochimiques et physiologiques cérébraux, sans préjuger de sa capacité à induire des phénomènes de dépendance, ni de son éventuelle toxicité. En altérant de la sorte les fonctions du cerveau, un psychotrope induit des modifications de la perception, des sensations, de l'humeur, de la conscience ou d'autres fonctions psychologiques et comportementales.

II. Classification :

La classification sur les bases des données pharmacologiques reste d'actualité et permet une approche facile de cette classe de médicaments (classification de Lewin, Delay et Deniker) :

Tableau 1 : Classification des Neuroleptiques selon Lewin, Delay et Deniker

Classes	Exemples
Psycholeptiques ou sédatifs	
-agissant sur la vigilance ou Nooleptiques	
• Hypnotiques	Benzodiazépines
-agissant sur l'humeur ou Thymoleptiques	
• Neuroleptiques	Phénothiazines Butyrophénones Benzamides
• Anxiolytiques	Benzodiazépines
• Thymorégulateurs ou normothymiques	Sels de lithium Carbamazépine
Psychoanaleptiques ou stimulants:	
- Stimulants de l'humeur ou Thymoanaleptiques:	
• Antidépresseurs	IRS et IRSNA Tri et quadricycliques
- Stimulants de la vigilance Nooanaleptiques	Amphétamine et dérivés
- Autres stimulants	Xanthines Acide ascorbique
Psychodysleptiques ou perturbateurs:	
Hallucinogènes ou onirogènes	LSD Mescaline

On distingue **5 classes de Psychotropes** (DELAY et DENIKER) :

- **LES NEUROLEPTIQUES** → Médicaments de la psychose, en général, de la schizophrénie,
- **LES ANTIDEPRESSEURS** → Médicaments de la dépression et des troubles de l'humeur.
- **LES ANXIOLYTIQUES** → Médicaments de l'anxiété, de l'angoisse et des troubles émotionnels.
- **LES HYPNOTIQUES** → Médicaments des troubles du sommeil.
- **LES THYMOREGULATEURS** → Médicaments de la psychose maniaco dépressive et des troubles bipolaires.

2. Mécanisme d'action :

Les informations circulent dans le cerveau sous forme d'un signal électrique bref (influx nerveux) mais la transmission d'un neurone à l'autre au niveau de la synapse est de nature chimique : elle met en jeu des messagers appelés **Neurotransmetteurs ou Neuromédiateurs**.

Les troubles mentaux s'accompagnent d'un dysfonctionnement des circuits neuronaux et les médicaments psychotropes vont réguler ces perturbations en modifiant la concentration d'un ou plusieurs neurotransmetteurs au niveau des synapses.

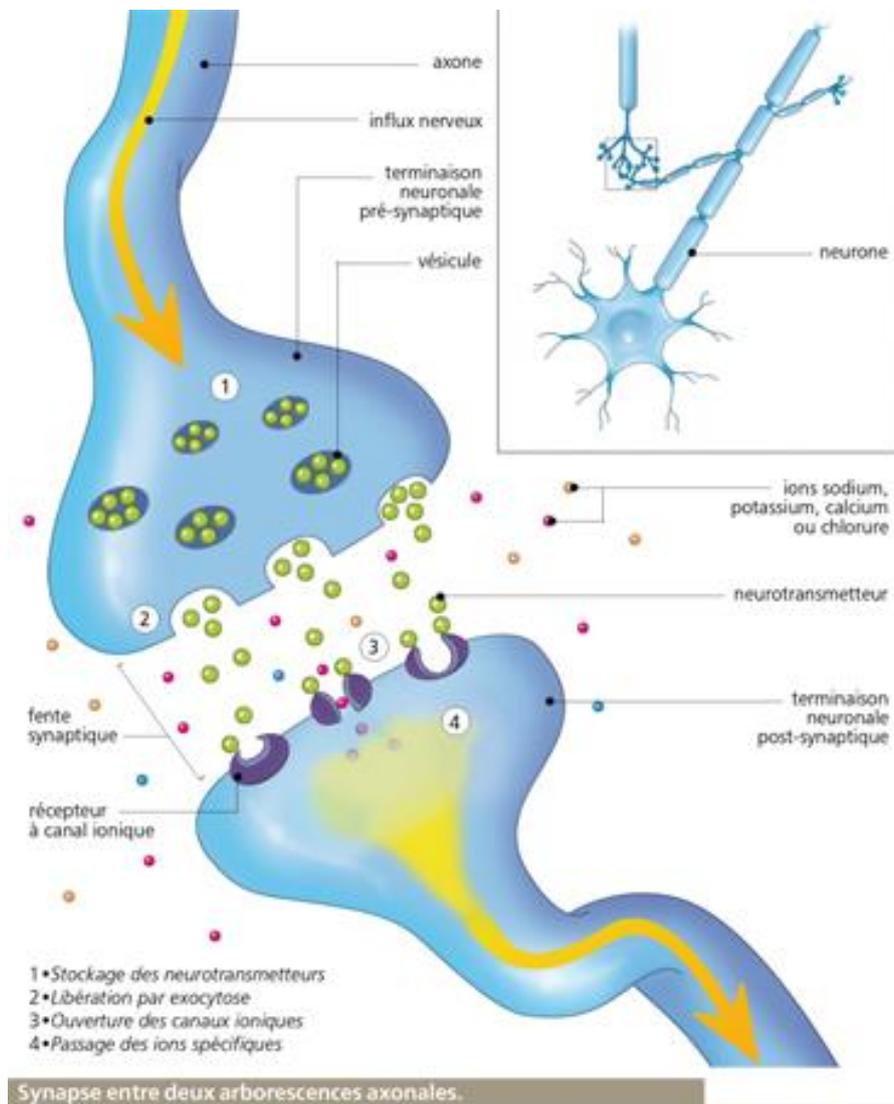


Figure 1 : Transmission d'influx nerveux au niveau de la synapse.

II. Neuroleptiques :

II.1. Définition (NL): (16)

Les neuroleptiques sont des médicaments réducteurs des symptômes psychotiques.

Ayant essentiellement des effets sur le système dopaminergique ; Le système dopaminergique joue également un rôle dans le contrôle de la motricité et dans l'inhibition de la sécrétion de prolactine, à l'origine des effets secondaires de certains neuroleptiques.

Les neuroleptiques peuvent exercer des effets non seulement sur les hallucinations, le délire et l'agitation (effets antipsychotiques, et sédatifs), mais aussi, et de façon plus modeste, sur les symptômes négatifs ou déficitaires de la schizophrénie (effets désinhibiteurs et/ou anti déficitaires). Ce dernier joue un rôle dans la régulation de la vie émotionnelle et le contrôle de la motivation, dans la modulation de la perception, ainsi que dans l'organisation des comportements adaptatifs.

5 critères sont considérés comme indispensables pour qu'une substance soit classée parmi les «neuroleptiques» :

- 1. Création d'un état d'indifférence psychomotrice sans effet hypnotique.**
- 2. Diminution de l'agitation et de l'agressivité.**
- 3. Action réductrice des psychoses.**
- 4. Actions sur manifestations psychomotrices et neurovégétatives.**
- 5. Action sous-corticale prédominante.**

II.2. Effets pharmacologiques :

Les effets psychiques des neuroleptiques peuvent être distingués en fonction du délai d'effet et de sa durée :

a- Effets précoces :

- Action sédatrice : diminution de l'agitation et de l'agressivité avec création d'un état apathique ; les patients sont lents à répondre à des stimulations mais les neuroleptiques n'induisent pas de confusion mentale ni de perte des fonctions intellectuelles (ce qui permet de distinguer l'effet des anxiolytiques et des hypnotiques de celui des neuroleptiques) = calme l'angoisse, l'agressivité.

→ Tous les NL sont sédatifs à doses élevées, mais certains même à faibles doses ont un effet sédatif, ils sont utilisés en urgence ex **NOZINAN**.

- Action anti-agressive.

- Action antipsychotique.
- Action désinhibitrice (aux faibles doses): Capables d'agir davantage sur les symptômes psychotiques déficitaires. Ceci est le cas de divers neuroleptiques à petites doses, en particulier du (Sulpiride), Les neuroleptiques atypiques (Thioridazine) ont l'avantage d'induire moins de symptômes parkinsoniens aux posologies thérapeutiques = contre le repli sur soi, le retrait social, le manque de contact avec la réalité, l'apragmatisme : cet effet est beaucoup moins net.
- Action antiémétique : elle est efficace sur les vomissements induits par l'irradiation, les opiacés ou par certains anticancéreux.

b- Effets prolongés :

- Diminution de l'intensité et de la fréquence des recrudescences délirantes.
- Erosion de la symptomatologie psychotique.
- Diminution de la réaction affective au délire : tension passionnelle, conviction délirante (revendication).
- Apparition d'une indifférence psychique, ou maintien de l'activité désinhibitrice.

II.3. Pharmacocinétique :

La résorption gastro-intestinale des neuroleptiques est extrêmement variable d'un individu à l'autre.

En outre, les neuroleptiques subissent un effet très variable au premier passage hépatique lorsqu'ils sont administrés par voie orale, diminuant ainsi la quantité des neuroleptiques disponible.

Leur volume de distribution est élevé du fait de leur importante lipophilie.

II.4. Pharmacodynamique :

Les neuroleptiques ont une action sur les différents récepteurs tels que les récepteurs dopaminergiques, adrénergiques et cholinergiques, mais on va

s'intéresser plutôt à la première catégorie des récepteurs qui la présence des NL influent leur action. Ces récepteurs sont au nombre de cinq et ils ont sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G. Le récepteur D1 agit de façon fonctionnelle avec D2 en facilitant la stimulation de D2, ces récepteurs type D2 se trouve au niveau des corps cellulaires dopaminergiques (autorécepteurs).

Ces autorécepteurs sont stimulés en présence des antagonistes qui sont des molécules d'origine neuroleptique, ce qui diminue l'activité des neurones dopaminergiques ainsi que la synthèse et la libération de la dopamine.

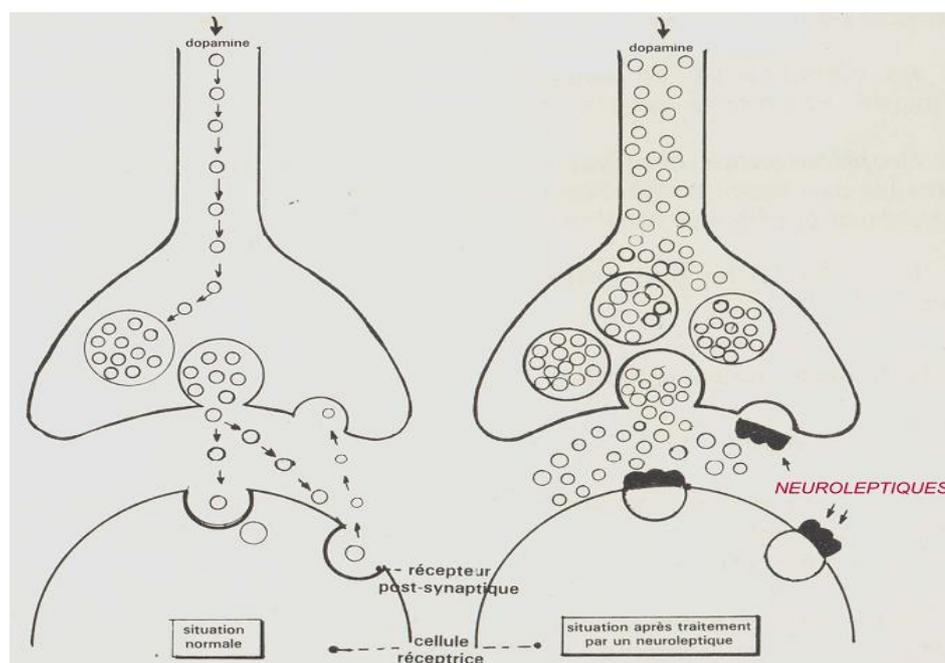


Figure 2 : Mode d'action des Neuroleptiques au niveau des récepteurs.

1. Classification des molécules NL:

Les neuroleptiques sont classés selon les effets cliniques, leur puissance et leur structure chimique et ceci pour avantage d'avoir plusieurs classes des NL :

1.1. Classification selon les effets cliniques :

La classification des neuroleptiques selon les effets cliniques varient entre : la modification des symptômes observés (hallucinations, délire, angoisse, agressivité) et les effets sédatifs et incisifs (antipsychotique) de ces médicaments et aussi selon ceux qui ont le plus d'effets sur l'agitation et l'angoisse, au prix d'effets indésirables surtout végétatifs (*la Lévomépromazine*).

EFFET THERAPEUTIQUE	EFFET INDESIRABLE	MEDICAMENTS
EFFET SEDATIF	EFFET VEGETATIF	Nozinan
↕	↕	Tercian
EFFET DESIHIBITEUR	EFFET HYPERKINETIQUE	Largactil
		Neuleptil
		Melleril
		Haldol
		Moditen (Modecate)
		Fluanxol

1.2. Classification en fonction de la puissance :

Tous les neuroleptiques possèdent les mêmes effets thérapeutiques, leurs différences résidant avant tout dans la fréquence et la diversité de leurs effets indésirables.

1.3. Classification selon la structure chimique :

La structure chimique des molécules permet, quant à elle, de distinguer plusieurs classes de neuroleptiques. Ces médicaments ont tous une structure complexe, associant plusieurs cycles à des chaînes de différentes natures.

Il existe quatre principales classes de neuroleptiques :

- **les Phénothiazines** (différentes structures tricycliques ont été obtenues par modification de la chaîne latérale) ;
- **les Butyrophénones** (dont le chef de file est l'halopéridol, remarquable par son activité anti hallucinatoire) ;
- d'autres composés tricycliques, comme **les Thioxanthènes**, résultent de modifications apportées au noyau des phénothiazines ;
- et enfin, **les Benzamides** (chef de file : le sulpiride, parfois considéré comme la première phénothiazine atypique).

III. Les phénothiazines : (13)

III.1 Définition :

L'histoire des phénothiazines commence en 1876 avec la synthèse du bleu de méthylène par le chimiste Allemand Heinrich (1834-1910).

Les phénothiazines se caractérisent par un noyau tricyclique (deux cycles benzéniques couplés par des atomes d'azote et de soufre), où se trouve généralement un halogène dont le rôle serait important dans l'activité antipsychotique.

Cette substance a des effets hypnogènes et sédatifs sur le système nerveux central.

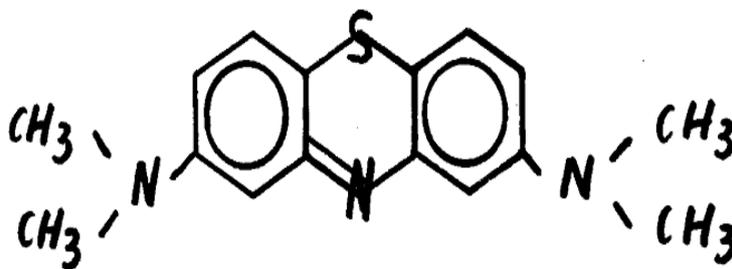


Figure 3 : structure chimique des Phénothiazines.

III.2. Pharmacocinétique :

Résorption :

Au niveau de l'intestin grêle, les molécules les plus liposolubles sont les plus rapidement résorbées, subissant ainsi l'effet au premier passage hépatique. Les phénothiazines est une classe des neuroleptiques, alors ils ont le même mécanisme de résorption.

Le délai d'apparition du pic plasmatique dépend avant tout de la voie d'administration. Les formes injectables intramusculaires (IM) sont adaptées aux interventions urgentes car elles se caractérisent par un pic précoce et une vitesse de résorption rapide, alors que les formes orales entraînent une résorption intestinale dont l'importance est proportionnelle à la liposolubilité de la substance considérée et ont un pic généralement plus tardif et moins élevé.

Distribution :

Le pic sérique est atteint rapidement en 2 à 4 heures :

- ✓ La fixation tissulaire est très stable, ceci se traduisant par un stockage prolongé du médicament.
- ✓ Passage transplacentaire et dans le lait maternel (en faible quantité), après un traitement prolongé de la mère, deux tableaux cliniques peuvent être observés chez le nouveau-né, correspondant soit à un syndrome d'imprégnation, soit à un syndrome de sevrage.

Demi-vie d'élimination:

Entre 10 et 35 heures.

Cette caractéristique conditionne, d'une part le nombre de prises quotidiennes, qui peut varier d'une à trois prises en fonction des substances utilisées et, d'autre part, le délai nécessaire pour atteindre les concentrations à l'équilibre (en règle 4 à 5 demi-vies). Les valeurs des demi-vies des principaux neuroleptiques varient considérablement selon les molécules.

À titre d'exemple, des métabolites de la chlorpromazine ont été retrouvés dans les urines 2 ans après l'interruption du traitement.

Métabolisme :

Le métabolisme des phénothiazines est d'origine hépatique et aboutit à de nombreux métabolites.

La plupart des neuroleptiques sont métabolisés au niveau hépatique par le cytochrome P450 (CYP450), c'est la famille d'iso enzymes permettant l'oxydation du substrat et présentant une affinité plus ou moins spécifique pour certains sous-groupes de médicaments.

Élimination :

Les phénothiazines sont éliminées par voie urinaire sous forme de métabolites conjugués inactifs, leur élimination est lente et prolongée.

On s'est intéressé dans cette validation à la molécule dérivée des phénothiazines : la Chlorpromazine (Largactil : Nom Commercial).

IV. Qu'est-ce que la chlorpromazine ? :



FIGURE 4 : Comprimé de Chlorpromazine (Largactil).

La chlorpromazine appartient à la classe des médicaments appelés phénothiazines. Elle s'utilise pour soigner la manie (état des troubles bipolaires) et les troubles psychotiques comme la schizophrénie.

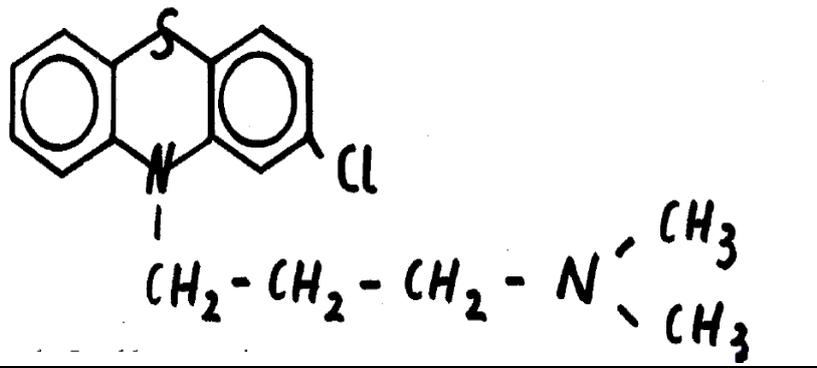


FIGURE 5 : Structure chimique de la Chlorpromazine.

a. Indications thérapeutiques :

La chlorpromazine est un médicament qui agit sur les neurotransmetteurs sécrétés dans le cerveau.

L'indication première de la chlorpromazine est d'induire le calme, de réduire l'agitation et l'anxiété surtout lorsque celles-ci sont associées à un état psychotique (la schizophrénie par exemple), mais aussi dans d'autres états d'hyperactivité chez l'adulte. Elle est également utilisée pour traiter les nausées, les vomissements, l'anxiété avant une chirurgie, le hoquet chronique, la porphyrie aiguë intermittente et les symptômes du tétanos.

b. En cas de surdosage :



Les symptômes du surdosage induit des effets secondaires tolérables à savoir : la bouche sèche, la constipation, le ballonnement ou des crampes d'estomac, la sensation de repos, l'agitation, la fièvre, la raideur musculaire, les mouvements musculaires saccadés, les modifications du rythme cardiaque, la somnolence extrême et l'évanouissement.

c. Les effets secondaires possibles de la chlorpromazine :



La chlorpromazine présente des effets secondaires moins tolérés, ils ressemblent généralement aux signes d'une réaction allergique comme l'urticaire, difficulté à respirer et gonflement du visage.



D'autres effets peuvent apparaitre plus sévères :

- contractions ou mouvements incontrôlables des yeux, des lèvres, de la langue, du visage, du bras ou des jambes;
- tremblements incontrôlables, bave, difficulté à avaler, problèmes d'équilibre ou de marche;
- sensation d'agitation et de nervosité ;
- nausées et douleurs d'estomac, éruption cutanée et jaunisse ;
- pâleur de la peau, ecchymoses ou saignements, fièvre, maux de gorge, symptômes de grippe;
- une forte fièvre, une raideur des muscles, une confusion, une transpiration, une tachycardie, une respiration rapide;
- pathologies ophtalmologiques : diminution de la vision, yeux larmoyants, sensibilité accrue à la lumière;

Validation statistique

I/ LE PROCESSUS DE VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE

Opération permettant d'assurer qu'un résultat a été obtenu dans des conditions techniques satisfaisantes et que celui-ci est compatible avec le dossier biologique du patient. Cette validation est à la fois analytique et biologique.

La validation analytique comporte la vérification de la conformité des conditions d'exécution aux procédures et tient compte notamment des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle.

Elle a pour principal objectif : s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, comptes tenus du but de l'analyse.

I.1. Définition :

La méthode d'analyse : (21)

Permet de réaliser une analyse, par description détaillée des différentes opérations nécessaires pour effectuer l'analyse de la substance à examiner.

Validation : (19)

C'est l'application déterminée avec un objectif clairement déterminé. Selon la norme *ISO 17025* ; la validation c'est la confirmation par examen et fourniture des preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté donné sont remplies.

La Validation d'une méthode :

C'est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée.

I.2. Types de validation :

Il existe plusieurs degrés de validation suivant la nature de la méthode, ce à quoi elle est destinée et le domaine concerné:

- **Méthode de contrôle en routine, utilisée sur plusieurs sites, contexte réglementaire fort = validation approfondie.**
- **Méthode utilisée ponctuellement dans un seul laboratoire, contexte réglementaire faible = validation rapide.**

Dans le cadre d'une méthode déterminée, il n'est pas forcément nécessaire d'évaluer toutes les performances, on détermine quelques paramètres :

- **La sensibilité.**
- **La linéarité.**
- **La fidélité : répétabilité.**
- **La limite de détection.**
- **La limite de quantification.**

II/ PERFORMANCES STATISTIQUES D'UNE METHODE DE MESURE BASEE SUR

LA COURBE

D'ETALONNAGE :

II.1. La sensibilité :

La sensibilité est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle est représentée par la pente de la courbe d'étalonnage (a_1) :

$$\text{Pente} : \frac{Y_1 - Y_2}{X_2 - X_1}$$

II.2. La linéarité :

La linéarité d'une méthode de mesure ou d'une procédure d'analyse est, selon le Comité d'Etude Européenne (CEE) III/844/87, sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, d'obtenir des résultats de mesure directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance de l'échantillon analyse.

II.3. Limite de détection, Limite de quantification :

➤ **La limite de détection (LD) :**

C'est la plus faible concentration de l'analyte détectée, mais pas nécessairement à doser, à l'aide d'une méthode spécifique dans des conditions expérimentales imposées.

➤ **La limite de quantification (LQ):**

C'est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

II.4. La fidélité :

La fidélité selon l'ISO 3534-1, l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essai obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées.

Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

➤ **La répétabilité :**

La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyse indépendants entre eux obtenus avec la méthode considérée sur un même échantillon, dans le même laboratoire, avec le même opérateur utilisant le même matériel, dans un court intervalle de temps.

Rappels statistiques

Il existe plusieurs termes statistiques qui sont utilisés dans le traitement des données expérimentales. Parmi ces termes on peut citer :

1. La moyenne : (9)

Dans le cas où une population sur un échantillon est répétée un certain nombre de fois. La moyenne de l'échantillon c'est \bar{x} .

La formule pour calculer la moyenne :

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

\bar{x} : Moyenne arithmétique.

X_i : Valeurs des observations de la variable X .

n : nombre d'observations.

2. La variance :

La variance est une mesure arbitraire servant à caractériser la dispersion d'une distribution ou d'un échantillon :

$$V = \frac{\sum_{i=1}^N n_i (x_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^N n_i} = \frac{n_1 (x_1 - \bar{x})^2 + n_2 (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + n_N (x_N - \bar{x})^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_N}$$

3. L'écart-type :

L'écart type est une mesure de la dispersion d'une variable aléatoire réelle. Il est défini comme la racine carrée de la variance :

$$\sigma_X = \sqrt{\text{Var}(X)}$$

4. Loi normale/ loi gaussienne/ loi de Laplace-Gauss :

La loi normale, notée $N(m, s)$, est caractérisée par sa moyenne m et son écart-type s (ou sa variance s^2). Elle est telle que :

L'espérance correspond au mode de la loi normale, la variance correspond au carré de l'écart-type, deux indices de dispersion de la distribution. Comme on le voit sur le graphe, la loi normale est symétrique autour de son espérance.

La courbe suivante représente la courbe de Gauss :

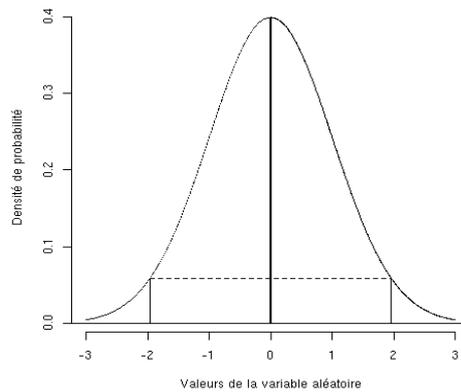


Figure 6 : Loi normale réduite.

5. Test de Dixon :

Un point aberrant provient d'une mesure pour laquelle un ou plusieurs paramètres sont hors contrôle.

Les valeurs aberrantes présentent des écarts par rapport à la moyenne. Le test de DIXON consiste à comparer la distance entre les points les plus éloignés du modèle et les points immédiatement plus voisins à l'étendue totale des résidus.

Il s'applique pour l'échantillon de taille $n \leq 30$, il ne nécessite pas le calcul de l'écart-type de la série dans la validation dont le nombre de l'effectif : $n = 6$. Son principe est de classer la distribution observée par valeurs croissantes : $Y_1 \leq Y_2 \leq Y_3 \leq \dots \leq Y_{n-1} \leq Y_n$.

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

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

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

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

$$14 \leq n \leq 30 \quad r_{22} = \frac{Y_n - Y_{n-2}}{Y_n - Y_3}$$

6. Loi de Student :

La loi de Student est une loi de probabilité, faisant intervenir le quotient entre une variable suivant une loi normale centrée réduite et la racine carrée d'une variable distribuée suivant la loi du χ^2 .

7. Coefficient de corrélation : (21)

Quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écarts-types : c'est étudier l'intensité de la liaison qui peut exister entre ces variables, étudier leur ressemblance. Plus le coefficient de corrélation se rapproche de 1 ou de -1, plus les variables sont corrélées, c'est à dire, ont des similitudes.

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

8. Coefficient de détermination :

La valeur au carré du coefficient de corrélation

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

9. Coefficient de variation :

Le coefficient de variation est un nombre sans unité qui permet de comparer deux variables statistiques de natures différentes. C'est le Rapport de l'écart-type à la moyenne, représenté en % :

$$CV \% = \frac{\sigma}{moy} \times 100$$

*Matériel et
méthodes.*

Ce travail a été effectué au laboratoire de pharmacologie au CHU-Hassan II de Fès sous la direction de Pr. Youssef KHABBAL pendant 2 mois allant de 02 Avril au 31 Mai.

Pendant ce stage nous nous sommes intéressés à la validation du dosage des phénothiazines par spectrophotomètre UV-Visible.

Matériel :

1. Introduction du sujet :

Dans cette étude, nous avons utilisé le spectrophotomètre UV-Visible Jasco V-530 :



Figure 7 : Image du spectrophotomètre UV-Visible marque : Jasco, modèle : 530.

- Plage de mesure de longueur d'onde 190-1100 nm.
- Système photométrique est à double faisceau du système.
- Pour les laboratoires concernés sur les BPF / BPL, le V530 offre un ensemble de validation logiciel optionnel pour assurer l'intégrité des données.

2. Spectrophotomètre : (6)

Un certain nombre de méthodes quantitatives décrites font appel à la spectrophotométrie dans l'Ultra Violet (UV : 200-400 nm) ou le Visible (400-800 nm).

Le spectrophotomètre peut être à simple faisceau ou à double faisceau.

Dans un instrument à simple faisceau, le rayonnement provenant de la source lumineuse passe dans un monochromateur puis traverse la cuve contenant l'échantillon avant d'atteindre le détecteur.

Dans un instrument à double faisceau, le rayonnement lumineux sortant du monochromateur passe par un dispositif qui le divise en deux faisceaux, dont l'un traverse la cuve contenant l'échantillon et l'autre traverse la deuxième cuve contenant la substance de référence, avant d'atteindre le détecteur.

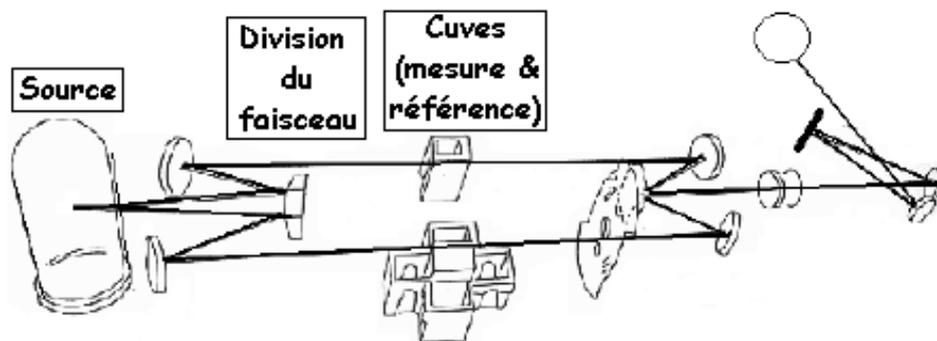


Figure 8 : Schéma d'un spectrophotomètre à double faisceau. (4)

Le faisceau issu de la source est envoyé vers un monochromateur puis vers un rupteur qui envoie alternativement le faisceau vers la cuve de référence puis vers la cuve contenant l'échantillon.

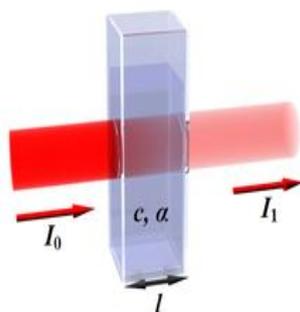
Un système de miroir permet d'envoyer ces deux faisceaux vers le même capteur qui reçoit donc alternativement le faisceau de puissance de référence et le faisceau de puissance transmis par l'échantillon.

Le signal du capteur est alors traité par un microprocesseur qui permet d'afficher la transmittance ou l'absorbance.

3. Loi de Beer-Lambert : (6)

En spectrophotométrie, la relation entre l'intensité lumineuse à l'entrée et à la sortie de la cuve est régie par la loi de Beer-Lambert qui s'énonce ainsi : la fraction de l'énergie lumineuse absorbée par une solution constituée d'un soluté absorbant dissous dans un solvant transparent est proportionnelle au nombre de molécules de soluté traversées par le rayon lumineux, ce qui se traduit par la formule :

$$\text{Log}_{10} \frac{I_0}{I} = \alpha \cdot c \cdot l$$



Où :

I_0 : est l'intensité lumineuse incidente,

I : est l'intensité lumineuse transmise,

c : est la concentration du soluté (g/l),

l : est la longueur du trajet optique (cm),

α : est l'absorptivité du système.

Le constant α est une propriété fondamentale du soluté, mais elle dépend aussi de la température, de la longueur d'onde et du solvant. Le terme $\text{Log}_{10} \frac{I_0}{I}$ est appelé absorbance (A); à condition que la solution soit suffisamment diluée, l'absorbance est directement proportionnelle à la fois à la concentration du soluté et à la longueur du trajet optique. Elle était autrefois appelée densité optique (DO) ou coefficient d'extinction (E).

4. Les spectres dans l'UV / visible : (5)

Les spectres dans l'UV-Visible donnent la transmittance ou l'absorbance de l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde du rayonnement ou parfois du nombre d'onde, son inverse la transmittance notée T est donnée par :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Où I_0 est l'intensité incidente et I l'intensité transmise. L'absorbance est définie par :

$$A = -\log T$$

Cette dernière grandeur est très utile en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert. Plus un composé est absorbant plus la transmittance est faible et plus l'absorbance est élevée.

Méthodes :

Le réactif correspondant aux phénothiazines est le FPN : l'acide Ferrique Perchlorique et Nitrique (FPN).

1/Protocole de fabrication de FPN :

a. Solution mère :

- Solution d'acide Nitrique 500 ml/l.
- Solution d'acide Perchlorique 200g/l.
- Solution aqueuse de chlorure Ferrique 500g/l.

b. Protocole expérimental :

On prend 5ml de chlorure ferrique auquel on ajoute 45ml d'acide perchlorique additionné de 50ml d'acide nitrique et on complète jusqu'à 100ml avec de l'eau distillée (solution S1).

Pour le dosage des phénothiazines on prend 1ml de S1 qu'on ajoute à l'échantillon à analyser.

L'apparition d'une coloration rose est un indice de la présence de la chlorpromazine dans l'échantillon. D'autres colorations peuvent apparaître suite à cette réaction et qui peuvent correspondre à d'autres molécules de phénothiazines.

2/Etude spectroscopique de l'échantillon :

Après la préparation du réactif, on prépare une gamme d'étalon pour doser la chlorpromazine.

Résultats :

1/Recherche de la longueur d'onde d'absorption :

Pour rechercher l'absorption de la chlorpromazine, on est obligé de se placer à une absorbance maximale afin d'obtenir la plus grande précision du dosage. Pour cette molécule, le maximum d'absorption a été trouvé à 450nm.

2/Droite d'étalonnage :

On prépare une gamme d'étalon, série de solutions contenant le soluté à étudier à des concentrations décroissantes on faisant une dilution de 1/2.

En se plaçant ensuite à λ_{\max} on fait le zéro et on relève l'absorbance mesurée pour chaque solution.

Tableau 2 : Préparations des étalons.

Tubes	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Dilution	Concentration Mère	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Concentration mg/l	125,4	62,7	31,36	15,67	7,84	3,92
Moyenne des absorbances	3,33775	1,8625	1,13175	0,68675	0,47325	0,3255

La gamme d'étalon préparée est la suivante :

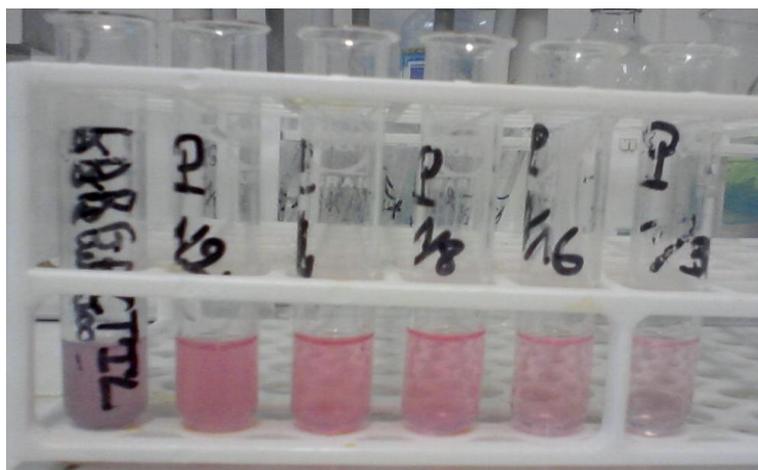


Figure 9 : gamme d'étalon de la chlorpromazine.

Les résultats de la validation sont obtenus à l'aide de l'EXCEL, en se basant sur le tableau suivant :

Tableau 3 : tableau des absorbances

Concentration mg/l	Réponses				Moy
	Rép1	Rép2	Rép3	Rép4	
125,4	3,621	3,525	3,143	3,062	3,337
62,7	1,832	1,865	1,916	1,837	1,862
31,36	1,176	1,149	1,119	1,083	1,131
15,67	0,714	0,670	0,669	0,694	0,686
7,84	0,501	0,478	0,479	0,435	0,473
3,92	0,369	0,323	0,320	0,290	0,325

A partir de ce tableau, on a pu tracer le graphe n° 12 qui représente la moyenne des densités optiques en fonction de la concentration de la chlorpromazine présente dans chaque tube :

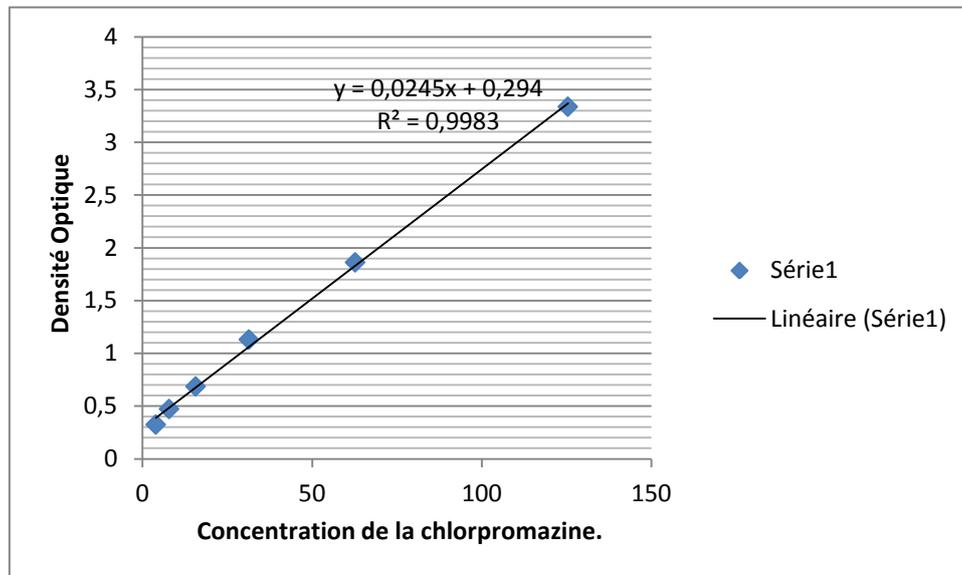


FIGURE 10 : Courbe d'étalon de la chlorpromazine.

a. Sensibilité :

En se basant sur le graphe (figure 10) nous avons déduit la sensibilité, en autre terme la pente :

L'équation de la droite : $Y = ax + b$

$$Y = 0,024x + 0,294$$

La pente = $a = 0,024$

b. La linéarité :

A partir de la solution mère dont la $C=125,4$ mg/l, des solutions de concentration décroissante ont été préparées, la linéarité est vérifiée par ces solutions.

Pour être sur de la linéarité de la courbe nous avons appliqué le test de DIXON, qui nous permet de détecter la présence ou non des points aberrants.

▪ **Test de valeurs aberrantes :**

○ Test de Dixon :

Dans notre cas on a six niveaux de concentration ($n=6$), alors la formule qu'on va utiliser c'est :

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

- Le premier niveau de concentration [125,4 mg/l], nous avons mesuré quatre absorbances:

$$3,062 \leq 3,143 \leq 3,525 \leq 3,621$$

$$r_{10} = \frac{3,621 - 3,525}{3,621 - 3,062} = 0,171$$

- Le deuxième niveau de concentration [62,7 mg/l], nous avons mesuré quatre absorbances :

$$1,832 \leq 1,837 \leq 1,865 \leq 1,916$$

$$r_{10} = \frac{1,916 - 1,865}{1,916 - 1,832} = 0,607$$

- Le troisième niveau de concentration [31,36 mg/l], nous avons mesuré quatre absorbances :

$$1,083 \leq 1,119 \leq 1,149 \leq 1,176$$

$$r_{10} = \frac{1,176 - 1,149}{1,176 - 1,083} = 0,290$$

- Le quatrième niveau de concentration [15,67 mg/l], nous avons mesuré quatre absorbances :

$$0,669 \leq 0,670 \leq 0,694 \leq 0,714$$

$$r_{10} = \frac{0,714 - 0,694}{0,714 - 0,669} = 0,444$$

- Le cinquième niveau de concentration [7,84 mg/l], nous avons mesuré quatre absorbances :

$$0,435 \leq 0,478 \leq 0,479 \leq 0,501$$

$$r_{10} = \frac{0,501 - 0,479}{0,501 - 0,435} = 0,333$$

- Le sixième niveau de concentration [3,92 mg/l], nous avons mesuré quatre absorbances :

$$0,290 \leq 0,320 \leq 0,323 \leq 0,369$$

$$r_{10} = \frac{0,369 - 0,323}{0,369 - 0,290} = 0,582$$

D'après la table de Dixon (voir annexe), $r_{critique} = 0,56$ (valeur présente dans la table de DIXON qui correspond au nombre d'effectif = 6, et à la valeur de $\alpha = 5\%$).

- Pour le deuxième niveau de concentration, on remarque que :
 $r_{10} = 0,607 > r_{critique} = 0,56$

Donc, le deuxième niveau de concentration présente un point aberrant.

- Pour le sixième niveau de concentration, on remarque que :
 $r_{10} = 0,582 > r_{critique} = 0,56$

Donc, le sixième niveau de concentration présente un point aberrant.

⊗ *Le test de Dixon atteste la présence de deux points aberrants.*

c. Limite de détection :

La limite de détection est déterminée par la formule suivante :

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

Avec : σ : écart-type.

S : pente de la courbe d'étalon.

$$\sigma = \frac{0,276 + 0,038 + 0,039 + 0,021 + 0,027 + 0,032}{6}$$

$$\sigma = 0,072$$

$$S = 0,024$$

$$LD = 3,3 \times \frac{0,072}{0,024}$$

$$LD = 9,9\mu\text{g}$$

d. Limite de quantification :

La limite de quantification est déterminée par la formule suivante :

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

Avec : σ : écart-type.

S : pente de la courbe d'étalon.

$$\sigma = \frac{0,276 + 0,038 + 0,039 + 0,021 + 0,027 + 0,032}{6}$$

$$\sigma = 0,072$$

$$S = 0,024$$

$$LQ = 10 \times \frac{0,072}{0,024}$$

$$LQ = 30\mu\text{g}$$

e. Coefficient de détermination :

D'après le graphe 10, nous avons déduit le coefficient de détermination à l'aide de l'Excel :

$$R^2 = 0,998$$

f. Coefficient de corrélation :

Le coefficient de corrélation est calculé à partir du coefficient de détermination :

$$R = \sqrt{R^2}$$

$$R = \sqrt{0,998}$$

$$R = 0,99899$$

g. Fidélité : répétabilité :

Les valeurs d'absorbances relatives aux concentrations de la chlorpromazine dans les 6 étalons, ainsi que la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variance de chaque série sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Résultats des étalons.

Concentration mg/l	Réponses				Moy	Ecart- type	Cv (%)
	Rép1	Rép2	Rép3	Rép4			
125,4	3,621	3,525	3,143	3,062	3,337	0,276	8,282
62,7	1,832	1,865	1,916	1,837	1,862	0,038	2,067
31,36	1,176	1,149	1,119	1,083	1,131	0,039	3,532
15,67	0,714	0,670	0,669	0,694	0,686	0,021	3,135
7,84	0,501	0,478	0,479	0,435	0,473	0,027	5,836
3,92	0,369	0,323	0,320	0,290	0,325	0,032	10,016

Discussion :

1. La courbe obtenue à partir des données du tableau 2 a été représentées sur le graphe 10 et à partir de ce graphe nous avons déduit :

- **La sensibilité** : en se basant sur le graphe (figure 10), nous avons déduit la sensibilité (la pente) :

$$Y = 0,024x + 0,294$$

La pente = a = 0,024

Quand la concentration augmente de 1, la densité optique augmente de 0,024 (= la pente).

- **Le coefficient de détermination** : $R^2 = 0,998$,
 $-1 < 0,998 < 1$, puisque la valeur obtenue est positive ; les deux variables (concentration de la chlorpromazine et densité optique) varient dans le même sens.
 - **Le coefficient de corrélation** : $R = 0,99899$,
 $R \cong 1$, les deux variables sont colinéaires. C'est-à-dire les points sont parfaitement alignés.
 - **Le coefficient de variation** obtenu dans le tableau 4 pour chaque concentration se présente dans un intervalle entre 8% et 10. Puisque la valeur du coefficient de variation est inférieure à 15 %, on considère que les données sont homogènes.
2. Après le calcul de **la limite de détection**, le résultat obtenu est égale à $9,9\mu\text{g}$, cette valeur correspond selon la définition donnée à la plus petite concentration qu'on peut détecter sans avoir besoin de la doser.
 3. Après l'application de la formule de **la limite de quantification**, on obtient $LD = 30\mu\text{g}$, cela signifie que $30\mu\text{g}$ est la plus petite quantité ou concentration qu'on peut doser et au-dessous on ne peut rien quantifier.

Conclusion

Avec la mise en place des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires, la validation des méthodes d'analyse est aujourd'hui un objectif important.

C'est pour cette raison là, que nous sommes intéressés par *la validation des phénothiazines par spectrophotométrie UV-Visible* comme sujet de fin d'études.

Cette étude, nous a permis de doser précisément des domaines absorbants dans le domaine de l'UV-Visible, à condition de choisir les matériaux pour les cuves de dosages et les solvants pour que ceux-ci n'interfèrent pas dans le domaine d'application.

L'estimation de la spécificité, la linéarité, la répétabilité, la limite de détection et de quantification, confirme que la méthode d'analyse est normale, fidèle et juste.

Nous avons commencé par des tests de la validité de la courbe d'étalonnage à savoir l'homogénéité des variances des étalons, l'estimation des coefficients de cette courbe à savoir le coefficient de variance, de détermination et de corrélation.

Dans notre étude, nous sommes amenés à effectuer des tests statistiques sur les caractéristiques de la performance de la méthode d'analyse et des dosages, ce qui a montré que l'appareil est apte à générer des résultats fiables.

Références bibliographiques

1. Max. Principes et vocabulaire pour la validation des méthodes.
2. Franck N. Thibaut A. a Centre hospitalier Le Vinatier, institut des sciences cognitives (IFNL) et UFR de médecine, Lyon service hospitalo-universitaire de psychiatrie, France. *Centre hospitalier et universitaire Charles Nicolle, Inserm unité 614, UFR de médecine, Rouen, France.*
3. Teissier.T. (2003-2004).*Université de Créteil-paris xii, madet Nicolas licence IUP sial.*
4. Génie des Procédés", centre SPIN. Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation. *Ecole des Mines de Saint-Etienne.*
5. Philippe.G. (2011). Mesures Physiques Annecy – MPh2 SE3 ME3, Techniques spectroscopiques d'analyse / Spectrophotométrie UV/visible.
6. Chimie Analytique Instrumentale, Notions De Spectrophotométrie UV-Visible. Laboratoire Chimie Provence, UMR 6264. *Universités d'Aix-Marseille I, II et III – CNRS.*
7. Jean-Jacques.D. D'après le chapitre 10 du livre Eléments de statistique. *Ellipses Marketing.*
8. Cerner.M. (1996-2010). Inc. Version: 7.02. Revision date: 4/12/2009.
9. Pierre.J. Statistiques à l'usage des ingénieurs et des techniciens.
10. Olivier. G. Principes et méthodes statistiques.
11. Eric.R. William J. Marshall Stephen k. Bangert. Biochimie médicale, physiopathologie et diagnostic.
12. (2006-2007). contribution a la réalisation d'une unité de toxicologie analytique au centre hospitalier universitaire du point-g. Faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie (fmpos).

13. Youssef.K. Les phénothiazines. Une famille thérapeutique séculaire qui n'a pas encore dévoilé tous ses secrets. *Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Casablanca, Université Hassan II.*
14. Pascal.K. Toxicologie et Pharmacologie Médicolégales.
15. Paul.S. (24 Juin 2009). : Evolution de la consommation de médicaments psycho actifs en milieu du travail : impact sur le fonctionnement cognitif.
L'université Toulouse III.
16. Senon.J.L. CSCST (2002-2003). *Université De Poitiers, Faculté De Médecine.*
17. Franck D. Spectroscopie UV-Visible. ICMUB UMR 5260 9, Av. Alain Savary BP 47870 21078. *Dijon.*
18. Michèle.D. Marc.P. Cédric.R. De la validation des méthodes d'analyse à l'évolution de l'incertitude des résultats de mesure.
Laboratoire National d'Essais BNM-LNE.
19. (9 Juin 2009). Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie. *Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec.*
20. Autans. (14 Octobre 2010). Validation des méthodes d'analyse, journées qualité et chimie 2010 une démarche qualité au service de la chimie.
21. J. Guillaume (22 Mars 2012). *Coefficient de corrélation et régression linéaires.*
22. J. Kremer (16/1/1984). Les phénothiazines en pharmacologie.
23. M. Polosan. Département de psychiatrie CHU Grenoble.
Psychopharmacologie.